

**ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**  
**SEDE DI RAVENNA**  
**SCUOLA DI SCIENZE**

Corso di Laurea Magistrale in  
ANALISI E GESTIONE DELL'AMBIENTE

**Effetto dei farmaci ambientali propranololo e carbamazepina sullo  
sviluppo larvale del mitilo, *Mytilus galloprovincialis***

Tesi di Laurea Magistrale in  
Fisiologia Applicata all'Ambiente

Relatore  
Prof.ssa ELENA FABBRI

Presentata da  
ANNA FOSCHINI

Correlatore  
Dott.ssa SILVIA FRANZELLITTI

III<sup>^</sup> sessione  
Anno Accademico 2014/2015



# Sommario

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUZIONE</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1 I farmaci in ambiente   | 5         |
| 1.1.1 Le fonti di contaminazione ambientale                             | 6         |
| 1.1.2 Destino in ambiente   | 8         |
| 1.1.3 Concentrazioni ambientali   | 8         |
| 1.1.4 Effetti ecotossicologici  | 9         |
| 1.2 Propranololo  | 13        |
| 1.3 Carbamazepina   | 15        |
| 1.4 Il biomonitoraggio e i bioindicatori                                | 16        |
| 1.4.1 <i>Biomarker</i>  | 17        |
| 1.5 L'organismo sentinella utilizzato: <i>Mytilus galloprovincialis</i> | 19        |
| 1.5.1 Aspetti morfologici e funzionali                                  | 20        |
| 1.5.2 <i>Mytilus galloprovincialis</i> come organismo sentinella        | 25        |
| 1.5.3 Saggio ecotossicologico con embrioni e larve di molluschi bivalvi | 26        |
| 1.6 La <i>Multixenobiotic Resistance</i>                                | 26        |
| 1.7 Lo stress ossidativo  | 30        |
| 1.8 Il metabolismo degli xenobiotici                                    | 33        |
| 1.9 La biomineralizzazione delle conchiglie dei molluschi               | 36        |
| 1.9.1 La formazione della conchiglia larvale                            | 36        |
| 1.9.2 La conchiglia dell'adulto   | 39        |
| 1.9.3 Proteine coinvolte nella biomineralizzazione                      | 43        |
| <b>2. OBIETTIVI</b>   | <b>47</b> |
| <b>3. MATERIALI E METODI</b>  | <b>49</b> |
| 3.1 Fecondazione in vitro degli ovociti di mitilo                       | 49        |
| 3.2 Saggio di embriotossicità   | 51        |
| 3.3 Saggio di valutazione dell'attività delle proteine MXR              | 52        |
| 3.4 Dosaggio delle proteine   | 54        |
| 3.5 Analisi dell'espressione genica                                     | 55        |
| 3.5.1 Estrazione dell'RNA totale  | 55        |
| 3.5.2 Retrotrascrizione   | 56        |
| 3.5.3 PCR Real-Time   | 57        |
| 3.5.3.1 La rivelazione dei prodotti di PCR                              | 60        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.5.3.2 Analisi dei dati _____   | 65        |
| 3.6 Trattamento statistico dei dati _____  | 68        |
| <b>4. RISULTATI _____</b>  | <b>69</b> |
| 4.1 Osservazione delle fasi di sviluppo embrionale e larvale _____   | 69        |
| 4.2 Saggio di embriotossicità _____  | 73        |
| 4.2.1 Test con propranololo _____  | 73        |
| 4.2.2 Test con carbamazepina _____   | 74        |
| 4.3 Saggio di valutazione dell'attività delle proteine MXR _____   | 75        |
| 4.3.1 Test con inibitori _____   | 75        |
| 4.3.2 Test con propranololo _____  | 76        |
| 4.3.3 Test con carbamazepina _____   | 77        |
| 4.4 Espressione genica _____   | 78        |
| 4.4.1 Espressione del gene codificante per la P-glicoproteina (P-gp) – Test con<br>propranololo _____                                | 78        |
| 4.4.2 Espressione del gene codificante per la <i>Multidrug Resistance-associated Protein</i><br>(MRP) – Test con propranololo _____  | 79        |
| 4.4.3 Espressione del gene codificante per la catalasi (CAT) – Test con propranololo _____   | 80        |
| 4.4.4 Espressione del gene codificante per la glutatione S-transferasi (GST) – Test con<br>propranololo _____                        | 81        |
| 4.4.5 Espressione del gene codificante per l'anidrasi carbonica (CA) – Test con<br>propranololo _____                                | 82        |
| 4.4.6 Espressione del gene codificante per la proteina extrapalliale (EP) – Test con<br>propranololo _____                           | 83        |
| 4.4.7 Espressione del gene codificante per la P-glicoproteina (P-gp) – Test con<br>carbamazepina _____                               | 84        |
| 4.4.8 Espressione del gene codificante per la <i>Multidrug Resistance-associated Protein</i><br>(MRP) – Test con carbamazepina _____ | 85        |
| 4.4.9 Espressione del gene codificante per la catalasi (CAT) – Test con carbamazepina _____  | 86        |
| 4.4.10 Espressione del gene codificante per la glutatione S-transferasi (GST) – Test con<br>carbamazepina _____                      | 87        |
| 4.4.11 Espressione del gene codificante per l'anidrasi carbonica (CA) – Test con<br>carbamazepina _____                              | 88        |
| 4.4.12 Espressione del gene codificante per la proteina extrapalliale (EP) – Test con<br>carbamazepina _____                         | 89        |
| <b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI _____</b>  | <b>91</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA _____</b>   | <b>99</b> |

# 1. Introduzione

## 1.1 I farmaci in ambiente

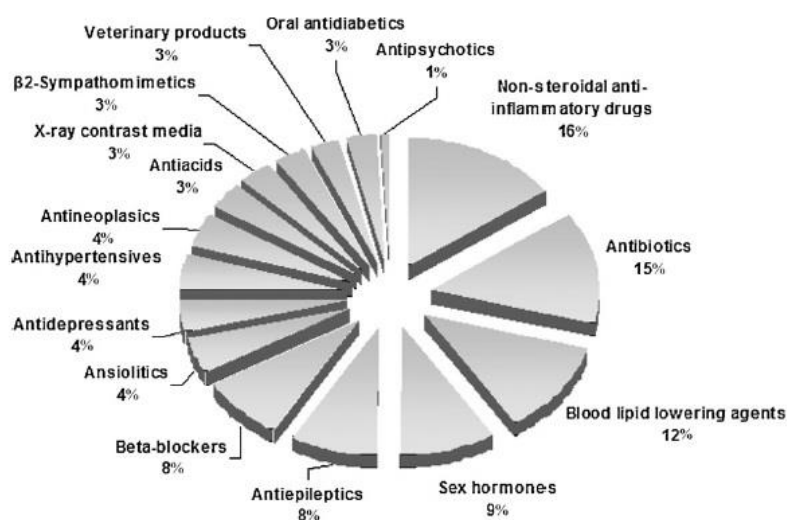
La presenza e il destino dei farmaci nell'ambiente acquatico sono stati riconosciuti come una delle questioni emergenti nell'ambito della chimica ambientale (Heberer, 2002).

Inizialmente il problema fu evidenziato negli anni '70 negli USA, dove fu trovato acido clofibrico, in un range che andava da 0,8 a 2 µg/L, nelle acque reflue trattate.

Nel 1981 furono individuati farmaci nelle acque dei fiumi britannici, a concentrazioni fino a 1 µg/L, e, sempre negli anni '80, l'ibuprofene e il naproxene, due farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) vennero identificati nelle acque reflue canadesi (Fent et al., 2006).

Comunque, fu solo negli anni '90 che la conoscenza circa la contaminazione ambientale data da questi composti cominciò ad aumentare, grazie allo sviluppo e ai progressi nelle tecniche analitiche, che hanno permesso di abbassare i limiti di rivelabilità fino ai ng/L, consentendo così ai ricercatori di quantificare un ampio numero di farmaci in ambiente (Santos et al., 2010).

Infatti, è stata segnalata la presenza di circa un centinaio tra farmaci e loro metaboliti negli effluenti e nelle acque superficiali in tutto il mondo. Tra questi composti si trovano anti-infiammatori non steroidei, antibiotici, farmaci ipolipemizzanti, beta-bloccanti, sostanze neuroattive (antidepressivi, antiepilettici...), ormoni, antineoplastici, etc. (Fig. 1.1) (Martin-Diaz et al., 2009).



**Fig. 1.1.** Classi di farmaci trovate in ambiente, espresse in percentuale relativa (Santos et al., 2010).

A differenza degli inquinanti tradizionali (come pesticidi, detersivi, combustibili, etc.), i farmaci sono immessi continuamente in ambiente, anche se in piccole quantità. A causa della loro costante introduzione (principalmente nei sistemi acquatici) e della loro inefficiente rimozione, i farmaci possono essere considerati come contaminanti pseudo-persistenti (nello specifico, se i loro tassi di degradazione sono superati dai tassi di introduzione) (Ankley et al., 2007 - Martin-Diaz et al., 2009 – Santos et al., 2010).

Inoltre queste molecole sono concepite per avere particolari modalità di azione sulla fisiologia dell'organismo bersaglio e, in genere, per resistere all'inattivazione prima di avere esercitato il loro effetto terapeutico. Queste stesse proprietà sono responsabili del bioaccumulo e della tossicità negli ecosistemi acquatici e terrestri (Santos et al., 2010).

### **1.1.1 Le fonti di contaminazione ambientale**

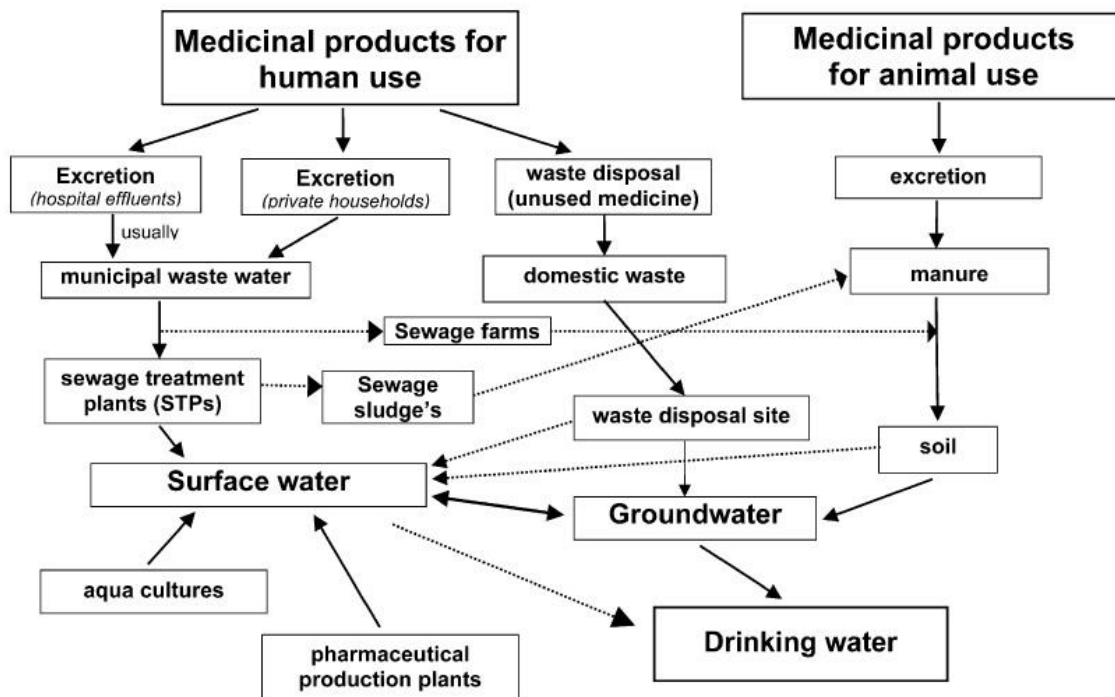
La via principale attraverso cui i farmaci usati per i diversi scopi terapeutici vengono introdotti in ambiente è l'escrezione tramite urine e feci: una parte di tali composti infatti non viene completamente assorbita dall'organismo e, di conseguenza, spesso viene escreta inalterata o coniugata a molecole polari (le molecole utilizzate per la coniugazione vengono poi distrutte durante il trattamento delle acque reflue, restituendo così all'ambiente il principio attivo originario del farmaco).

Inoltre spesso le medicine non utilizzate vengono incautamente gettate nel lavandino o nello scarico del bagno.

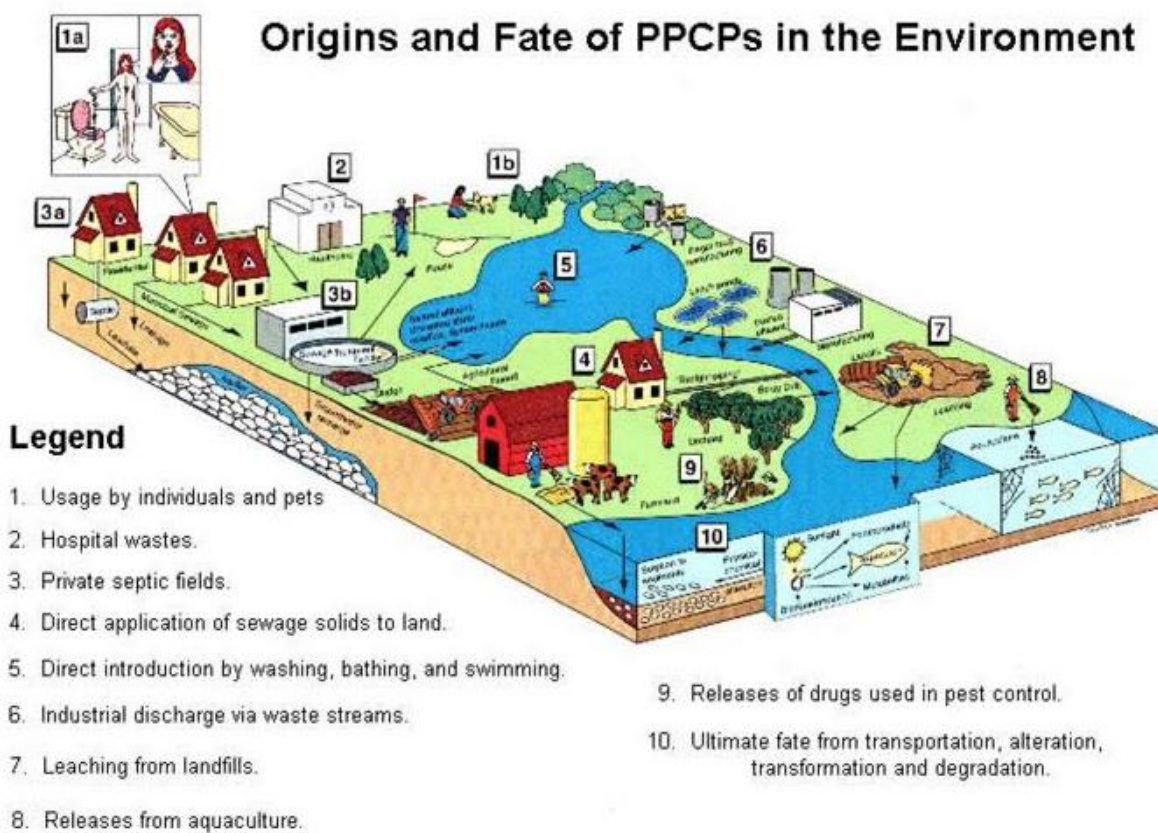
Quello dei reflui urbani è quindi il principale meccanismo mediante il quale i farmaci ad uso umano vengono immessi in ambiente, anche rispetto agli scarichi ospedalieri, più concentrati ma anche meno numerosi (Santos et al., 2010).

I farmaci non prontamente degradati negli impianti di trattamento delle acque reflue sono scaricati negli effluenti, causando la contaminazione delle acque di ricezione, come le acque superficiali (laghi, fiumi, estuari...), acqua di mare e persino acque sotterranee.

Altre fonti di contaminazione sono costituite dai reflui ospedalieri e industriali, dai percolati di discariche, dal *run-off* e dal drenaggio agenti nei confronti dei fanghi derivati dagli impianti di trattamento delle acque reflue o del letame derivato dagli allevamenti (fanghi e letame vengono utilizzati come fertilizzanti sui terreni agricoli e quindi possono andare anche a contaminare i suoli), dall'acquacoltura. Da notare che non solamente i farmaci ad uso umano, ma anche quelli ad uso veterinario contribuiscono alla contaminazione di ambiente acquatico e terrestre (Fig. 1.2 – Fig. 1.3) (Fent et al., 2006 - Heberer, 2002 - Santos et al., 2010).



**Fig. 1.2.** Le possibili fonti e vie di distribuzione per la presenza di residui di farmaci in ambiente (Heberer, 2002).



**Fig. 1.3.** Origini e destino dei farmaci e prodotti per la cura personale (PPCPs) in ambiente (www.epa.gov).

### **1.1.2 Destino in ambiente**

Il comportamento e il destino dei farmaci e dei loro metaboliti in ambiente richiede ancora delucidazioni. La scarsa volatilità sembra indicare che la distribuzione avvenga prevalentemente tramite trasporto acquoso, ma anche attraverso la catena trofica.

Nel trattamento delle acque reflue sono principalmente due i processi di eliminazione dei farmaci: l'adsorbimento ai solidi sospesi e la biodegradazione. I farmaci acidi, come i FANS acido acetilsalicilico, ibuprofene, ketoprofene, naproxene, diclofenac..., hanno valori di  $pK_a$  che vanno da 4,9 a 4,1 e quindi, a pH neutro, sono in forma ionica ed hanno scarsa tendenza ad essere adsorbiti ai fanghi. In caso un farmaco si trovi prevalentemente nella fase dissolta, la biodegradazione sembra essere il processo di eliminazione più importante nel trattamento delle acque reflue. Può avvenire sia aerobicamente che anaerobicamente nel trattamento a fanghi attivi, o anaerobicamente nella digestione dei fanghi. Generalmente i migliori tassi di biodegradazione si ottengono con un aumento nel tempo di ritenzione idraulica e con l'utilizzo di fanghi maturi (Fent et al., 2006).

L'efficienza della rimozione dei farmaci negli impianti di trattamento è valutata sulla base della comparazione delle concentrazioni nell'influenza e nell'effluente e varia a seconda della costruzione e della tecnologia impiegata, del tempo di ritenzione e anche della stagione (le diverse efficienze vanno dallo 0 al 99%).

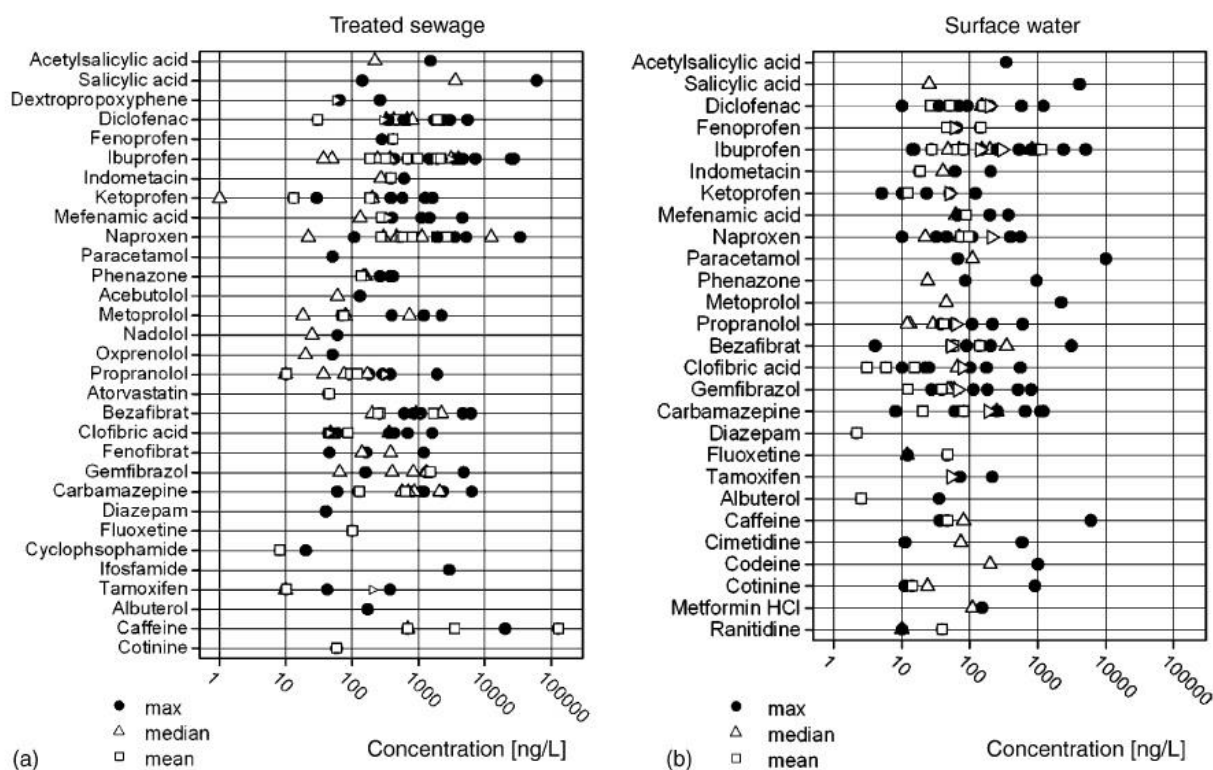
Una volta che il farmaco ha raggiunto le acque superficiali, esso può venire degradato principalmente ad opera di reazione di fotolisi, la cui efficienza dipende, oltre che dalle proprietà del composto, anche dalla forza dell'irraggiamento solare (quindi dalla latitudine e dalla stagione) e dalla presenza in acqua di costituenti che possano agire come fotosensibilizzanti (Fent et al., 2006).

### **1.1.3 Concentrazioni ambientali**

Le concentrazioni dei farmaci ritrovati in ambiente sono generalmente nell'ordine dei ng/L o dei µg/L (Fig. 1.4) (Fent et al., 2006).

Nella figura si osserva come le concentrazioni mediamente si riducono di un fattore 10-100 passando dagli effluenti degli impianti di trattamento alle acque superficiali, per effetto della diluizione che avviene quando gli effluenti entrano nei corsi d'acqua. Tuttavia, come si vede, le concentrazioni nelle acque superficiali valutate nei diversi studi rimangono in un range di 10-1000 ng/L. Queste concentrazioni, come vedremo, hanno effetti sugli organismi esposti.





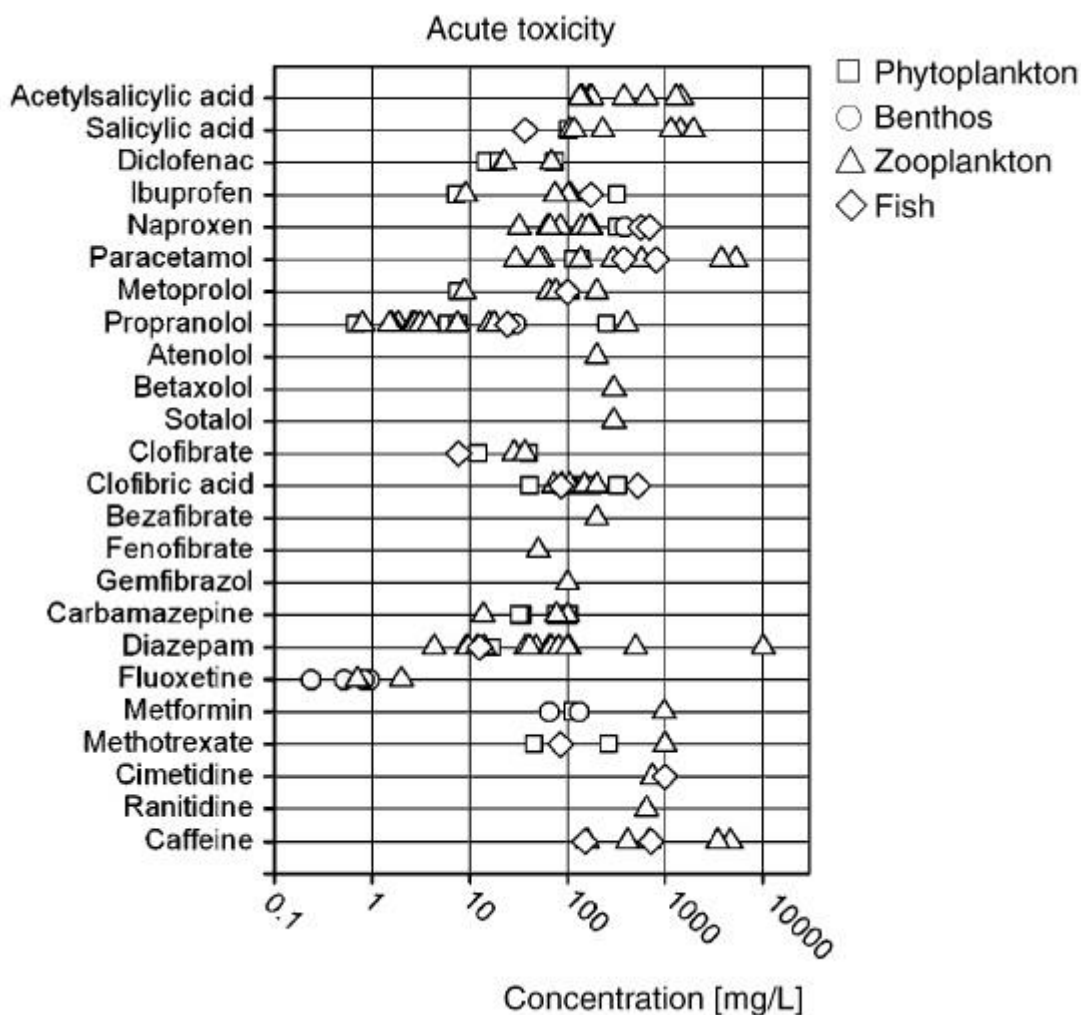
**Fig. 1.4.** Concentrazioni di farmaci nelle acque reflue trattate (a) e nelle acque superficiali (b) (Fent et al., 2006).

### 1.1.4 Effetti ecotossicologici

I farmaci si comportano in maniera abbastanza diversa rispetto agli inquinanti convenzionali, in accordo con il fatto di essere stati progettati per essere bioattivi a basse concentrazioni. Inoltre i farmaci agiscono su specifici *pathway* metabolici e molecolari; questi possono essersi conservati durante l'evoluzione e possono esistere negli organismi acquatici, sia vertebrati che invertebrati. Quindi le basse concentrazioni non costituiscono un fattore di sicurezza. In più non possono essere escluse anche ulteriori modalità di azione, differenti rispetto a quelle terapeutiche attuate sull'organismo target, in quanto gli organismi non target con cui il farmaco viene a contatto potrebbero possedere meccanismi molecolari diversi, tali da indurre particolari effetti non mostrati per esempio nella specie umana (Franzellitti et al., 2011).

Per questi motivi, i saggi di tossicità dovrebbero essere pianificati per specifici target del farmaco, basandosi sull'ipotesi della somiglianza delle modalità di azione tra diversi organismi. Invece spesso viene valutata la tossicità acuta dei farmaci mediante test standard tradizionali seguenti linee guida (OECD, U.S. EPA, ISO) che prendono in considerazione *endpoint* tradizionali, come la mortalità, utilizzando organismi standard, come le alghe o lo zooplancton (Fent et al., 2006).

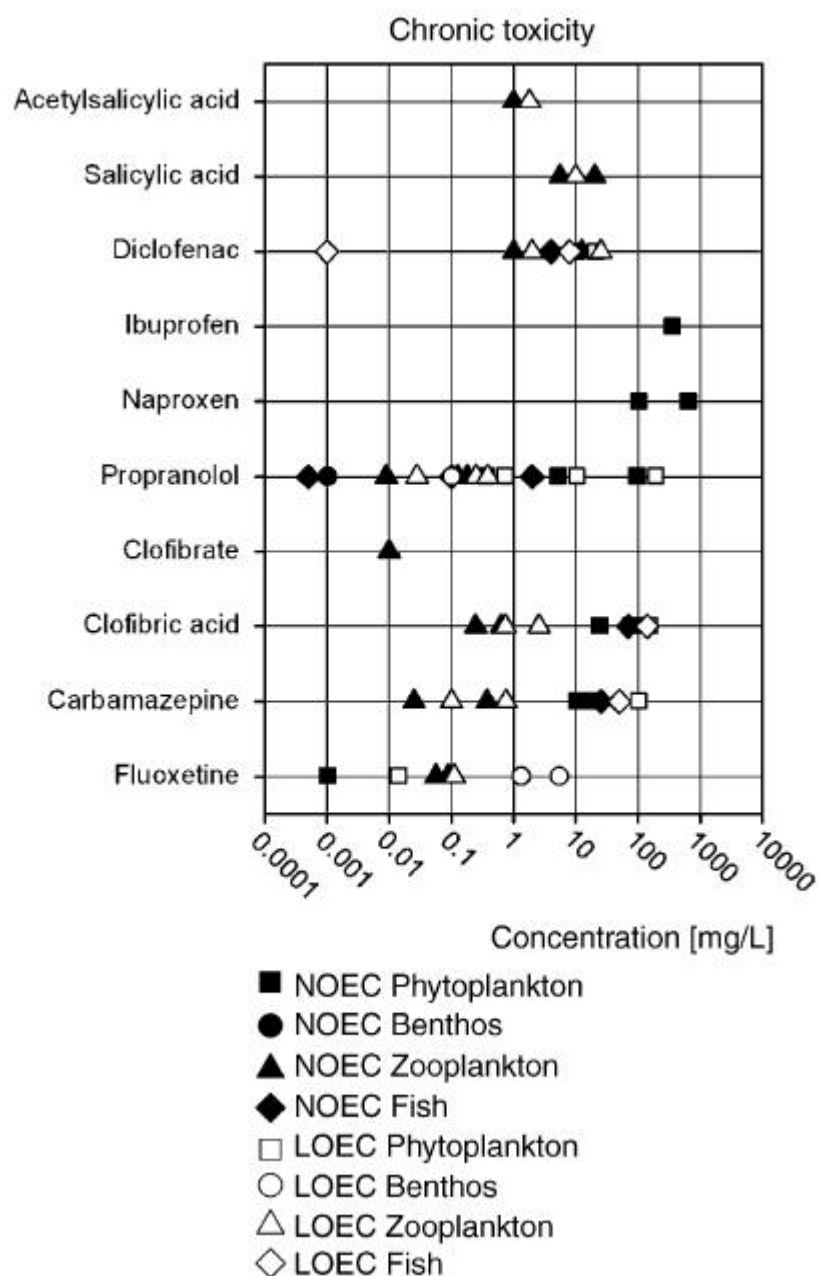
Mediante tali test generalmente si giunge alla conclusione che i farmaci non causino tossicità acuta nei confronti degli organismi acquatici, in quanto i valori di EC<sub>50</sub> risultano molto più alti rispetto alle concentrazioni che effettivamente si trovano in ambiente (Fig. 1.5).



**Fig. 1.5.** Tossicità acuta per diversi farmaci nei confronti di differenti organismi acquatici (Fent et al., 2006).

Nei siti contaminati, le specie acquatiche sono esposte a tali composti per lunghi periodi di tempo o addirittura per il loro intero ciclo vitale. Saggi di tossicità cronici sono quindi più indicati per valutare i potenziali danni arrecati agli organismi. Tuttavia, solo pochi farmaci sono stati analizzati mediante test cronici e perlopiù nel modo tradizionale seguendo le linee guida, utilizzando un piccolo set di organismi, che spesso non sono abbastanza sensibili (Fent et al., 2006).

I dati di tossicità cronica (NOEC e LOEC) risultano generalmente più bassi rispetto ai valori di tossicità acuta, e indicano quindi una certa pericolosità per molti farmaci (Fig. 1.6).



**Fig. 1.6.** Tossicità cronica per diversi farmaci nei confronti di differenti organismi acquatici (Fent et al., 2006).

La carenza di dati di tossicità cronica rende necessaria l'adozione di ulteriori test più mirati, con un approccio focalizzato sul meccanismo di azione del farmaco su molecole, tessuti e organi target (Fent et al., 2006).

I test di ecotossicità sono usati all'interno del procedimento di *Environmental Risk Assessment* (ERA). Negli ultimi anni diverse istituzioni internazionali si sono dedicate allo studio del rischio ambientale posto da farmaci ad uso umano e veterinario: la *European Medicines Agency* (EMA) ha pubblicato linee guida a questo scopo (EMA/CHMP, 2006 – EMA/CVMP, 2008). Inoltre le procedure di ERA per i farmaci veterinari sono armonizzate

tra Unione Europea, USA e Giappone (VICH, 2000 – VICH, 2005). Secondo tali linee guida la valutazione dei potenziali rischi per l'ambiente è un processo graduale che prevede diversi *step*; l'ERA infatti inizia con un valutazione dell'esposizione ambientale al farmaco (Fase I) e, a parte alcune eccezioni, i test di tossicità (Fase II) sono richiesti solo quando vengono superati valori soglia di esposizione, i cosiddetti "limiti di azione".

I farmaci ad uso umano entrano nell'ambiente prevalentemente attraverso le acque superficiali, perciò il limite di azione è ristretto a questo comparto. Viene calcolata la concentrazione ambientale prevista (*Predicted Environmental Concentration*, PEC) a partire dalla dose quotidiana del farmaco, valori di produzione di acque reflue per abitante, vendite stimate del farmaco (non vengono considerati fattori come il metabolismo o la biodegradazione nell'impianto di trattamento dei reflui). Se la  $PEC_{\text{acque superficiali}}$  è inferiore a 10 ng/L, il farmaco non subisce i test della Fase II. Alle sostanze che influiscono sulla riproduzione anche a concentrazioni minori di 10 ng/L non viene applicato il limite di azione (EMEA/CHMP, 2006).

Per i farmaci ad uso veterinario vengono considerati sia il comparto terrestre che quello acquatico. Il calcolo delle concentrazioni ambientali si basa sul dosaggio di trattamento e su valori legati alle pratiche agricole. Non sono necessarie analisi di tossicità (Fase II) per i farmaci usati per trattare animali terrestri se la  $PEC_{\text{suolo}}$  è inferiore a 100 µg/kg d.w. di suolo. Passano direttamente alla Fase II gli antiparassitari usati per gli animali pascolatori.

Per i farmaci usati nell'acquacoltura non è richiesta la valutazione di Fase II se la concentrazione stimata nell'effluente rilasciato dall'impianto di acquacoltura (la cosiddetta *Environmental Introduction Concentration*, EIC) è inferiore a 1 µg/L. Il limite di azione non si applica agli antiparassitari (EMEA/CVMP, 2008).

I limiti di azione sono basati su due *review* di dati ecotossicologici presentate alla US Food and Drug Administration (USFDA), una contenente principalmente dati di tossicità acquatica (CDER/USFDA, 1997), l'altra di tossicità terrestre (AHI, 1997).

Vari autori sostengono che la presenza del limite di azione impedisca di verificare gli effetti di alcune sostanze che potrebbero essere potenzialmente pericolose: Schmitt et al. per esempio suggeriscono di introdurre delle clausole, ovvero di identificare delle proprietà dei farmaci che forniscano ragioni per procedere alla Fase II anche se non vengono superate le concentrazioni del limite di azione (Schmitt et al., 2010). Le proprietà scelte sono le seguenti:

1. persistenza del farmaco in ambiente;
2. potenziale di bioaccumulo del farmaco;
3. carginogenicità, mutagenicità e tossicità per la riproduzione (farmaco CMR);

4. modalità di azione del farmaco (identificazione dei target molecolari, conservati o meno tra diversi organismi);
5. somiglianza strutturale del farmaco con altre sostanze di cui sia nota la tossicità;
6. potenza del farmaco;
7. margine terapeutico di sicurezza del farmaco (differenza tra la concentrazione che causa effetti collaterali e quella che ottiene l'effetto desiderato);
8. farmaco appartenente a una nuova classe terapeutica.

Inoltre gli stessi autori raccomandano miglioramenti alla fase di valutazione della tossicità, come la scelta di test e *endpoint* basati sulla modalità di azione del farmaco e sugli effetti collaterali visti nei mammiferi, test che valutino gli effetti sulla riproduzione, sulle prime fasi di sviluppo, gli effetti multigenerazionali, gli effetti a livello di popolazione, o l'introduzione di ulteriori specie da sottoporre a test, ad esempio molluschi e piante acquatiche (Schmitt et al., 2010). I laboratori di ricerca che si occupano di questi aspetti, tuttavia, hanno ribadito come necessaria l'adozione di test più mirati, con un approccio focalizzato sul meccanismo di azione del farmaco su molecole, tessuti e organi target (Christen et al., 2010) e sui *biomarker*, indici molto più sensibili rispetto ai test di ecotossicità, come ben dimostrato da alcuni autori (Schmidt et al., 2011; Aguirre-Martinez et al., 2015).

## 1.2 Propranololo

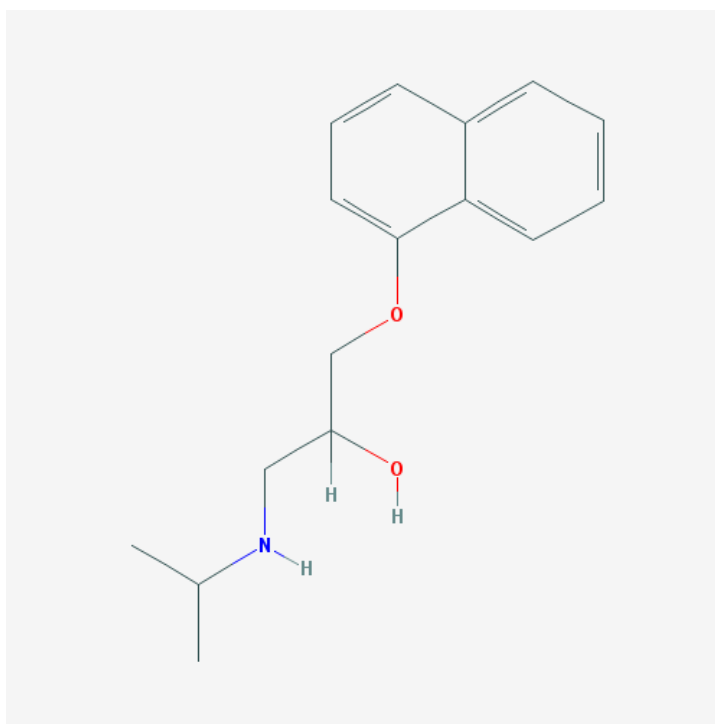
I beta-bloccanti agiscono bloccando in modo competitivo i recettori beta-adrenergici e sono usati nel trattamento dell'ipertensione arteriosa, delle aritmie e di altre patologie cardiache. Il sistema adrenergico è coinvolto in diverse funzioni fisiologiche, come la regolazione dell'apporto di ossigeno al cuore, della frequenza cardiaca, dei meccanismi di vasodilatazione dei vasi sanguigni e della broncodilatazione. Inoltre il sistema adrenergico interagisce con il metabolismo di carboidrati e lipidi.

I recettori  $\beta$ -adrenergici sono formati da 7 proteine transmembrana e sono accoppiati a proteine Gs che, attivate, stimolano l'enzima adenilato ciclasi, aumentando la sintesi del secondo messaggero cAMP. Alcuni  $\beta$ -bloccanti possono selettivamente inibire uno o più tipi di  $\beta$ -recettori (Franzellitti et al., 2011).

Tra i  $\beta$ -bloccanti più comunemente usati il propranololo (Fig. 1.7) è un inibitore non selettivo dei recettori  $\beta$ -adrenergici, bloccando sia i recettori  $\beta_1$  che i recettori  $\beta_2$  (Santos et al., 2010).

Inoltre il propranololo è un efficace antagonista dei recettori della serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT) (Tierney, 2001).

Il propranololo è ampiamente individuato negli ambienti acquatici: le concentrazioni massime riportate sono di 56 ng/L negli estuari (Thomas & Hilton, 2004), 590 ng/L nei fiumi (Ashton et al., 2004), 1900 ng/L negli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue (Huggett et al., 2002) e 6500 ng/L negli effluenti ospedalieri (Santos et al., 2010).



**Fig. 1.7.** Struttura molecolare del propranololo (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Per quanto riguarda il possibile effetto del propranololo sugli organismi acquatici, è noto che i pesci, come altri vertebrati, possiedono recettori  $\beta$ -adrenergici nel cuore, nel fegato e nel sistema riproduttivo, pertanto l'esposizione prolungata al propranololo (e, più in generale, ai beta-bloccanti) può causare effetti deleteri (Santos et al., 2010).

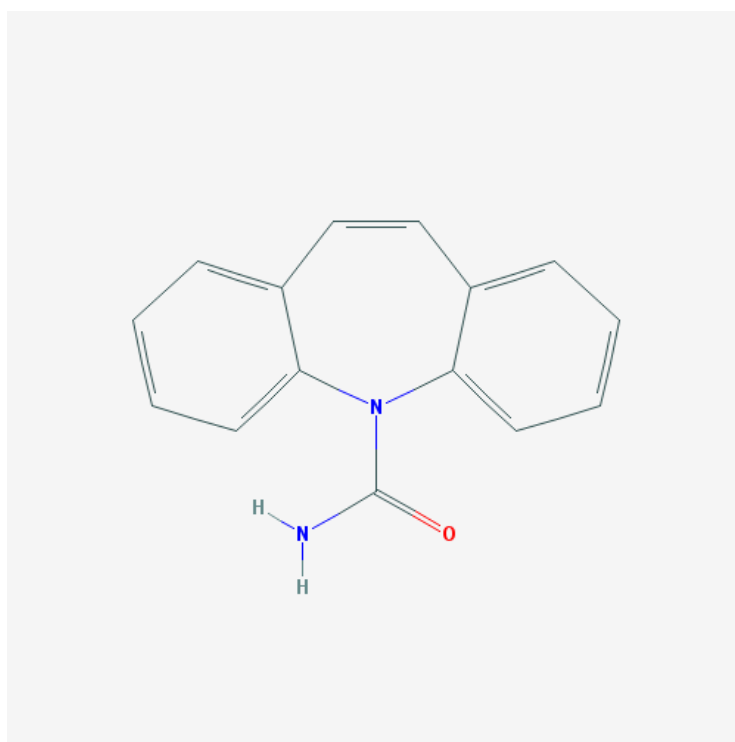
In contrasto con quanto riportato da Santos et al. (2010), che escludono la presenza di recettori adrenergici negli invertebrati, recettori sia di tipo  $\alpha$  che di tipo  $\beta$  sono stati individuati in tutti i tessuti di bivalvi studiati fino ad ora (Fabbri & Capuzzo, 2010). Alcuni studi, condotti su diverse specie di bivalvi, hanno evidenziato che il legame recettore  $\beta$ -ligando fa aumentare le concentrazioni di cAMP (Dailianis et al., 2005 - Koutsogiannaki et al., 2006 - Lacoste et al., 2001 - Shpakov et al., 2005).

Alcuni bivalvi possiedono un recettore della serotonina (5-HT) strutturalmente omologo al recettore 5-HT<sub>1</sub> dei mammiferi ma con un'attività farmacologica mista 5-HT<sub>1</sub>/5HT<sub>2</sub>

(Tierney, 2001). I più recenti studi riportano che il recettore 5-HT (parzialmente sequenziato) proveniente dalle gonadi di *Mytilus edulis* è omologo al sottogruppo 5-HT1 dei mammiferi (Cubero-Leon et al., 2010). Tale sottogruppo è accoppiato con i meccanismi di trasduzione del segnale mediato da cAMP, ma in modo inibitorio. Il propranololo agisce anche come antagonista del recettore 5-HT1 (Tierney, 2001).

### 1.3 Carbamazepina

La carbamazepina (Fig. 1.8) è un farmaco anticonvulsivante e stabilizzatore dell'umore usato principalmente nel trattamento dell'epilessia, del disturbo bipolare e delle nevralgie del trigemino (Garcia-Morales et al., 2007).



**Fig. 1.8.** Struttura molecolare della carbamazepina (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

I meccanismi farmacologici attraverso cui la carbamazepina esercita i suoi effetti terapeutici non sono ancora del tutto chiari, anche se le basi molecolari di azione sono attribuite al blocco dei canali voltaggio-dipendenti del Na<sup>+</sup>: in questo modo l'eccitabilità neuronale viene ridotta. La carbamazepina induce parte dei suoi effetti terapeutici interagendo con il sistema

dell'adenilato ciclasi e riducendo i livelli intracellulari di cAMP, come si verifica nel cervello dei mammiferi (Chen et al., 1996 - Montezinho et al., 2007).

Martin-Diaz et al. (2009), rifacendosi alla considerazione che i meccanismi molecolari sono spesso simili e conservati tra le varie specie, hanno misurato i livelli intracellulari di cAMP e l'attività della PKA in diversi tessuti di mitilo *Mytilus galloprovincialis* dopo l'esposizione a carbamazepina: i livelli di cAMP e l'attività della PKA sono risultati ridotti, a indicare che lo specifico target molecolare della carbamazepina trovato nei mammiferi è conservato anche nei mitili, i quali possono quindi subire effetti in seguito all'esposizione a tale farmaco in ambiente acquatico (Martin-Diaz et al., 2009); si sa infatti che il cAMP regola diverse funzioni nei molluschi (Fabbri & Capuzzo, 2010 - Valbonesi et al., 2004), tra cui la disponibilità del glicogeno del mantello come riserva di energia per la maturazione delle gonadi (Diaz-Enrich et al., 2003).

Gli studi indicano che la carbamazepina è persistente quando viene rilasciata in ambiente e l'efficienza media di rimozione da parte degli impianti di trattamento delle acque reflue è inferiore al 10% (Zhang et al., 2008). La concentrazione massima riportata nelle acque reflue è di 6,3 µg/L, mentre negli effluenti degli impianti di trattamento sono state misurate concentrazioni medie fino a 2,3 µg/L; per le acque superficiali sono stati trovati valori compresi nell'intervallo 0,1 – 1 µg/L; le concentrazioni massime per le acque sotterranee e per le acque potabili sono risultate rispettivamente di 1,1 µg/L e 0,03 µg/L (Fent et al., 2006).

## **1.4 Il biomonitoraggio e i bioindicatori**

Il problema dell'inquinamento ambientale è stato per anni affrontato valutando il tipo, la quantità e, in taluni casi, la tossicità teorica dei singoli composti chimici. Tuttavia questo approccio presenta alcune difficoltà:

- il composto può non essere conosciuto (nome, formula chimica, origine, grado di pericolosità...), quindi le analisi chimiche si concentrano solo sulle sostanze di cui si hanno già informazioni;
- in ambiente il composto di partenza può subire trasformazioni non sempre prevedibili;
- le analisi chimiche non forniscono informazioni sulla reale biodisponibilità del composto (se una sostanza non è biodisponibile, essa non risulta dannosa per l'organismo);



- lo studio di singoli composti non rende conto dei possibili effetti sinergici tra contaminanti.

Per questi motivi negli ultimi decenni si sono andate sempre più diffondendo e sviluppando pratiche di biomonitoraggio, inteso come il monitoraggio dell'inquinamento mediante organismi viventi. Le principali tecniche di biomonitoraggio consistono nell'uso di organismi bioaccumulatori (organismi in grado di sopravvivere in presenza di inquinanti, che vengono accumulati nei tessuti) e di organismi bioindicatori. Secondo Iserentant e De Sloover (1976) un bioindicatore è un "organismo o un sistema biologico usato per valutare una modificazione, generalmente degenerativa, della qualità dell'ambiente, qualunque sia il suo livello di organizzazione e l'uso che se ne fa. Secondo i casi, il bioindicatore potrà essere una comunità, un gruppo di specie con comportamento analogo (gruppo ecologico), una specie particolarmente sensibile (specie indicatrice), oppure una porzione di organismo, come organi, tessuti, cellule, o anche una soluzione di estratti enzimatici" (Iserentant & De Sloover, 1976). Una definizione più recente è quella di Bargagli et al. (1998), secondo i quali i bioindicatori sono "tutti gli 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). In altre parole, un bioindicatore è un bersaglio biologico che, in presenza di uno stress naturale o antropico, subisce variazioni rilevabili del proprio stato naturale.

Gli organismi bioindicatori e bioaccumulatori (organismi sentinella) devono possedere le seguenti caratteristiche:

- optimum ecologico ed ampia distribuzione nell'area di studio;
- facile identificazione sistematica;
- adeguate conoscenze sull'anatomia, fisiologia ed ecologia della specie;
- facilità nel reperimento, nel trasporto e nell'utilizzo;
- sensibilità ai contaminanti, ma non tale da precluderne la sopravvivenza;
- ciclo vitale lungo;
- notevole resistenza agli stress naturali;
- sessilità o scarsa mobilità.

#### **1.4.1 Biomarker**

Una delle prime definizioni di *biomarker* o biomarcatore fu formulata nel 1989 dal National Research Council, che descrive il *biomarker* come "quella variazione, indotta da un

contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura o di una funzione, che può essere misurata in un sistema biologico” (NRC, 1989).

Depledge definisce il *biomarker* “quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell’intero organismo (individuo o popolazione), la quale fornisce l’evidenza di un’esposizione e/o un effetto ad uno o più composti inquinanti (e/o radiazioni)” (Depledge, 1989).

In altri termini un *biomarker* consiste in una risposta biologica innescata dalla presenza di stimoli stressori, misurabile in maniera ripetibile e relativamente semplice.

Hahn (2002) propone di suddividere i *biomarker* in due categorie: *biomarker* di esposizione e *biomarker* di effetto. I *biomarker* di esposizione sono tutte quelle risposte di un organismo che indicano l’esposizione ad un composto chimico o ad una classe di composti chimici, ma non forniscono indicazioni sui reali effetti tossicologici. I *biomarker* di effetto sono invece tutte quelle risposte di un organismo, ai diversi livelli di complessità strutturale, che indicano sia l’esposizione ad un composto tossico che il suo effetto tossicologico (Hahn, 2002).

Esempi di *biomarker* generalmente utilizzati sono alterazioni istopatologiche (stabilità delle membrane lisosomiali, accumulo di lipidi neutri, accumulo di lipofuscine), alterazioni del sistema immunitario (attività fagocitica dei macrofagi, mobilità e forma dei leucociti), variazioni nell’attività di enzimi o altre proteine (enzimi antiossidanti, metallotioneine, proteine MXR, acetilcolinesterasi), danni al DNA (addotti, frammentazioni, micronuclei)...

Negli ultimi anni il campo dei *biomarker* si sta ampliando verso approcci di biologia molecolare, che includono la valutazione di cambiamenti nei processi di segnalazione cellulare (come il sistema adenilato ciclasti/cAMP), o la quantificazione dell’espressione di geni rilevanti dal punto di vista tossicologico, utilizzando tecniche come la PCR Real-Time o i *microarray* di DNA (Viarengo et al., 2007).

Uno dei principi fondamentali su cui si basa l’approccio metodologico dell’uso dei *biomarker* consiste nel fatto che, in linea generale, la tossicità di un contaminante prima di esercitare a livello biochimico e molecolare, e solo successivamente gli effetti si possono riscontrare, con un meccanismo a cascata, ai livelli successivi dell’organizzazione gerarchica (organello, cellula, tessuto, organismo, popolazione, comunità) (Depledge & Fossi, 1994), permettendo quindi di individuare precocemente (“*early warning*”) una possibile situazione ambientale critica prima che vengano indotti effetti irreparabili sulla biodiversità.

I *biomarker* possono essere utilizzati sia in studi di biomonitoraggio passivo, confrontando le risposte evidenziate in organismi campionati in un’area contaminata e in un’area di

riferimento, sia in studi di tipo attivo, con il trasferimento di bioindicatori in un'area di studio. Inoltre i *biomarker* vengono anche utilizzati in saggi di laboratorio *in vitro* o *in vivo*, esponendo i bioindicatori a condizioni controllate (Losso & Volpi Ghirardini, 2010).

I principali vantaggi dell'uso dei *biomarker* sono i seguenti:

- forniscono informazioni precoci sull'esposizione ai contaminanti (come già precedentemente riportato);
- identificano gli effetti sinergici di più contaminanti;
- segnalano l'inquinamento anche se la causa non è più presente;
- misurano risposte più sensibili rispetto ad altri metodi di saggio biologico.

Questi invece sono i maggiori svantaggi:

- le risposte evidenziate possono essere influenzate da fattori fisico-chimici naturali (ad esempio le variazioni di temperatura) o da caratteristiche dell'organismo, come età, sesso, stato riproduttivo...
- la variabilità tra gli individui può essere elevata.

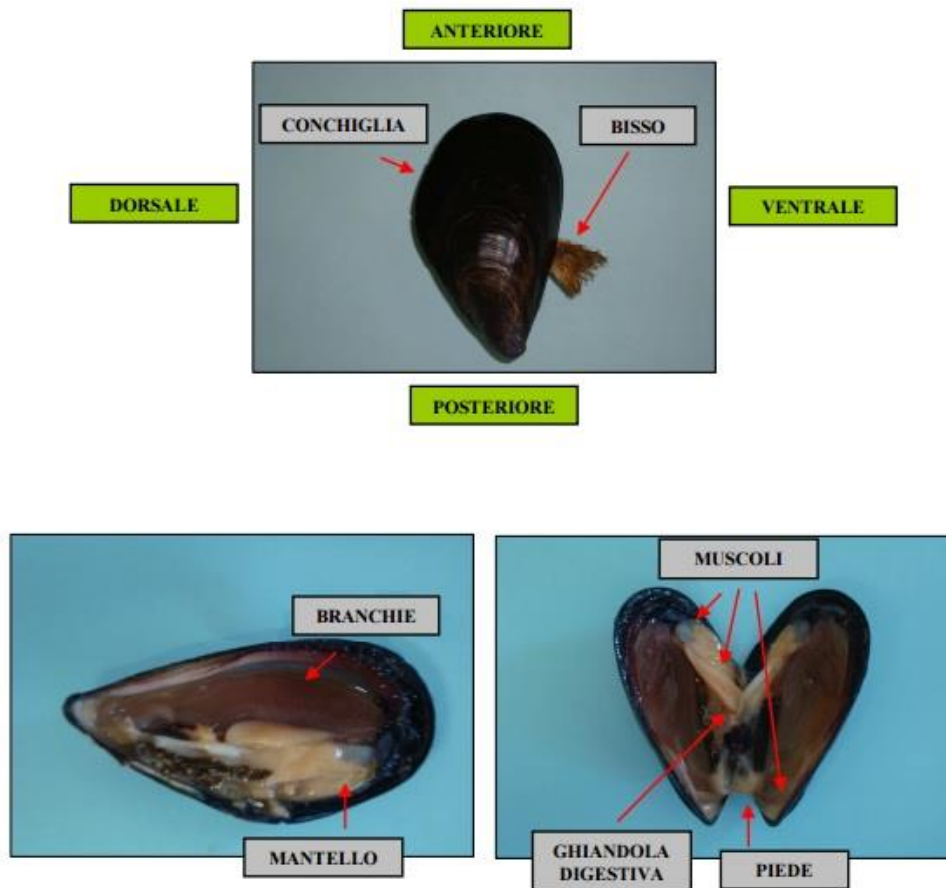
Per minimizzare questi limiti è importante usare una batteria di *biomarker*, avere una buona conoscenza della fisiologia, biochimica, morfologia...dei bioindicatori, scegliere correttamente le specie sentinella.

## 1.5 L'organismo sentinella utilizzato: *Mytilus galloprovincialis*

Il mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) appartiene alla Classe Bivalvia, all'interno del Phylum Mollusca (Tabella 1.1, Fig. 1.9).

**Tabella 1.1.** Classificazione scientifica del *Mytilus galloprovincialis*.

|                 |                                  |
|-----------------|----------------------------------|
| <b>Regno</b>    | Animalia                         |
| <b>Phylum</b>   | Mollusca                         |
| <b>Classe</b>   | Bivalvia                         |
| <b>Ordine</b>   | Mytiloida                        |
| <b>Famiglia</b> | Mytilidae                        |
| <b>Genere</b>   | <i>Mytilus</i>                   |
| <b>Specie</b>   | <i>Mytilus galloprovincialis</i> |



**Fig. 1.9.** Anatomia di *Mytilus galloprovincialis* (www.izsum.it).

### 1.5.1 Aspetti morfologici e funzionali

La conchiglia dei bivalvi è composta da due valve unite da una cerniera e da un legamento elastico. I muscoli adduttori tengono le valve insieme e la distensione del legamento e la contrazione di questi muscoli aprono e chiudono la conchiglia, rispettivamente. Nei mitili le due valve sono simili come dimensioni e approssimativamente di forma triangolare.

Nei bivalvi il mantello, o pallio, è costituito da due lobi di tessuto che circondano completamente l'animale all'interno della conchiglia. Il mantello consiste di tessuto connettivo con vasi emolinfatici, nervi e muscoli che sono particolarmente sviluppati vicino ai margini. Le ciglia nella superficie interna del mantello svolgono un importante ruolo in quanto dirigono le particelle verso le branchie.

Tra il mantello e la conchiglia si trova la cavità palleale, dove si riversano le urine, i gameti e hanno posto gli organi addetti alla respirazione.

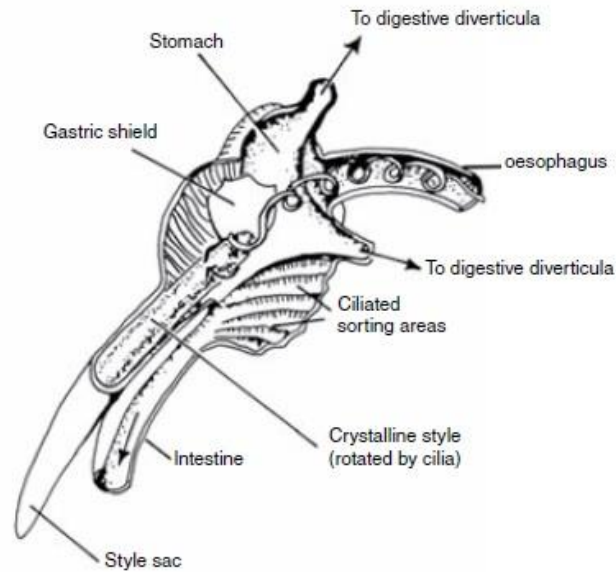
Nei mitili il mantello contiene le gonadi. I gameti proliferano all'interno del mantello e vengono portati attraverso canali ciliati a gonodotti che li scaricano nella cavità palleale. Il mantello non è solo sede della gametogenesi ma è anche il sito principale per l'immagazzinamento di riserve nutritive, specialmente glicogeno.

Il mantello cambia colore ed aspetto in dipendenza dello stadio di maturità sessuale del mitilo: da bianco-giallastro tipico del periodo di inattività sessuale, a giallo-crema nei maschi e rosso-arancio nelle femmine durante la maturità sessuale quando avviene l'emissione di gameti.

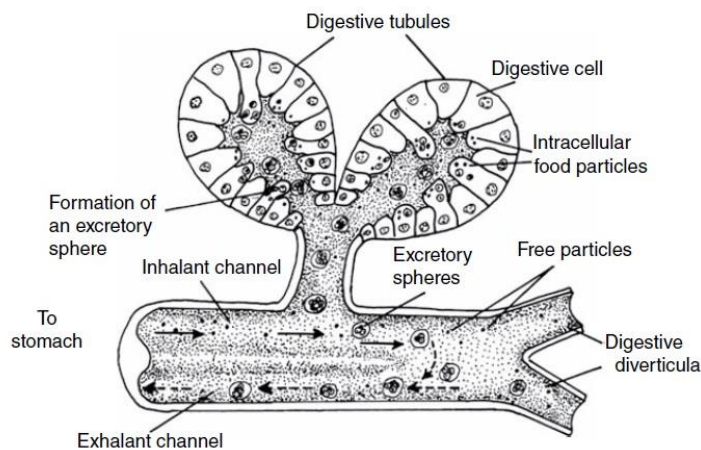
I lamellibranchi sono dotati di branchie a lamelle che assorbono ossigeno per la respirazione e che trattengono contemporaneamente le particelle alimentari. L'ampia area superficiale delle branchie e la ricca presenza di vasi emolinfatici le rende molto adatte per gli scambi gassosi. Le branchie sono situate a destra e a sinistra del corpo e tra la massa viscerale e il mantello. Sono formate da filamenti che si ripiegano su se stessi e rivestiti da un epitelio ciliato: le ciglia sono importanti per mantenere la corretta circolazione dell'acqua attraverso la branchia. L'alimentazione dei molluschi bivalvi è microfaga, a base di fitoplancton e particellato organico in sospensione. Le branchie trattengono le particelle alimentari e le avvolgono in cordoni mucosi. Ogni branchia termina all'interno di una coppia di palpi triangolari situati su entrambi i lati della bocca; la funzione principale dei palpi labiali è quella di rimuovere continuamente materiale dalle branchie, per prevenire la saturazione.

L'apparato digerente inizia con una bocca ciliata priva di radula e continua in uno stretto esofago, anch'esso ciliato: il movimento delle ciglia aiuta a spingere il materiale verso lo stomaco. Quest'ultimo è ampio, di forma ovale e contiene lo stilo cristallino, una formazione bastoncellare traslucida e gelatinosa che va a poggiarsi su uno scudo gastrico, un'area ispessita della parete dello stomaco. L'estremità anteriore dello stilo viene fatto ruotare da ciglia contro lo scudo gastrico, liberando così enzimi atti alla digestione dei carboidrati. In questo processo rotatorio l'estremità dello stilo si consuma per sfregamento, ma viene continuamente riformata. Lo stilo possiede anche altre funzioni: la sua rotazione macina le particelle alimentari e favorisce il loro mescolamento con gli enzimi (Fig. 1.10).

La ghiandola digestiva, o epatopancreas, è il maggior sito di digestione intracellulare e consiste di tubuli ciechi connessi allo stomaco mediante diversi canali ciliati. All'interno di questi canali c'è un continuo flusso bidirezionale: materiali entrano nella ghiandola per la digestione intracellulare e l'assorbimento e i "rifiuti" si muovono verso lo stomaco e l'intestino, dove possono subire ulteriori processi di digestione (Fig. 1.11).



**Fig. 1.10.** Stomaco di un bivalve con lo stilo cristallino (Gosling, 2015).



**Fig. 1.11.** Sezione di una ghiandola digestiva (Gosling, 2015).

L'intestino è relativamente lungo, più o meno ripiegato su se stesso, ed è anch'esso ciliato; attraversa il ventricolo cardiaco, prolungandosi fino al retto per sboccare poi nell'ano.

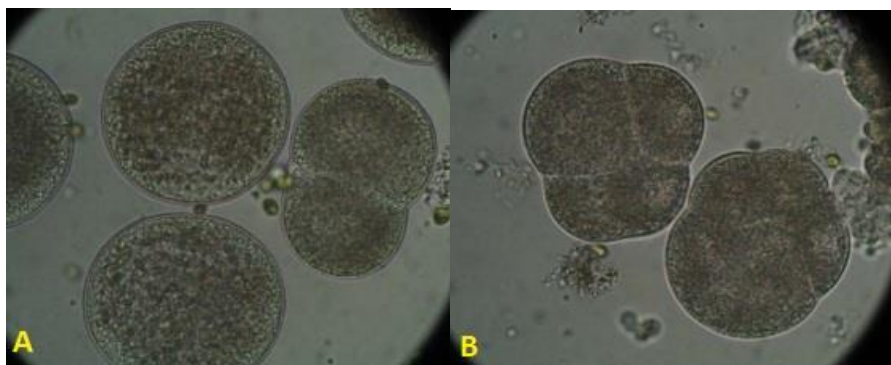
Il piede, struttura muscolare che, a partire dalla massa viscerale, si estende fuoriuscendo all'esterno, nei bivalvi (quando è presente) si conforma perlopiù in una struttura allargata e compressa lateralmente simile alla lama di una scure e serve all'animale soprattutto per scavare sul fondale o per ancorarsi al substrato. Nei mitili il piede è provvisto di una ghiandola che secerne il bisso, una sostanza proteica che a contatto con l'acqua solidifica in lunghi filamenti che permettono l'ancoraggio.

Per quanto concerne la riproduzione, in *Mytilus galloprovincialis* i sessi sono separati e le gonadi si sviluppano all'interno del mantello. Le gonadi non sufficientemente mature mostrano un aspetto assottigliato e quasi trasparente; quelle mature invece sono molto più sviluppate (Fig. 1.12). Non vi è copulazione: sperma e cellule uovo vengono emessi in acqua e la fecondazione è quindi esterna.



**Fig. 1.12.** Confronto tra gonade immatura (a sinistra) e gonade matura (a destra) in *Mytilus galloprovincialis* ([www.arpa.emr.it](http://www.arpa.emr.it)).

L'uovo fertilizzato si divide rapidamente (Fig. 1.13) fino a formare una larva trocofora ciliata circa 24 ore dopo la fecondazione (Fig. 1.14). Circa 48 ore dopo la fecondazione la larva raggiunge lo stadio veliger, grossolanamente a forma di lettera D (Fig. 1.15, Fig. 1.16).



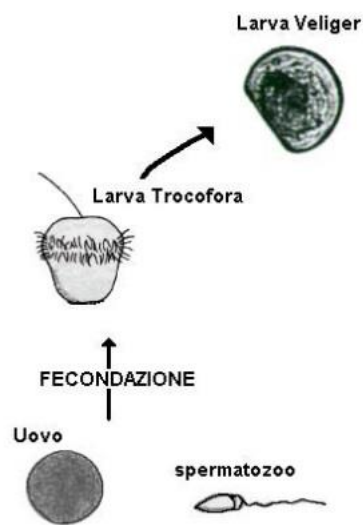
**Fig. 1.13.** Divisioni cellulari dell'uovo fecondato di *Mytilus galloprovincialis*. A: prima divisione, stadio a 2 cellule; B: seconda e terza divisione, stadi a 4 e 8 cellule ([www.arpa.emr.it](http://www.arpa.emr.it)).



**Fig. 1.14.** Larva trocofora di *Mytilus galloprovincialis* (www.arpa.emr.it).



**Fig. 1.15.** Larva veliger di *Mytilus galloprovincialis* (www.arpa.emr.it).



**Fig. 1.16.** Schema riassuntivo dello sviluppo larvale di *Mytilus galloprovincialis* (www.arpa.emr.it).



Il cuore dei bivalvi si trova nella regione medio-dorsale del corpo; è rivestito dal pericardio ed è formato da un ventricolo (attraversato dall'intestino) e da due atri. L'emolinfa fluisce dalle branchie agli atri e da questi nel ventricolo, che si contrae per spingere l'emolinfa in un singolo vaso, l'aorta anteriore. Quest'ultima si divide in molte arterie, le quali a loro volta si separano in una rete di vasi in tutti i tessuti. L'emolinfa si distribuisce tra i tessuti, all'interno di seni o lacune, e poi si raccoglie nuovamente in vasi che dagli organi riportano l'emolinfa alle branchie. Il sistema circolatorio è aperto, ossia l'emolinfa stravasa e inonda i tessuti. L'emolinfa svolge ruoli importanti nella fisiologia dei bivalvi, come lo scambio di gas, l'osmoregolazione, la distribuzione dei nutrienti, l'eliminazione delle sostanze di scarto e la difesa interna. Contiene cellule chiamate emociti che galleggiano in un plasma incolore.

I bivalvi presentano due reni disposti sotto al pericardio e in essi avviene la filtrazione dell'emolinfa. Il filtrato finisce nella cavità palleale e da lì all'esterno.

Il sistema nervoso dei bivalvi è fondamentalmente semplice; ha simmetria bilaterale e consiste di tre paia di gangli: cerebrali, viscerali e pedali. I gangli cerebrali innervano i palpi, il muscolo adduttore anteriore e parte del mantello. I gangli viscerali controllano un'ampia regione: branchie, cuore, pericardio, reni, tratto digerente, gonadi, muscolo adduttore posteriore, parte del mantello, sifoni. I gangli pedali controllano il piede. I gangli hanno anche un ruolo neurosecretorio. Nei mitili sono state identificati molti tipi di cellule neurosecretrici e la maggior parte di esse è localizzata nei gangli cerebrali. Queste cellule producono peptidi che vengono rilasciati nel sistema circolatorio.

Gli organi di senso dei bivalvi sono poco sviluppati; si trovano organi tattili disposti particolarmente lungo i margini del mantello, dove vi sono anche gli organi visivi, rappresentati da semplici cellule, oppure da organi più complessi (macchie oculari), che sono sensibili alle variazioni di intensità della luce, ma probabilmente non formano immagini. Altri organi di senso che possono talora essere presenti sono gli osfradi (funzione olfattoria o gustativa) in corrispondenza delle branchie e un paio di statocisti (recettori di senso statico) in corrispondenza del ganglio pedale (Gosling, 2015).

### **1.5.2 *Mytilus galloprovincialis* come organismo sentinella**

Per questo lavoro di tesi è stato scelto *Mytilus galloprovincialis* perché la sua fisiologia è conosciuta relativamente bene, è un organismo sessile e filtratore, è sensibile ai contaminanti ambientali e attua risposte misurabili, tollera bene i cambiamenti dei parametri biotici e

abiotici a cui è esposto (ad esempio variazioni di temperatura e salinità). Vive all'interfaccia acqua-sedimento e filtra grandi volumi d'acqua, tra cui materiali sospesi e colloidali.

Per questi motivi i mitili sono ampiamente utilizzati come organismi sentinella nei programmi di biomonitoraggio ambientale a livello internazionale (UNEP, RA.MO.GE, BEEP...) (Viarengo et al., 2007).

### **1.5.3 Saggio ecotossicologico con embrioni e larve di molluschi bivalvi**

La sensibilità e la rapidità di risposta degli stadi larvali ed embrionali dei molluschi bivalvi come bioindicatori da usare in saggi di tossicità è ampiamente riconosciuta a livello internazionale (ASTM, 2004).

Nel saggio ecotossicologico con embrioni e larve di bivalvi la valutazione della tossicità degli inquinanti è basata sulla percentuale di larve veliger anormali (ovvero con malformazioni o ritardi nello sviluppo) trovate dopo la fertilizzazione delle uova e la successiva incubazione nell'acqua sotto investigazione per un certo periodo di tempo (24-48 ore, a seconda della specie impiegata). Durante tale periodo infatti l'organismo si trova in una fase particolarmente delicata dello sviluppo poiché si verificano importanti modificazioni fisiologiche che portano alla formazione del veliger e l'eventuale contatto con sostanze tossiche potrebbe provocare la morte, il rallentamento dello sviluppo o uno sviluppo non corretto delle larve (Brunelli et al., 2004).

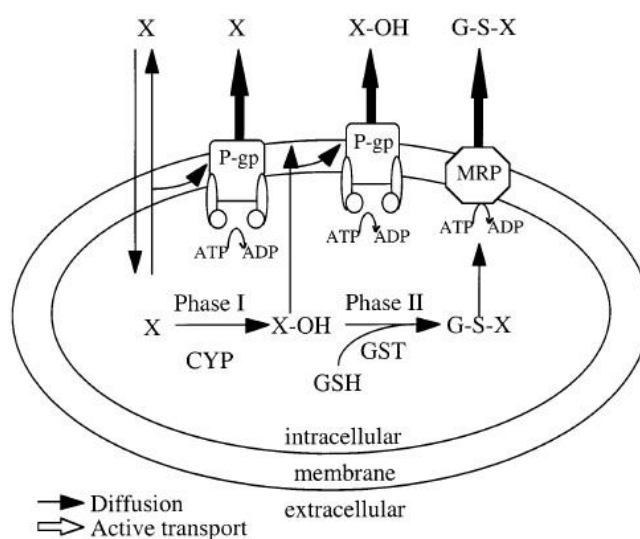
## **1.6 La *Multixenobiotic Resistance***

Il metabolismo delle sostanze tossiche coinvolge diversi meccanismi, tra cui l'escrezione dalla cellula attraverso proteine di trasporto, fenomeno noto con il nome di *Multidrug Resistance* (MDR), osservato per la prima volta nelle cellule tumorali e riconosciuto come il processo responsabile della resistenza di tali cellule nei confronti dei farmaci citostatici. Juliano e Ling nel 1976 identificarono la P-glicoproteina (P-gp) come la maggiore causa di questo meccanismo (Juliano & Ling, 1976).

P-gp è solo una delle proteine della superfamiglia *ATP-binding cassette* (ABC); tali proteine trasportano attivamente (tramite il legame e la successiva idrolisi di ATP, necessari per il movimento dei substrati), attraverso le membrane biologiche, un'ampia quantità di composti, tra cui fosfolipidi, ioni, peptidi, steroidi, polisaccaridi, amminoacidi, farmaci e altri

xenobiotici, permettendo così di diminuire la loro concentrazione intracellulare (Klein et al, 1999).

I trasportatori ABC, pompando fuori dalla cellula le sostanze tossiche, costituiscono una prima linea di difesa. La biotrasformazione operata da certi enzimi rappresenta un secondo livello di difesa: il metabolismo di fase I dà origine a piccoli cambiamenti nella natura chimica della molecola tossica (come l'introduzione di gruppi polari da parte del CYP450) e la rende più idrofila, mentre il metabolismo di fase II catalizza reazioni di coniugazione con glutazione, solfato o acido glucuronico. Le proteine ABC possono poi trasportare fuori dalla cellula le sostanze metabolizzate, andando a costituire quella che viene chiamata fase III (Fig. 1.17) (Luckenbach et al., 2014).



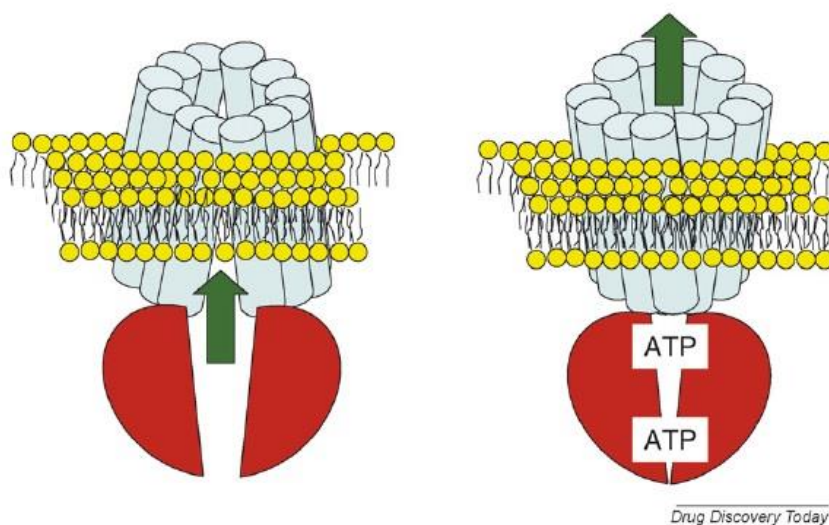
**Fig 1.17.** Rappresentazione schematica delle varie fasi del metabolismo delle sostanze tossiche (Bard, 2000).

La superfamiglia dei trasportatori ABC è evolutivamente conservata ed è presente praticamente in tutti gli organismi viventi, dai procarioti ai mammiferi. Il genoma umano codifica 48 proteine, divise in sette sottofamiglie caratterizzate da un elevato grado di omologia di sequenza e designate ABCA, ABCB, ABCC...ABCG. Il nome sistematico per un trasportatore ABC consiste nel nome della sottofamiglia seguito da un numero, che denota la proteina (es. ABCB1, ABCC1...) (Luckenbach et al., 2014).

Le ABC sono proteine di membrana costituite da una combinazione di domini caratteristici, incluse regioni citoplasmatiche di legame all'ATP (*Nucleotide binding domain*, NBD) e regioni elicoidali che attraversano membrana (*Membrane spanning domain*, MSD). Il dominio NBD è in genere un'unità proteica globulare costituita da 200 – 250 amminoacidi,

mentre i domini transmembrana MSD nella maggior parte dei casi sono composti da sei eliche che attraversano la membrana. Sembra che i siti interagenti con i substrati trasportati siano localizzati proprio all'interno delle regioni MSD.

Non è ancora del tutto chiaro come avvenga il trasporto delle sostanze: alcuni modelli suggeriscono che il legame dell'ATP promuova una conformazione rivolta verso l'esterno delle regioni MSD e che la dissociazione dei prodotti di idrolisi faccia sì che invece le eliche assumano una conformazione rivolta verso l'interno (Fig. 1.18) (Szakacs et al., 2008).



**Fig. 1.18.** Rappresentazione schematica del probabile meccanismo molecolare dei trasportatori ABC (Szakacs et al., 2008).

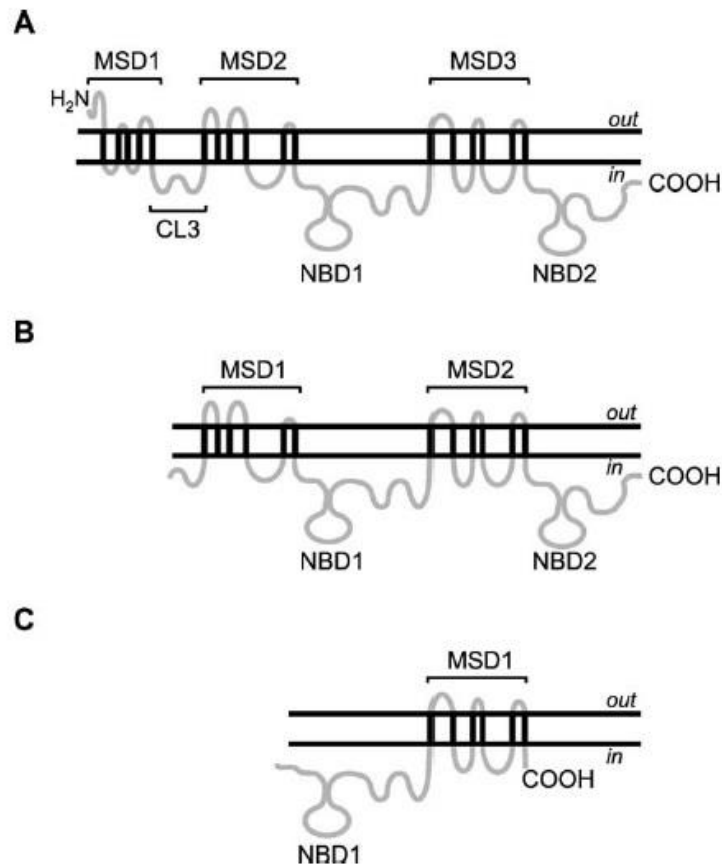
Negli esseri umani le più importanti proteine ABC sono P-gp (anche chiamata ABCB1 o MDR1), MRP1 (*Multidrug Resistance-associated Protein*, nota anche come ABCC1), MRP2 (chiamata anche ABCC2) e BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*, anche nota come ABCG2) (Luckenbach et al., 2014).

Come già riportato, P-gp fu la prima proteina ABC ad essere individuata; essa possiede una struttura a quattro domini, tipico della maggior parte dei trasportatori ABC eucariotici, con due NBD, ognuno preceduto da un MSD composto da sei eliche transmembrana (MSD-NBD-MSD-NBD) (Fig. 1.19) (Loo & Clarke, 1999).

Nel 1992 Cole et al. identificarono una seconda proteina ABC, ovvero la MRP1, e in seguito sono stati scoperte altre otto proteine della stessa sottofamiglia.

MRP1 e MRP2 sono composte da cinque domini: un dominio MSD, costituito da sole 5 eliche e un termine NH<sub>2</sub> extracitoplasmatico, e altri quattro domini, due MSD e due NBD, alternati (MSD-MSD-NBD-MSD-NBD) (Fig. 1.19) (Hipfner et al., 1997).

BCRP fu originariamente isolata da una linea cellulare di un cancro del seno; essa è un atipico “mezzo trasportatore”, in quanto consiste di un solo MSD preceduto da un solo NBD (NBD-MSD) (Fig. 1.19) (Doyle et al, 1998).



**Fig. 1.19.** Strutture secondarie dei trasportatori ABC meglio caratterizzati. Modelli topologici per (A) MRP1 e MRP2, (B) P-gp e (C) BCRP. MSD, membrane spanning domain; NBD, nucleotide binding domain; CL, cytoplasmatic loop (Leslie et al., 2005).

Nonostante le differenze nelle strutture di queste proteine, c'è una significativa sovrapposizione nello spettro dei substrati. Tuttavia, qualche specificità può essere riscontrata:

- P-gp trasporta sostanze moderatamente idrofobe, anfipatiche, di basso peso molecolare, planari, con un atomo di azoto basico, cationiche o neutre, mai anioniche;
- MRP1 e MRP2 trasportano sostanze coniugate a glutatione, acido glucuronico e solfato, agendo così sinergicamente con diversi enzimi di fase II, come la glutatione S-transferasi o l'UDP-glucuronosiltransferasi;
- BCRP è in grado di trasportare molecole coniugate a solfato e acido glucuronico, ma il numero di substrati coniugati sembra limitato rispetto a MRP1/MRP2, quindi la

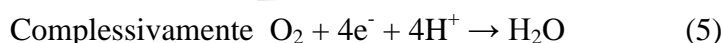
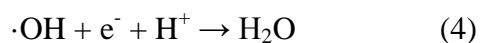
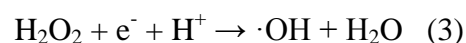
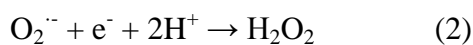
funzione probabilmente più importante di BCRP è quella di trasportare metaboliti fisiologici non coniugati (Bard, 2000 – Leslie et al., 2005).

All'inizio degli anni '90, Kurelec e collaboratori furono i primi a individuare trasportatori ABC negli organismi acquatici: in analogia con l'MDR nelle cellule tumorali, essi coniarono l'espressione *Multixenobiotic resistance* (MXR) per indicare il fenomeno di trasporto attivo all'esterno della cellula degli xenobiotici (Kurelec, 1992). Questo meccanismo permetterebbe a molte specie acquatiche di sopravvivere in ambienti che contengano alti livelli di inquinanti antropogenici o tossine naturali e trasportatori ABC sono stati identificati in diversi organismi acquatici, come spugne, molluschi, granchi, vermi, pesci... (Bard, 2000).

Kurelec e Pivcevic nel 1991 individuarono proteine MXR in *Mytilus galloprovincialis* (Kurelec & Pivcevic, 1991).

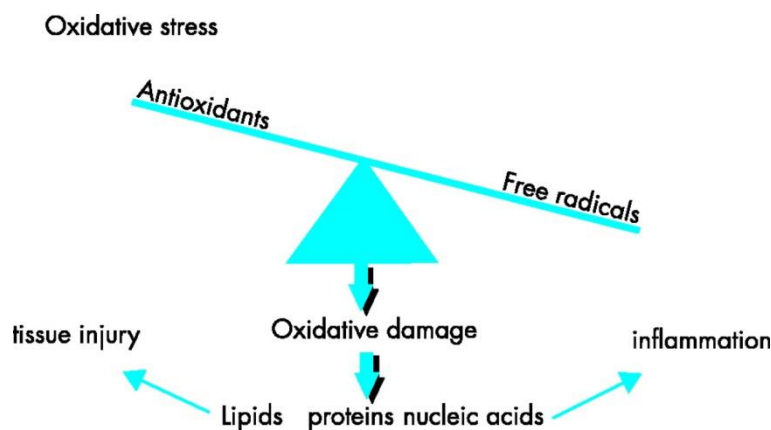
## 1.7 Lo stress ossidativo

Il metabolismo cellulare basale degli organismi aerobi ha come conseguenza la produzione di radicali liberi dell'ossigeno e specie reattive non radicaliche (ci si riferisce a questi tipi di molecole con l'espressione *reactive oxygen species*, ROS). Tali sostanze vengono generate dal metabolismo dell'ossigeno, per esempio durante la fosforilazione ossidativa: l'ossigeno molecolare richiede quattro elettroni per la sua completa riduzione ad acqua; siccome tale riduzione avviene mediante *step* sequenziali, è possibile che si formino intermedi ridotti da uno, due o tre elettroni. I vari passaggi della riduzione dell'ossigeno sono i seguenti:



I principali ROS generati dal metabolismo aerobico sono l'anione superossido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), il perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e il radicale ossidrile ( $\cdot\text{OH}$ ). Si tratta di potenti ossidanti capaci di reagire con le componenti cellulari e causare danni ai lipidi delle membrane biologiche, alle proteine e al DNA.

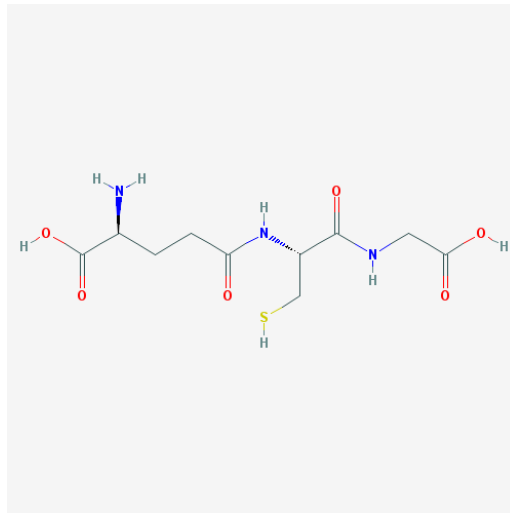
In vista di questo potenziale pericolo, gli organismi aerobi hanno sviluppato adeguati meccanismi di difesa antiossidanti, enzimatici e non enzimatici. Lo squilibrio tra la formazione e la neutralizzazione dei ROS da parte dei meccanismi antiossidanti viene chiamato “stress ossidativo” (Fig. 1.20).



**Fig. 1.20.** Lo “stress ossidativo” (lookfordiagnosis.com).

Alcune classi di sostanze xenobiotiche possono rappresentare fonti particolarmente prolifiche di ROS, a causa della loro capacità di essere ridotte, producendo i corrispondenti radicali, mediante diverse reduttasi NAD(P)H-dipendenti (per esempio la citocromo P450 reduttasi) e di subire quello che viene chiamato *redox cycling*. In questo ciclo di ossido-riduzione il radicale formatosi a partire dallo xenobiotico originario dona il suo elettrone spaiato all'ossigeno molecolare, producendo l'anione superossido  $O_2^{\cdot -}$  e il composto parentale, il quale può poi subire un nuovo ciclo. Dal momento che si tratta, appunto, di un processo ciclico, una singola molecola di xenobiotico può generare numerose molecole di superossido, amplificando di molto la produzione di ROS.

Il sistema antiossidante è costituito da un ampio apparato di *scavenger* (“spazzini”), sostanze a basso peso molecolare, e di enzimi antiossidanti. Gli *scavenger* neutralizzano i ROS reagendo direttamente con essi, venendo quindi temporaneamente ossidati prima di essere riconvertiti alla forma attiva mediante specifiche reduttasi. Possono agire da antiossidanti nel citoplasma o arrestare la propagazione delle reazioni di perossidazione lipidica nelle membrane. Lo *scavenger* più abbondante a livello citoplasmatico è il glutathione (GSH), un tripeptide costituito da cisteina e glicina, legate da un normale legame peptidico, e glutammato, che invece è legato alla cisteina con un legame peptidico atipico tra il gruppo carbossilico della catena laterale del glutammato e il gruppo amminico della cisteina (Fig. 1.21).

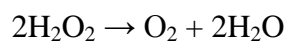


**Fig. 1.21.** Struttura molecolare del glutatione (GSH) (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Il glutatione neutralizza direttamente molte specie reattive attraverso la sua ossidazione a glutatione disolfuro (GSSG); la forma ridotta (GSH) viene poi rigenerata dall'enzima glutatione reduttasi, che usa il NADPH come donatore di elettroni. Altri *scavenger* citoplasmatici sono l'acido ascorbico e l'acido urico. Tra gli *scavenger* lipofili, i più importanti sono i tocoferoli e i carotenoidi, che agiscono contro la perossidazione dei lipidi delle membrane cellulari.

Gli enzimi antiossidanti catalizzano reazioni altamente specifiche con specifici substrati. Tra i principali enzimi vi sono la superossido dismutasi (SOD), che catalizza la disproporzione dell'anione superossido in ossigeno e perossido di idrogeno, la glutatione perossidasi (GPx), che usa il glutatione ridotto come donatore di elettroni per catalizzare la riduzione del perossido di idrogeno ad acqua, e la catalasi (CAT).

La catalasi, enzima oggetto di questa tesi, contiene 4 gruppi eme (emoproteina) e catalizza la seguente reazione:



È un tetramero di 4 catene polipeptidiche di lunghezza minima di 500 amminoacidi. All'interno del tetramero vi sono 4 gruppi ferrosi che permettono all'enzima di reagire con due molecole di perossido di idrogeno. Il completo meccanismo molecolare della catalasi non è ancora ben conosciuto. Si sa tuttavia che la reazione avviene in due stadi:



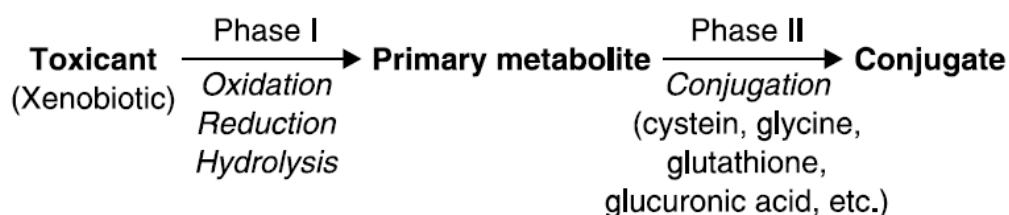
1.  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe(II)-E} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O=Fe(III)-E}$
2.  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O=Fe(III)-E} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Fe(II)-E} + \text{O}_2$

dove Fe-E rappresenta il centro ferroso del gruppo eme dell'enzima (Boelsterli, 2007 - Di Giulio et al., 1989 – Dröge, 2002 – Lesser, 2006 – Regoli & Giuliani, 2014 – Valavanidis et al., 2006 – Winston & Di Giulio, 1991).

## 1.8 Il metabolismo degli xenobiotici

Il metabolismo degli xenobiotici comprende tutta quella serie di passaggi che portano alla sua disattivazione ed escrezione. Gli xenobiotici sono sottoposti ad una conversione: l'insieme di processi metabolici che portano a ciò viene definito biotrasformazione. Le reazioni di biotrasformazione hanno la funzione di aumentare l'idrosolubilità dello xenobiotico, evitandone l'accumulo e favorendone l'eliminazione. Questo si attua attraverso due fasi (Fig. 1.22):

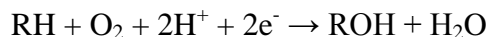
- FASE I: attuata attraverso reazioni di ossidazione, idrolisi o riduzione;
- FASE II: attuata mediante la coniugazione (accoppiamento) dello xenobiotico o del metabolita primario (proveniente dalla fase I della biotrasformazione) con una sostanza endogena (Xu et al., 2005 – Yu, 2005).



**Fig. 1.22.** Le due fasi della biotrasformazione (Yu, 2005).

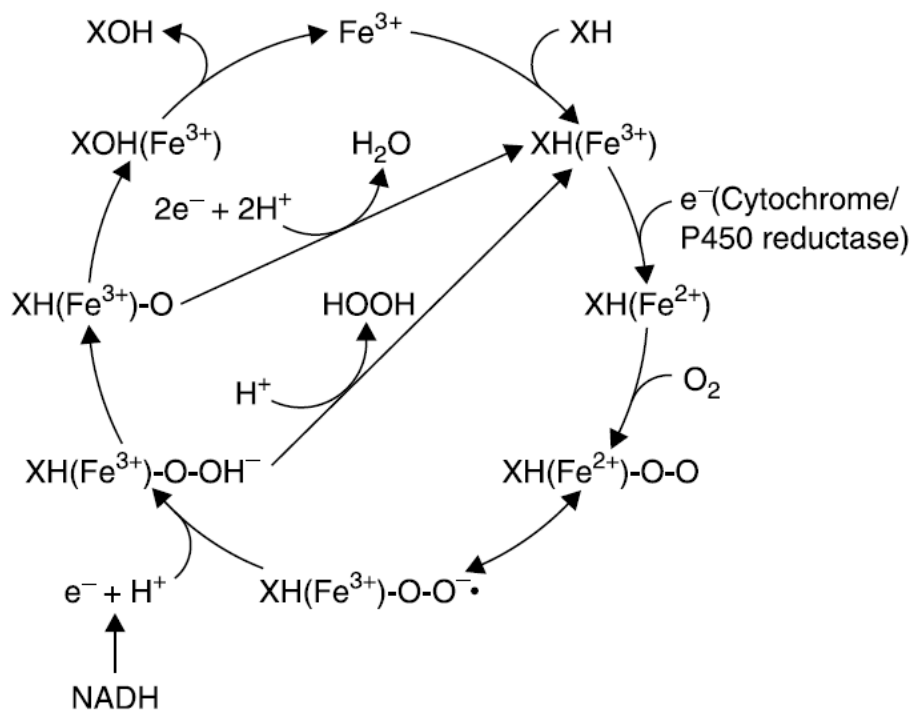
Il più importante sistema enzimatico coinvolto nella fase I della biotrasformazione è il citocromo P450 (CYP). Si tratta di una superfamiglia enzimatica di emoproteine presente in tutti i domini dei viventi e appartenente alla sottoclasse enzimatica delle ossidasi a funzione mista (o monoossigenasi). Gli enzimi CYP sono in grado di agire su un gran numero di differenti substrati, sia esogeni (farmaci e tossine di origine esterna) sia endogeni (prodotti di scarto dell'organismo). Le reazioni catalizzate dalle isoforme del citocromo P450 sono

svariate: ossidrilazione, dealchilazione, deamminazione, epossidazione... La più comune è una reazione da monoossigenasi, ovvero il trasferimento di un atomo di ossigeno dall'ossigeno molecolare a un substrato organico, con riduzione del secondo atomo di ossigeno ad acqua:



Gli elettroni necessari alla reazione possono essere forniti dal NADPH o dal NADH (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001 – Yu, 2005).

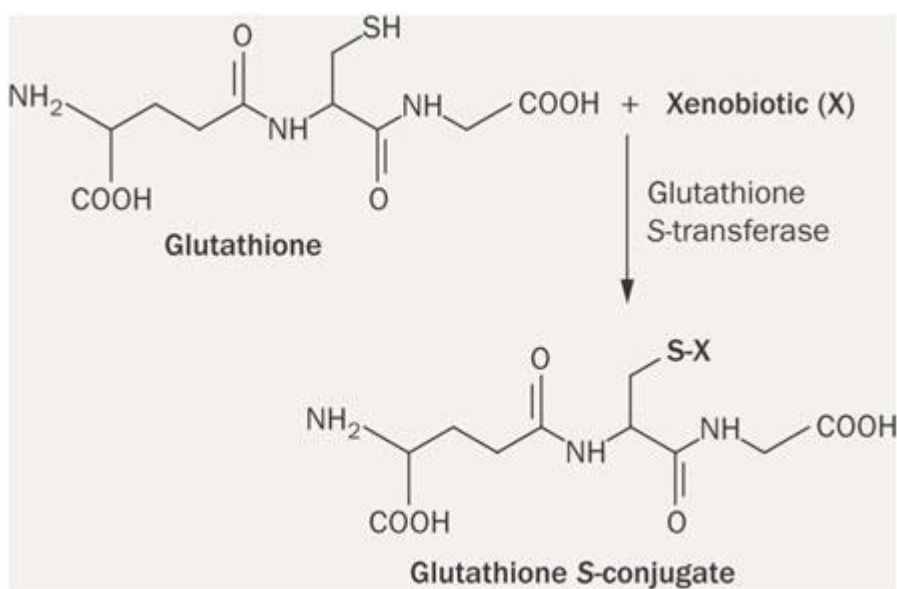
Il meccanismo di azione del citocromo (prendendo come esempio una reazione di ossidrilazione) è il seguente (Fig. 1.23): la forma ossidata di un atomo di ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ), presente nel sito attivo del citocromo P450, si lega direttamente al substrato (RH). Segue la riduzione di questo complesso enzima-substrato, mediante il trasferimento di un elettrone dal NADPH attraverso la NADPH-citocromo P450 reductasi. Il complesso enzima-substrato ridotto ( $\text{Fe}^{2+}$ ) si lega all'ossigeno molecolare e viene ridotto ulteriormente da un secondo elettrone, presumibilmente donato dal NADH attraverso il citocromo  $\text{b}_5$  e la NADH-citocromo  $\text{b}_5$  reductasi. Il complesso enzima-substrato-ossigeno si divide infine in substrato ossidato, acqua e nella forma ossidata dell'enzima (Yu, 2005).



**Fig. 1.23.** Ciclo catalitico del citocromo P450 (Yu, 2005).

Le reazioni di fase II consistono in processi di coniugazione: un metabolita primario derivante dalla fase I o uno xenobiotico parentale reagiscono con una sostanza endogena e formano un coniugato. L'accoppiamento può avvenire con piccole biomolecole ionizzabili o altamente idrofile, come glutatione, acido glucuronico, acido solforico, amminoacidi. Sono incluse anche reazioni di solfatazione, acetilazione, metilazione... La maggior parte delle reazioni di fase II si traduce in un sostanziale incremento nell'idrofilia dello xenobiotico (Yu, 2005). Uno dei principali enzimi coinvolti nelle reazioni di fase II è la glutatione S-transferasi (GST), oggetto di questa tesi. Si tratta di una superfamiglia di isoenzimi che catalizzano la coniugazione della forma ridotta del glutatione (GSH) con lo xenobiotico parentale o il metabolita primario derivante dalle reazioni di fase I (Fig. 1.24).

Le GST sono proteine dimeriche, principalmente citoplasmatiche, e presentano due domini principali: un dominio N-terminale che presenta una struttura secondaria mista ad alfa elica e beta foglietto, tende ad essere molto conservato nei vari gruppi di organismi viventi e lega il glutatione, e un dominio C-terminale, con una struttura secondaria ad alfa elica. Il dominio N-terminale contiene un residuo di tirosina, serina o cisteina che interagisce con il gruppo tiolico del GSH: questo processo sembra essere di fondamentale importanza nel ruolo catalitico delle GST (Rushmore & Pickett, 1993 – Sheehan et al., 2001).



**Fig. 1.24.** Reazione di coniugazione catalizzata dalla GST (www.nature.com).

Le proteine di trasporto implicate nella *Multidrug Resistance* (MDR) o nella *Multixenobiotic Resistance* (MXR) costituiscono quello che viene chiamato “metabolismo di fase III” (si veda la precedente trattazione nel capitolo 1.6).

## **1.9 La biomineralizzazione delle conchiglie dei molluschi**

Il termine “biomineralizzazione” si riferisce al processo fisiologico attraverso cui un organismo elabora una struttura mineralizzata (Lowenstam & Weiner, 1989).

Nei sistemi viventi i biominerali svolgono un’ampia serie di funzioni: sostegno ai tessuti, protezione dai raggi UV, difesa contro i predatori, alimentazione, riproduzione, percezione di gravità, luce o campi magnetici, immagazzinamento di ioni (Simkiss & Wilbur, 1989).

Tra i molluschi, la struttura biomineralizzata più conosciuta è la conchiglia: essa presenta una conformazione organo-minerale, dove la parte preponderante (95-99,9% in peso), costituita da carbonato di calcio (nella forma di aragonite, calcite o, in particolari casi, vaterite), è intimamente associata a una matrice organica (0,1-5% in peso). Questa matrice è un complesso amalgama di proteine, glicoproteine, lipidi, chitina e polisaccaridi, secreti dai tessuti calcificanti durante la scheletogenesi. A livello macroscopico, l’aggiunta di componenti organici a una struttura mineralizzata migliora le proprietà meccaniche dell’intero complesso organo - minerale; a livello molecolare, la matrice gioca un ruolo chiave nel processo di mineralizzazione.

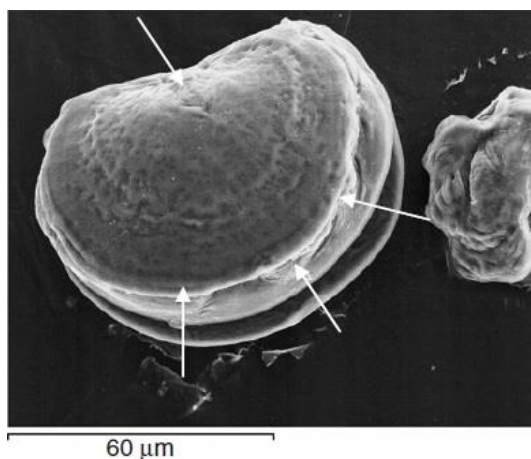
Tale processo richiede apparati cellulari specializzati, il che significa che i minerali formati non sono solamente sottoprodotti dell’attività metabolica, ma corrispondono a *pathway* metabolici specializzati. I minerali non vengono formati a diretto contatto con l’ambiente, ma gli organismi hanno sviluppato strategie per delimitare lo spazio dove vengono sintetizzati.

Fino ad ora gran parte del processo di biomineralizzazione è sconosciuta. Tuttavia molte funzioni vengono attribuite alla matrice organica: essa sembra concentrare localmente gli ioni precursori, permettere la nucleazione dei cristalli solo nei momenti appropriati, selezionare il polimorfo di carbonato di calcio, controllare l’allungamento e l’orientamento dei cristalli, determinare la disposizione delle unità cristalline a diverse scale (Belcher et al., 1996 - Falini et al., 1996 - Marin et al., 2008).

### **1.9.1 La formazione della conchiglia larvale**

I molluschi sono eutrocozoi, ovvero producono una larva ciliata e liberamente natante chiamata trocofora (Nielsen, 2004). La formazione della conchiglia larvale avviene proprio durante lo stadio di trocofora, circa 20 ore dopo la fecondazione. Nei bivalvi tale conchiglia è chiamata *prodissoconch I*: essa viene ingrandita fino a che l’embrione non è completamente avvolto e in grado di chiudere le due valve (Weiss et al., 2002).

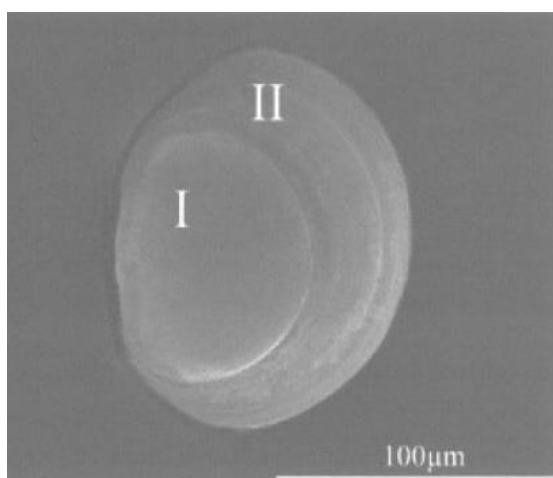
Tra il secondo e il terzo giorno dopo la fecondazione la trocofora si trasforma nella larva veliger: questa prima transizione comporta l'acquisizione di un *velum* per il nuoto e l'allargamento della conchiglia, fino a formare quella che viene chiamata *prodissoconch II* (Fig. 1.25) (Marin et al., 2008).



**Fig. 1.25.** Immagine al SEM di una larva veliger di *Mytilus galloprovincialis* (Marin et al., 2008).

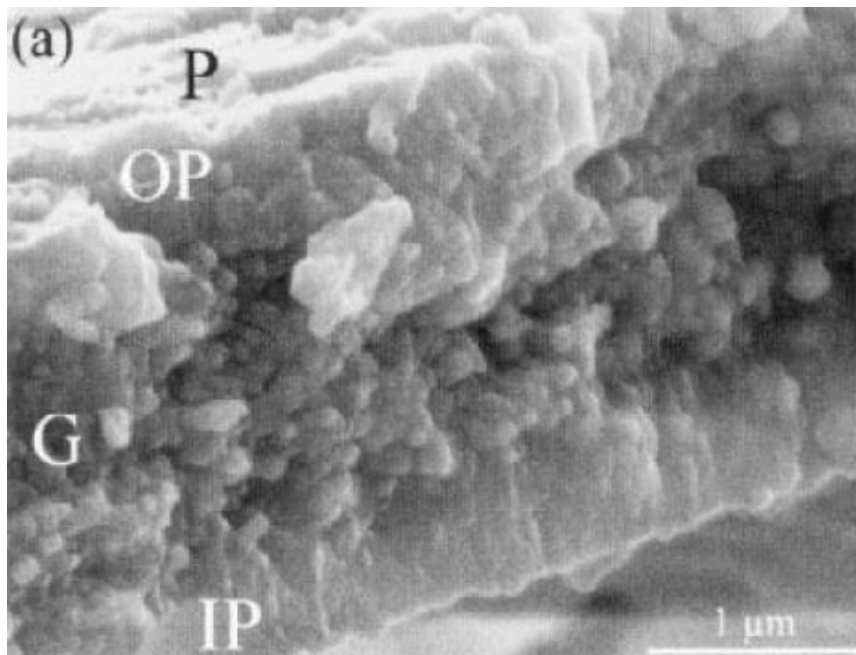
Sembra che le cellule deputate alla secrezione della *prodissoconch II* siano diverse rispetto a quelle che producono la *prodissoconch I* (Mao Che et al., 2001).

Tra i giorni 10-17 dopo la fecondazione avviene la metamorfosi nello stadio giovanile: la conchiglia è ora chiamata *dissoconch*. Le *prodissoconch I* e *II* sono preservate durante la metamorfosi e vengono integrate nella conchiglia dello stadio giovanile e dell'adulto. Quindi ogni conchiglia è un record dell'intero processo di formazione (Fig. 1.26) (Weiss et al., 2002).



**Fig. 1.26.** Immagine al SEM di una conchiglia larvale di *Mercenaria mercenaria* tre giorni dopo la fecondazione. I: *prodissoconch I*; II: *prodissoconch II* (Weiss et al., 2002).

In generale la conchiglia larvale dei molluschi è composta da tre strati mineralizzati: uno strato prismatico esterno sotto al periostraco, uno strato intermedio con strutture globulari e uno strato prismatico interno adiacente all'epitelio del mantello. In alcuni casi lo strato prismatico esterno è molto sottile o totalmente assente. Tale struttura solitamente è tipica di entrambe le *prodissoconch* (Fig. 1.27) (Weiss et al., 2002).



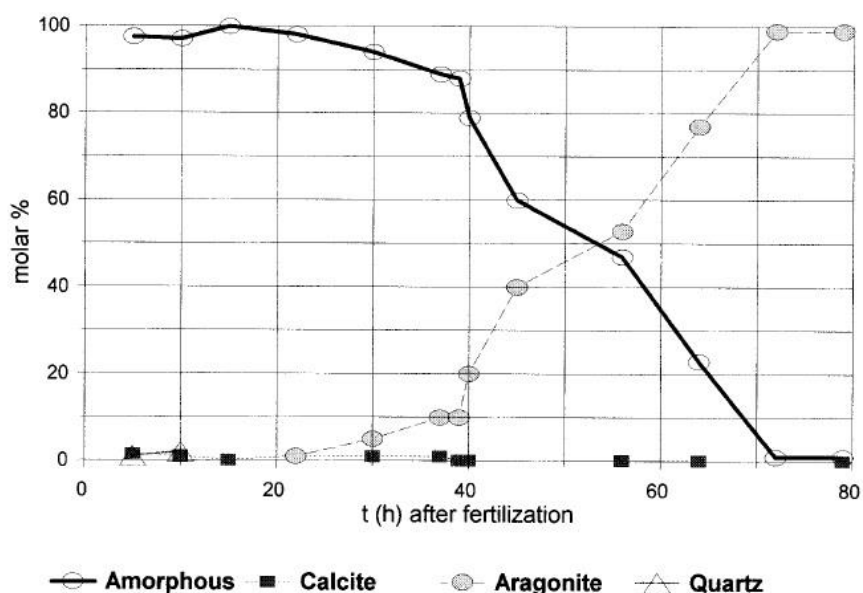
**Fig. 1.27.** Immagine SEM della sezione trasversale della *prodossoconch I* di una larva di *Mercenaria mercenaria* tre giorni dopo la fecondazione. P: periostraco; OP: strato prismatico esterno; G: strato granulare; IP: strato prismatico interno (Weiss et al., 2002).

La conchiglia del mollusco adulto è molto variabile: include calcite o aragonite o entrambe ed è costituita da uno o più strati, ognuno dei quali può avere una differente ultrastruttura. Al contrario tutte le conchiglie larvali contengono aragonite e hanno ultrastrutture simili, se non identiche. Questo implica che la conchiglia larvale sia altamente conservata durante l'evoluzione (Weiss et al., 2002).

Un aspetto che è passato inosservato per lungo tempo è il ruolo chiave del carbonato di calcio amorfo nella formazione della conchiglia. Studi recenti indicano che la mineralizzazione iniziale della conchiglia larvale avviene attraverso una fase amorfa transitoria. Weiss et al. (2002) hanno trovato che la conchiglia delle larve di *Mercenaria mercenaria* a tre giorni dalla fecondazione è composta principalmente da carbonato di calcio amorfo, che si trasforma dopo diversi giorni in una fase più cristallina. Sembra quindi che l'ispessimento della conchiglia

larvale avvenga mediante l'aggiunta di carbonato di calcio amorfo, che successivamente viene convertito in aragonite (Weiss et al., 2002).

Anche nel mitilo *Mytilus edulis* la conchiglia larvale è inizialmente costituita da carbonato di calcio amorfo, ma la sua quantità diminuisce drasticamente 40 ore dopo la fecondazione, a vantaggio della fase aragonitica (Fig. 1.28). Sono anche presenti piccolissime quantità di calcite e quarzo. I cristalli di calcite sembrano agire come centri di cristallizzazione per l'aragonite; si sa che il quarzo può essere incorporato negli strati della conchiglia di mollusco adulto durante una crescita rapida o come risultato di disturbi nei processi di biomineralizzazione. Tuttavia, la presenza di questo minerale negli embrioni rimane da spiegare (Medakovic, 2000).



**Fig. 1.28.** Curve di biomineralizzazione larvali di *Mytilus edulis* costruite secondo i diffrattogrammi ottenuti attraverso diffrazione a raggi X (Medakovic, 2000).

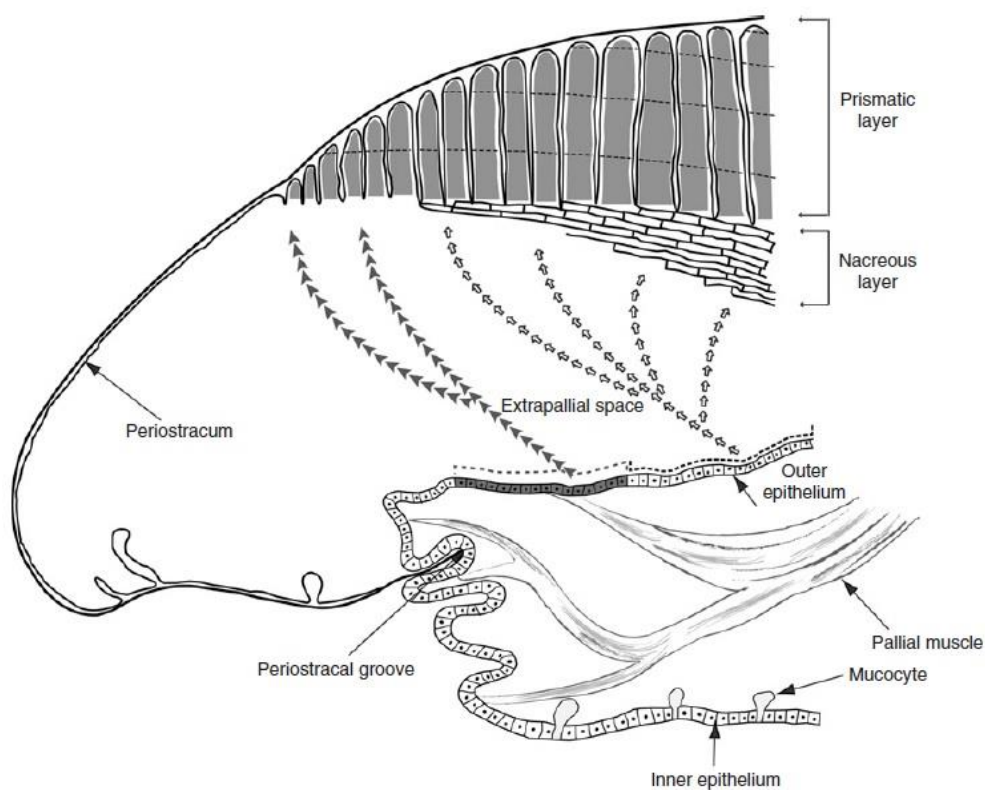
### 1.9.2 La conchiglia dell'adulto

Una volta avvenuta la metamorfosi del veliger, il risultante stadio giovanile calcifica rapidamente. L'organo direttamente responsabile della formazione della conchiglia è il mantello, nello specifico il suo epitelio esterno. Il periostraco invece fornisce un supporto per la mineralizzazione e delimita lo spazio dove essa deve avvenire (Marin et al., 2008).

Varie ipotesi sono state sviluppate per spiegare il trasporto del carbonato di calcio al sito deputato alla mineralizzazione. Alcuni sostengono che gli ioni precursori dei minerali, calcio e bicarbonato, vengano assorbiti dall'ambiente esterno mediante l'epitelio interno o le branchie oppure possano essere originati anche dal metabolismo. Transitano nei tessuti

connettivi del mantello attraverso l'emolinfa e sono diretti verso l'epitelio esterno. Vengono poi estrusi attivamente nello spazio extrapalliale; in alcuni casi il calcio può essere temporaneamente stoccato sotto forma di granuli amorfi intra o extracellulari (Marin et al., 2008). Secondo un'altra ipotesi il carbonato di calcio amorfo si forma all'interno di cellule specializzate e viene poi rilasciato al sito di mineralizzazione per mezzo di vescicole (Addadi et al., 2006).

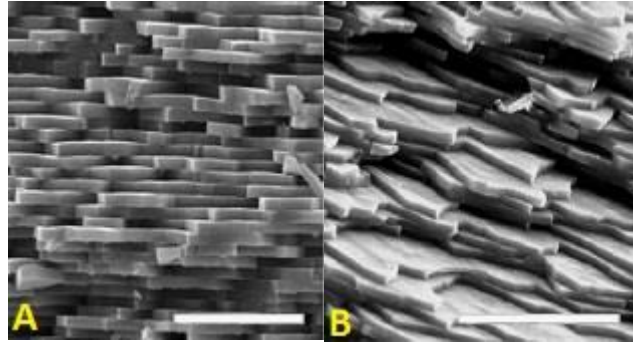
La conchiglia è formata da due strati continui: uno strato prismatico esterno che sovrasta uno strato madreperlaceo (nacre) (Fig. 1.29) (Marin et al., 2008). Nel mitilo *Mytilus edulis* lo strato prismatico è di calcite, mentre la nacre è di aragonite (Hattan et al., 2001).



**Fig. 1.29.** Organi e tessuti di mollusco coinvolti nei processi di biomineralizzazione (Marin et al., 2008).

La nacre è costituita da piccole “tavolette” piatte, spesse circa mezzo  $\mu\text{m}$  e impaccate strettamente insieme. Possono essere di forma rettangolare, esagonale o rotondeggiante e somigliano a monocristalli. Nei bivalvi la disposizione delle tavolette è detta “brick wall” perché, in sezione trasversale, i cristalli sono posizionati in file sfalsate, proprio come i mattoni in un muro. Nei gasteropodi la disposizione è detta invece “colonnare”, perché le tavolette sono allineate l’una sull’altra e quindi formano pile (o torri) di cristalli (Fig. 1.30) (Marin et al., 2008).



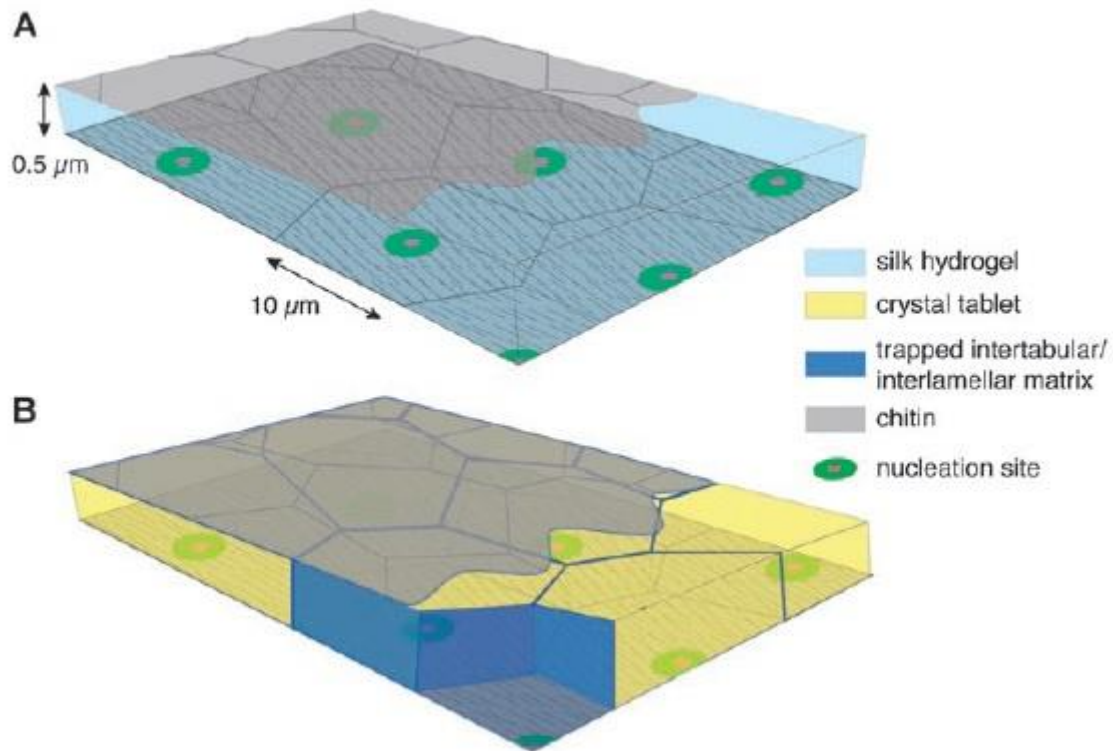


**Fig. 1.30.** Immagini SEM della nacre di molluschi. A: *Unio pictorum*, bivalve d'acqua dolce; B: *Haliotis tuberculata*, gasteropode (Marin et al., 2008).

Studi condotti con il microscopio elettronico a trasmissione hanno mostrato che le superfici delle tavolette sono delimitate da un sottile strato di matrice organica, che costituisce il *framework* in cui si formano i minerali. Levi-Kalisman et al. hanno scoperto che i componenti principali di questa matrice sono la  $\beta$ -chitina, proteine simili alla fibroina formanti un gel e proteine acide, molte delle quali ricche di acido aspartico (Levi-Kalisman et al., 2001).

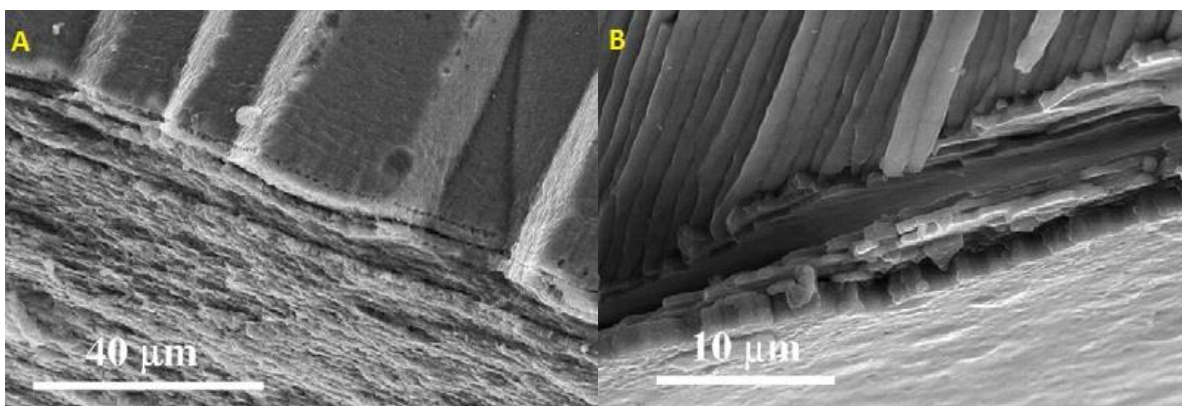
Addadi et al. hanno sviluppato un modello che spiega la formazione della nacre in quattro stadi (Fig. 1.31):

- assemblaggio della matrice: la chitina e le altre componenti vengono secrete dal mantello nello spazio extracellulare, dove si auto-assemblano. La funzione del gel sembra quella di riempire lo spazio e tenere i successivi strati interlamellari di chitina separati alla giusta distanza l'uno dall'altro;
- formazione della prima fase minerale: il carbonato di calcio amorfo viene trasportato nello spazio intercellulare. Il gel inibisce una cristallizzazione incontrollata fino a che le particelle non sono in contatto con i siti di nucleazione;
- nucleazione delle tavolette di aragonite: presso specifici siti, contenenti carbossilati circondati da solfati, avviene la nucleazione dei cristalli;
- crescita delle "tavolette" cristalline: il cristallo prima cresce verticalmente, fino a che non raggiunge il successivo strato di chitina, poi solo lateralmente. Durante la crescita alcune proteine acide vengono incorporate nei cristalli, alterandone presumibilmente le sue proprietà meccaniche e di solubilità (Addadi et al., 2006).



**Fig. 1.31.** Schematica rappresentazione del modello ipotizzato per la formazione della nacre. A: prima della mineralizzazione; B: dopo la mineralizzazione (Addadi et al., 2006).

Lo strato prismatico è formato da cristalli aghiformi di calcite o aragonite di vari lunghezza e diametro: si va dai sottili prismi obliqui calcitici del mitilo *Mytilus edulis* ai prismi calcitici di grandi dimensioni e sviluppati perpendicolarmente alla superficie della conchiglia del mitilo *Pinna nobilis* o ai prismi di aragonite del mitilo di acqua dolce *Unio pictorum* (Fig. 1.32) (Marin et al., 2008).



**Fig. 1.32.** Immagini SEM dello strato prismatico di bivalvi. A: *Unio pictorum*; B: *Mytilus edulis* (Marin et al., 2008).

I prismi vengono secreti sulla superficie interna del periostraco e si accrescono verso l'interno. Sono avvolti da una guaina organica insolubile e idrofoba che mantiene i prismi insieme e consente una certa flessibilità alla struttura (Marin et al. 2008).

### **1.9.3 Proteine coinvolte nella biomineralizzazione**

#### Anidrasi carbonica

L'anidrasi carbonica (CA) è un metalloenzima ubiquitario contenente zinco che catalizza la reazione di idratazione reversibile della  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$ . Svolge un importante ruolo in diverse funzioni fisiologiche: respirazione, trasporto di ioni, regolazione acido-base, biomineralizzazione (Medakovic, 2000). Tale enzima è implicato nei processi di calcificazione delle spugne calcaree, dei coralli, molluschi ed echinodermi (Tambutté et al., 2007).

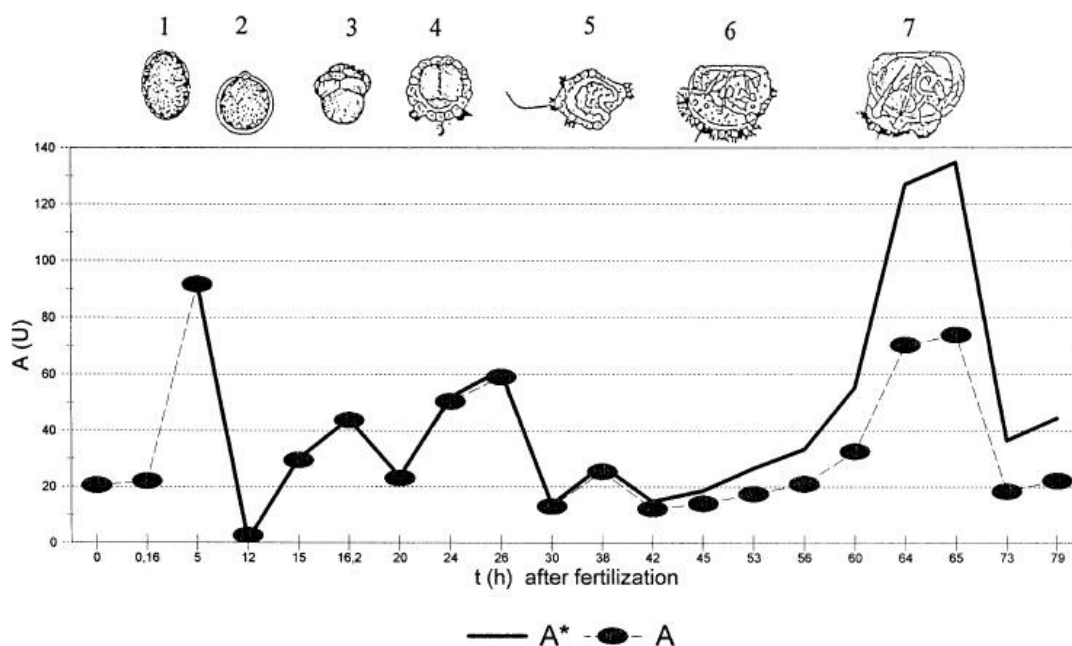
Medakovic ha misurato l'attività dell'anidrasi carbonica in diversi stadi di sviluppo di *Mytilus edulis*, così come nelle gonadi e nel mantello di esemplari adulti, per chiarificare il ruolo dell'enzima nella formazione dei cristalli minerali. L'attività media nelle fasi embrionali e larvali è risultata circa quattro volte inferiore rispetto a quella del mantello dell'adulto e cinque volte minore di quella registrata nelle gonadi dell'adulto. Il confronto tra l'attività enzimatica negli embrioni e larve e le curve di biomineralizzazione indica che l'attività dell'anidrasi carbonica raggiunge un massimo alla fine di ogni fase di sviluppo connessa con la biomineralizzazione (Fig. 1.33) (Medakovic, 2000).

Miyamoto et al. sono stati i primi a scoprire un dominio dell'anidrasi carbonica all'interno della nacreina, una proteina solubile della matrice organica della nacre nel mollusco *Pinctada fucata* (Miyamoto et al, 1996).

Marie et al. hanno studiato l'attività dell'anidrasi carbonica nella matrice organica della nacre di *Unio pictorum* (Marie et al., 2008).

Già nel 1955 Wilbur e Jodrey avevano scoperto che gli inibitori dell'anidrasi carbonica 2-benzothiazolesulfonamide e 2-acetylamino-1,3,4-thiadizole-5-sulfonamide riducevano considerevolmente il tasso di deposizione del calcio nella conchiglia di *Crassostrea virginica* (Wilbur & Jodrey, 1955).

Tambutté et al. hanno dimostrato la funzione dell'anidrasi carbonica nei processi di calcificazione anche in altri organismi marini diversi dai molluschi, nello specifico ottenendo una diminuzione nella deposizione del calcio nello scheletro del corallo *Tubastrea aurea* in presenza dell'ethoxzolamide, inibitore dell'anidrasi carbonica (Tambutté et al., 2007).



**Fig. 1.33.** Attività dell'anidrasi carbonica a diversi stadi di sviluppo di *Mytilus edulis*, espressa in unità per grammo di peso del campione. Secondo le curve di biomineralizzazione è stato operata una correzione dei risultati per peso percentuale della conchiglia e l'attività corretta è rappresentata con la curva in grassetto A\*. 1: uovo non fecondato; 2: fecondazione; 3: formazione del somatoblasto secondario 2d; 4: stadio di transizione tra la gastrula e la trocofora; 5: trocofora completamente sviluppata; 6: *prodissoconch I*; 7: *prodissoconch II* (Medakovic, 2000).

### Proteina extrapalliale

Il fluido extrapalliale viene secreto dalle cellule dell'epitelio esterno del mantello e riempie la cavità extrapalliale, lo spazio tra la conchiglia e il mantello. Il fluido contiene proteine, glicoproteine, carboidrati e amminoacidi e si ritiene che sia sovrasaturato rispetto ai minerali della conchiglia. Sia la posizione che il contenuto biomolecolare del fluido extrapalliale implicano che esso deve giocare un importante ruolo nella formazione della conchiglia. Nonostante ciò, pochi studi stati condotti sulle componenti proteiche di tale mezzo.

Solo recentemente è stata isolata e caratterizzata la proteina predominante nel fluido extrapalliale di *Mytilus edulis*: essa è stata denominata proteina extrapalliale (proteina EP). Si tratta di una glicoproteina acida, omodimero composto da monomeri di 213 amminoacidi con una massa di 28,2 kDa (14,3% in peso di componente glucidica, ovvero 4 kDa), ricca in residui di His (14,1%), Asx (12,2%) e Glx (12,7%) (Fig. 1.34). La proteina EP è in grado di legare lo ione  $Ca^{2+}$ , e il legame induce l'aggregazione dei monomeri a formare una serie di specie multimeriche di massa molecolare crescente, oltre a causare una riduzione nei  $\beta$ -foglietti a favore delle strutture ad  $\alpha$ -elica. Il fatto che EP sia una proteina acida è in accordo

con l'osservazione che la matrice organica della conchiglia è composta da proteine ricche di residui amminoacidici acidi (Hattan et al., 2001 – Yin et al., 2005).

| aa residue           | results based on EP sequence<br>derived from cDNA sequence |       |
|----------------------|--|-------|
|                      | mol/mol <sup>a</sup>                                       | mol % |
| Ala (A)              | 17   | 8.0   |
| Arg (R)              | 2  | 0.9   |
| Asn (N)              | 8  | 3.8   |
| Asp (D)              | 18   | 8.5   |
| Cys (C)              | 2  | 0.9   |
| Gln(Q)               | 2  | 0.9   |
| Glu (E)              | 25   | 11.7  |
| Gly (G)              | 10   | 4.7   |
| His (H) <sup>c</sup> | 30   | 14.1  |
| Ile (I)              | 15   | 7.0   |
| Leu (L)              | 13   | 6.1   |
| Lys (K)              | 11   | 5.2   |
| Met (M)              | 4  | 1.9   |
| Phe (F)              | 13   | 6.1   |
| Pro (P)              | 6  | 2.8   |
| Ser (S)              | 9  | 4.2   |
| Thr (T)              | 9  | 4.2   |
| Trp (W)              | 0  | 0     |
| Tyr (Y)              | 4  | 1.9   |
| Val (V)              | 15   | 7.0   |
| Asx (B) <sup>c</sup> | 26   | 12.2  |
| Glx (Z) <sup>c</sup> | 27   | 12.7  |
| total                | 213  | 100   |

**Fig. 1.34.** Composizione amminoacidica della proteina extrapalliale. <sup>a</sup>: moli di amminoacido per moli di proteina; <sup>c</sup>: residui particolarmente abbondanti (Yin et al., 2005).

Alcuni dei residui di Glu e/o di Asp potrebbero fornire gruppi carbossilici agenti come ligandi per chelare Ca<sup>2+</sup>. Probabilmente è il dominio N-terminale a essere coinvolto nel legame del Ca<sup>2+</sup>, vista la presenza di molti gruppi carbossilici.

La sequenza amminoacidica della proteina EP assomiglia a quella di una proteina legante metalli pesanti (proteina HIP) isolata nell'emolinfa di *Mytilus edulis*. La proteina HIP lega ioni metallici, come Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> e sembra possa fungere da *carrier* di ioni bivalenti nel plasma a scopo di detossificazione. Solo 9 su 213 residui amminoacidici di EP differiscono da quelli di HIP. In aggiunta EP è in grado di legare, oltre a Ca<sup>2+</sup>, anche Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>.

La struttura primaria di EP somiglia anche a quella di una glicoproteina ricca di residui di istidina (proteina HRG) isolata sempre in *Mytilus edulis*, in grado di trasportare Cd<sup>2+</sup> e con una percentuale di identità con EP del 79%.

È plausibile che la proteina EP svolga diverse funzioni in *Mytilus edulis*, come la detossificazione da metalli pesanti e il trasporto di  $\text{Ca}^{2+}$  tra il plasma e il fluido extrapalliale per la mineralizzazione. Inoltre, anche se nessuna delle proteine identificate finora nella matrice organica della conchiglia somiglia a EP, è possibile che quest'ultima subisca grandi modificazioni prima di venire incorporata nella conchiglia, oppure questa ipotesi potrebbe essere del tutto fuorviante. Ulteriori studi dovranno essere mirati a sciogliere tale nodo (Hattan et al., 2001 – Yin et al. 2005).

## 2. Obiettivi

La presenza dei farmaci in ambiente sta assumendo negli ultimi decenni sempre più rilevanza come problematica da affrontare e a cui tentare di porre rimedio. I corpi idrici vengono contaminati soprattutto a causa della rimozione spesso inefficiente negli impianti di trattamento delle acque reflue. Anche se le concentrazioni in ambiente risultano piuttosto basse ( $\mu\text{g/L}$  o  $\text{ng/L}$ ), i farmaci hanno proprietà diverse dagli inquinanti convenzionali, per cui risultano attivi anche a basse concentrazioni e ciò può indurre effetti dannosi negli organismi non target che vengono a contatto con tali sostanze, in particolare se essi possiedono gli stessi bersagli molecolari interessati nei vertebrati dall'azione farmacologica prevista (Fent et al., 2006).

Nell'ambito delle pratiche di biomonitoraggio delle acque marine viene spesso utilizzato come organismo sentinella il mitilo *Mytilus galloprovincialis* (Viarengo et al., 2007) e proprio tale specie è stata scelta per questo lavoro di Tesi.

In particolare, si sono voluti valutare gli effetti di due farmaci presenti in ambiente, ovvero il propranololo (farmaco  $\beta$ -bloccante) e la carbamazepina (farmaco anticonvulsivante), su di uno stadio larvale del mitilo, in quanto si tratta di una fase particolarmente delicata dello sviluppo (Brunelli et al., 2004).

Mediante un saggio di embriotossicità è stata valutata la presenza di malformazioni o ritardi nello sviluppo della larva veliger (a 48 ore dalla fecondazione) (ASTM, 2004 - Fabbri et al., 2014).

È stata determinata, nei veliger, l'attività di due proteine implicate nella *Multixenobiotic Resistance* (MXR), ovvero la P-glicoproteina (P-gp) e la *Multidrug Resistance-associated Protein* (MRP).

Inoltre è stata valutata, sempre sui veliger, la possibile influenza dei due farmaci saggiati sull'espressione di alcuni geni che codificano per proteine implicate nel metabolismo degli xenobiotici, ovvero la glutatione S-transferasi (GST) e le proteine MXR P-gp e MRP; di un gene che codifica per una proteina antiossidante, cioè la catalasi (CAT); di due geni che codificano per proteine implicate nella biomineralizzazione, ovvero l'anidrasi carbonica (CA) e la proteina extrapalliale (EP).





### **3. Materiali e metodi**

#### **3.1 Fecondazione in vitro degli ovociti di mitilo**

Le procedure relative alla fecondazione *in vitro* degli ovociti e al successivo allestimento del saggio di embriotossicità su embrioni di mitilo (*Mytilus galloprovincialis*) sono state attuate seguendo le indicazioni di Fabbri et al. (2014), che integrano e implementano i protocolli definiti linee guida dello Standard Protocol ASTM E724-98 (ASTM, 2004).

Esemplari adulti di *M. galloprovincialis* sessualmente maturi, provenienti da allevamenti di Cesenatico, sono stati trasferiti in laboratorio e sistemati in vasche in polipropilene della capacità di 30 L con circa 4-5 L di acqua di mare artificiale (*artificial seawater*, ASW; ASTM, 2004) (Tabella 3.1), alla temperatura di  $16 \pm 1$  °C (Fig. 3.1).

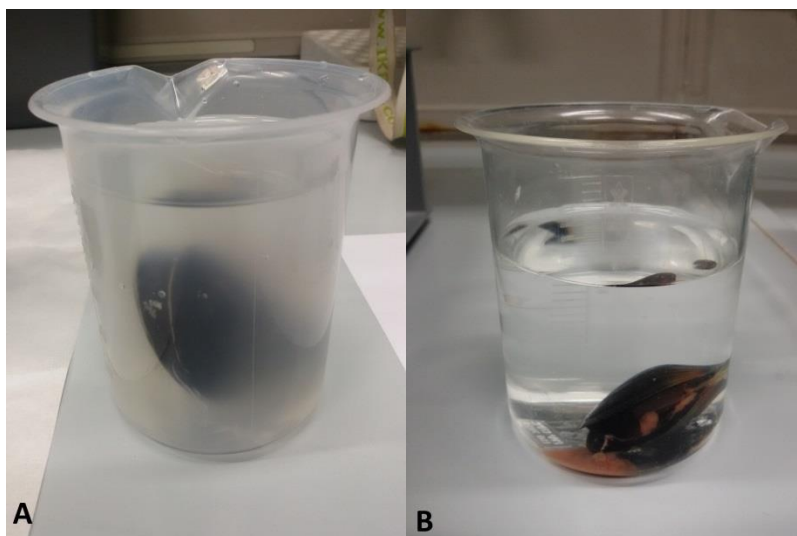
**Tabella 3.1.** Composizione dell'ASW (*artificial sea water*) (massa dei sali utilizzati per preparare 30 L di acqua) (ASTM, 2004).

| <b>Sali</b>                           | <b>Massa (g)</b> |
|---------------------------------------|------------------|
| NaF                                   | 0,057            |
| SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 0,39             |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>        | 0,6              |
| KBr                                   | 2,01             |
| KCl                                   | 13,98            |
| CaCl <sub>2</sub>                     | 21,99            |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 79,8             |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 99,9             |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 3,99             |
| NaCl                                  | 829,5            |

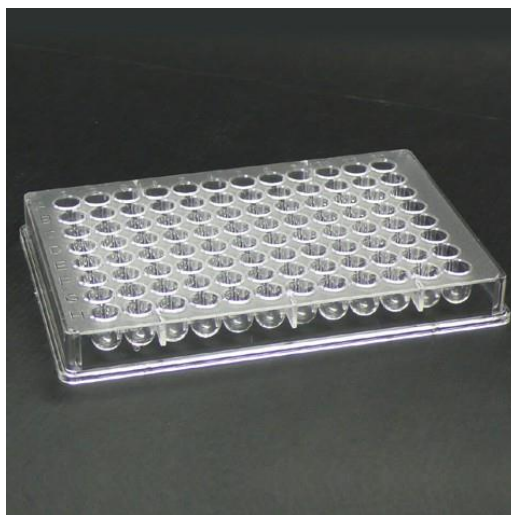


**Fig. 3.1.** Mitili in vasca di polipropilene.

Come precedentemente riportato da Fabbri et al. (2014), i mitili erano utilizzati entro due giorni per la raccolta dei gameti. Quando i mitili iniziavano a rilasciare gameti, ogni individuo veniva trasferito in un beaker contenente 200 mL di ASW fino a completa emissione dei gameti stessi. I gameti maschili e femminili sono stati quindi campionati separatamente (Fig. 3.2). Le sospensioni di uova e di spermatozoi sono state filtrate attraverso opportuni filtri di nylon, e la densità dei gameti è stata determinata mediante analisi al microscopio ottico invertito (Optech), in opportune camere di conta (Fig. 3.3). La fecondazione è stata effettuata a una temperatura costante di 16°C in opportuni volumi di ASW (a seconda del saggio biologico), utilizzando una densità di ovociti pari a 200 uova/mL e un rapporto uova:spermatozoi 1:10.

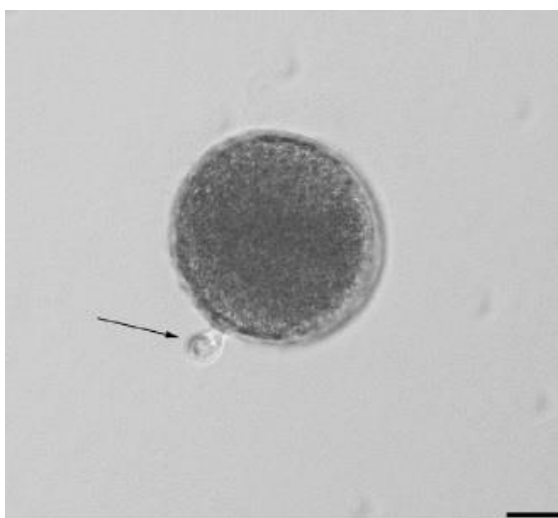


**Fig. 3.2.** Mitili durante l'emissione dei gameti. A: maschio; B: femmina.



**Fig. 3.3.** Piastra sterile in polistirene da 96 pozzetti (www.medsupplypartners.com).

Dopo 30 minuti gli embrioni sono stati analizzati al microscopio per verificare il successo della fecondazione, che non doveva essere inferiore al 90%; un uovo fecondato presenta il cosiddetto “globulo polare” (Fig. 3.4).



**Fig. 3.4.** Uovo fertilizzato di *Mytilus galloprovincialis* con globulo polare. Barra di scala: 20 $\mu$ m. (Fabbri et al., 2014).

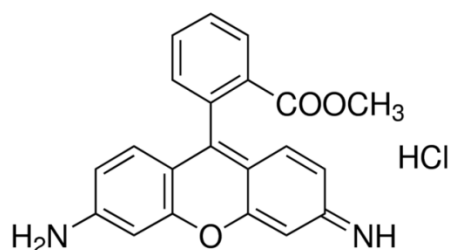
## 3.2 Saggio di embriotossicità

Per valutare il potenziale effetto dei contaminanti emergenti propranololo e carbamazepina sulle fasi dello sviluppo larvale del mitilo mediterraneo è stato utilizzato un test acuto di embriotossicità (ASTM, 2004) adattato per micropiastre. Il saggio di embriotossicità è stato

effettuato secondo Fabbri et al. (2014) in micropiastre sterili da coltura cellulare da 96 pozzetti. Per ciascuna concentrazione e per i controlli sono state predisposte 6 repliche. Dopo 30-min dalla fecondazione, le sostanze sono state aggiunte nei pozzetti contenenti gli embrioni a partire da soluzioni stock preparate in acqua milliQ sterile (propranololo) o DMSO (carbamazepina), tenendo conto dei loro limiti di solubilità. L'intervallo di concentrazioni testate (da 0,01 µg/L a 1 mg/L) è stato selezionato sulla base della bibliografia tenendo conto di precedenti analoghi test e delle concentrazioni ambientali dei farmaci (Fabbri et al., 2014; Fabbri & Franzellitti, 2015). Un gruppo di campioni di controllo è stato mantenuto in parallelo agli embrioni trattati. I campioni sono stati quindi incubati per 48 ore a  $16 \pm 1$  °C. Alla fine del periodo di incubazione i campioni sono stati fissati con calcio-formolo e analizzati al un microscopio ottico invertito (Axiovert 100, Zeiss) equipaggiato con un obiettivo 10X per rilevare il numero e la morfologia delle larve veliger sviluppatesi nei campioni trattati e in quelli di controllo. Una larva è stata considerata normale quando la conchiglia era a forma di lettera D e il mantello non protrudeva fuori dalla conchiglia; è stata invece considerata malformata se non aveva completato lo sviluppo fino allo stadio di veliger o se presentava difetti morfologici (conchiglia malformata o danneggiata, mantello sporgente, cerniera convessa). L'*endpoint* registrato è stato la percentuale di larve veliger normali in ogni pozzetto rispetto al totale; il test risulta valido se nei pozzetti di controllo la percentuale di larve normali supera il 75% (ASTM, 2004).

### 3.3 Saggio di valutazione dell'attività delle proteine MXR

Il saggio di valutazione dell'attività di trasporto delle proteine MXR si basa sulla quantificazione dei livelli residui di un substrato fluorescente trattenuto all'interno delle cellule. Il substrato fluorescente utilizzato è la rodamina 123 (Fig. 3.5), impiegata in questo tipo di test perché substrato di entrambe le famiglie di trasportatori MXR analizzati (Minier et al., 2002).



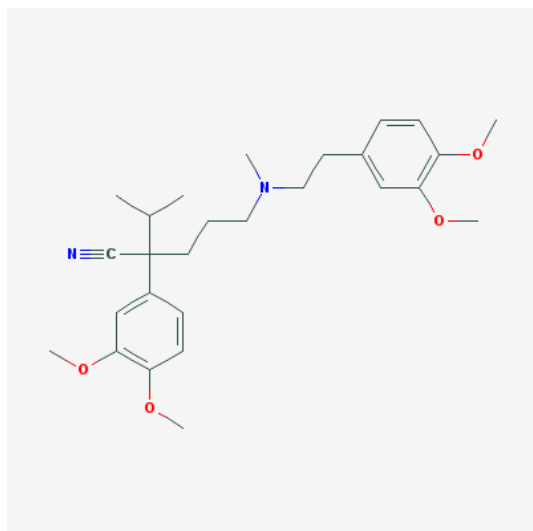
**Fig. 3.5.** Struttura molecolare della rodamina 123 (www.sigmaaldrich.com).

Sono state effettuate due serie di esperimenti:

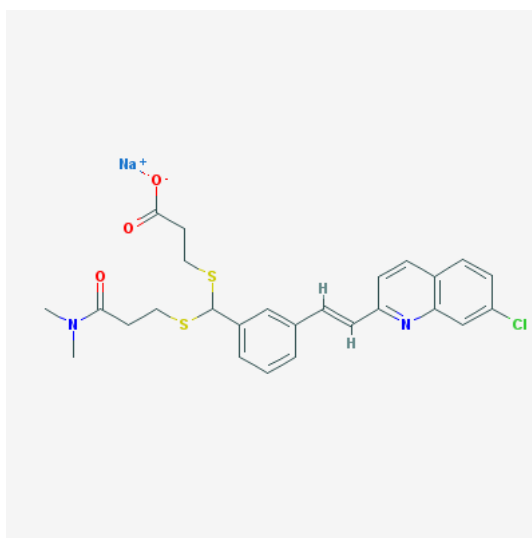
**1° serie.** *Trattamento con inibitori modello per i trasportatori di membrana P-gp e MRP.* A fecondazione avvenuta (30 min p.f.), gli embrioni sono stati mantenuti in condizioni ottimali fino al raggiungimento dello stadio di veliger (48 ore p.f.). Prima dell'incubazione con la rodamina, i veliger sono stati trattati per 5 min con verapamil (Fig. 3.6), inibitore P-gp-selettivo, e MK571 (Fig. 3.7), un inibitore MRP-selettivo. Gli inibitori sono stati aggiunti agli opportuni campioni a partire da soluzioni stock preparate nel solvente dimetilsolfossido (DMSO), ad una concentrazione finale di 20  $\mu\text{M}$  (verapamil) e 10  $\mu\text{M}$  (MK571). La concentrazione finale di DMSO è pari a 0.1% (v/v), concentrazione che esperimenti preliminari hanno mostrato non alterare i parametri testati (dati non mostrati).

**2° serie.** *Trattamento delle larve con farmaci.* E' stessa utilizzata la stessa procedura di preparazione del saggio di embriotossicità, ma utilizzando un numero di embrioni maggiore. Le concentrazioni testate, selezionate sulla base dei risultati dei test di embriotossicità, sono: 0,01  $\mu\text{g/L}$  e 1  $\mu\text{g/L}$  per il propranololo, e 0,01  $\mu\text{g/L}$  e 10  $\mu\text{g/L}$  per la carbamazepina. Ciascun trattamento è stato effettuato in triplicato (N = 3).

Per entrambe le serie di esperimenti, sia ai veliger trattati che a quelli di controllo è stato aggiunto un opportuno volume di una soluzione stock di Rodamina 123 in DMSO (concentrazione finale di DMSO = 0.1% v/v) preparata in modo tale che la concentrazione finale di rodamina risultasse 2.5  $\mu\text{M}$ . Le larve sono state incubate in queste condizioni per 90 min al buio. Terminato il periodo di trattamento, i campioni sono stati incubati per 20 min in ghiaccio e le larve sono state raccolte su filtri di nylon. Il filtro è stato quindi dilavato con un opportuno volume di una soluzione di lisi contenente 0.1% Triton X-100 in PBS 1X. I lisati sono stati opportunamente diluiti e la fluorescenza dei campioni è stata rilevata mediante l'utilizzo di un fluorimetro Jasco modello FP-6200 (lunghezza d'onda di eccitazione = 485 nm; lunghezza d'onda di emissione = 530 nm). Per evitare la perdita di intensità di fluorescenza della Rodamina 123, tutte le fasi di manipolazione dei campioni sono avvenute al buio. I valori di intensità di fluorescenza sono stati normalizzati sul contenuto di proteine dei lisati misurato mediante il saggio colorimetrico di Lowry (Lowry et al., 1951). I dati finali sono stati espressi come media  $\pm$  SEM della variazione percentuale rispetto ai campioni di controllo.



**Fig. 3.6.** Struttura molecolare del verapamil (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).



**Fig. 3.7.** Struttura molecolare dell'MK571 (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

### 3.4 Dosaggio delle proteine

La determinazione del quantitativo delle proteine è stata svolta seguendo il metodo di Lowry et al. (1951). Questo saggio prevede due fasi: nella prima gli ioni  $\text{Cu}^{2+}$  presenti nella soluzione B ( $\text{CuSO}_4$  1%) reagiscono in ambiente basico con i gruppi  $\text{CO-NH}_2$  delle proteine causando la colorazione violetta della soluzione; nella seconda fase gli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico, contenuti nel reattivo di Folin, vengono ridotti dal complesso rame-proteina a blu di tungsteno e blu di molibdeno.

Oltre ai campioni sono stati preparati anche un bianco, al cui interno sono presenti tutti i reagenti che si trovano anche nei campioni da analizzare con l'eccezione del materiale proteico, e 5 soluzioni standard, che contengono una quantità nota di albumina di siero bovino (BSA, *bovine serum albumin*).

I campioni e le soluzioni standard sono stati caricati (in triplicato) nei pozzetti di una micropiastra, aggiungendo poi per ogni pozzetto 200  $\mu\text{L}$  di un reattivo costituito da 100 parti di soluzione A ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - tartrato 20%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% e  $\text{NaOH}$  0.4%) e una parte di soluzione B ( $\text{CuSO}_4$  1%). Dopo 10 minuti di incubazione con la soluzione A + B, sono stati aggiunti per ogni pozzetto 20  $\mu\text{L}$  di la soluzione C, costituita dal reattivo di Folin e da acqua in rapporto 1:1. Dopo 30 minuti sono state effettuate le letture a 650 nm mediante uno spettrofotometro per micropiastre (BioTek EL 808). Le assorbanze degli standard sono state utilizzate, insieme ai quantitativi già noti di proteine, per costruire la curva di calibrazione; le assorbanze dei campioni sono servite per ottenere i valori dei quantitativi di proteine, applicando la legge di Lambert-Beer.

### **3.5 Analisi dell'espressione genica**

Gli embrioni sono stati trattati con i farmaci in esame seguendo la stessa procedura di preparazione impiegata per il saggio dell'attività MXR e utilizzando le stesse concentrazioni di trattamento. Ciascun trattamento è stato effettuato in triplicato ( $N = 3$ ).

#### **3.5.1 Estrazione dell'RNA totale**

Terminati i trattamenti (48 ore p.f.), i campioni sono stati incubati per 20 min in ghiaccio e le larve sono state raccolte su filtri di nylon. Il filtro è stato quindi dilavato con un opportuno volume del reagente TRI Reagent (Sigma Aldrich). L'RNA totale è stato quindi estratto utilizzando il kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research), secondo il protocollo fornito dal produttore. L'RNA estratto è stato risospeso in un opportuno volume di acqua micro-filtrata (milliQ) sterile, ed è stata effettuata una verifica quali-quantitativa sia mediante lettura allo spettrofotometro ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) sia mediante elettroforesi orizzontale su gel denaturante (Sambrook et al., 1989).

### 3.5.2 Retrotrascrizione

La retrotrascrizione (o trascrizione inversa) è una reazione che consente di ottenere da un filamento stampo di RNA una molecola di DNA a singolo filamento ad esso complementare (cDNA). L'enzima in grado di catalizzare tale reazione è la trascrittasi inversa (o DNA polimerasi RNA-dipendente).

La sintesi del cDNA è resa possibile grazie all'utilizzo di oligonucleotidi detti *primer* (inneschi) che, appaiandosi alla sequenza dell'RNA ad essi complementare, costituiscono un piccolo tratto a doppio filamento a partire dal quale la trascrittasi inversa può iniziare la sintesi.

Le molecole di mRNA eucariotico contengono nella loro estremità 3' una sequenza poliadenilica di circa 200 nucleotidi, denominata coda poli (A). Essa è estremamente utile per l'inizio della reazione di retrotrascrizione grazie all'utilizzo di oligonucleotidi sintetici definiti oligo (dT), che si appaiano alla coda poli (A) dell'mRNA e servono come *primer* per la trascrittasi inversa.

Un altro metodo consiste nell'utilizzo di *primer* a sequenza arbitraria (*random primer*), oligonucleotidi composti da 6 nucleotidi che si appaiano in maniera arbitraria all'RNA. Questa tecnica è utile quando si vogliono retrotrascrivere filamenti di mRNA molto lunghi; tuttavia, potendo tali *primer* appaiarsi a qualsiasi sequenza di RNA, possono essere trascritte anche molecole di RNA non messaggero, come l'RNA ribosomiale (rRNA).

In questo lavoro di Tesi è stato scelto di utilizzare come *primer* un mix di oligo (dT) e di *random primer*, per massimizzare la resa della reazione di retrotrascrizione.

Per ogni campione, il cDNA è stato sintetizzato a partire da 500 ng di RNA totale utilizzando il kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-rad Laboratories), seguendo il protocollo descritto dal produttore.

La reazione di retrotrascrizione ha previsto tre fasi:

1. ibridazione dei *primer* sui filamenti di RNA (5 minuti a 25 °C);
2. retrotrascrizione (30 minuti a 42 °C);
3. inattivazione dell'enzima (5 minuti a 85 °C).

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



### 3.5.3 PCR Real-Time

Con l'avvento della Reazione a Catena della Polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), inventata da Kary Mullis nel 1983, è stato possibile amplificare frammenti di DNA molto rapidamente, ottenendo milioni di copie in poche ore, offrendo così nuove opportunità ai ricercatori. La PCR si basa sulla capacità dell'enzima DNA polimerasi di sintetizzare *in vitro* nuovi filamenti di DNA complementari ad un filamento stampo, ossia di effettuare ciò che accade normalmente *in vivo* durante il processo di duplicazione del DNA (Fig. 3.8).

Nel 1993 Higuchi et al. introdussero il monitoraggio *real-time*, o cinetico, delle reazioni di amplificazione del DNA: nella PCR convenzionale il prodotto amplificato, o amplicone, viene individuato e quantificato mediante un'analisi di *endpoint* effettuata attraverso un'elettroforesi su gel di agarosio, mentre la PCR real-time consente di misurare l'accumulo di amplicone durante l'avanzamento della reazione, ovvero in "tempo reale", appunto (BIO-RAD, Real-Time PCR Applications Guide - Sigma-Aldrich, qPCR Technical Guide).

La rivelazione dei prodotti di PCR è resa possibile includendo nella reazione una molecola fluorescente che indichi un aumento nel DNA mediante una crescita proporzionale nel segnale fluorescente. Le sostanze che vengono impiegate a questo scopo sono coloranti fluorescenti che intercalano sul DNA a doppio filamento (legame aspecifico) e le "sonde" sequenza-specifiche che consistono di oligonucleotidi, marcati con molecole fluorescenti, che ibridizzano con la sequenza complementare sul DNA a singolo filamento. Vengono quindi utilizzati specifici termociclatori in grado di monitorare la fluorescenza mentre avviene l'amplificazione: la fluorescenza misurata riflette il quantitativo di prodotto amplificato in ogni ciclo.

Il principale vantaggio della PCR real-time rispetto alla PCR convenzionale è che la prima consente di determinare il numero iniziale di copie del template con accuratezza e alta sensibilità in un ampio intervallo dinamico. Inoltre la PCR real-time non necessita di elettroforesi su gel, riducendo quindi il tempo di sperimentazione e aumentando il numero di dati forniti. Infine, siccome le reazioni vengono svolte e i dati valutati in sistemi chiusi, diminuiscono le possibilità di contaminazione (BIO-RAD, Real-Time PCR Applications Guide).

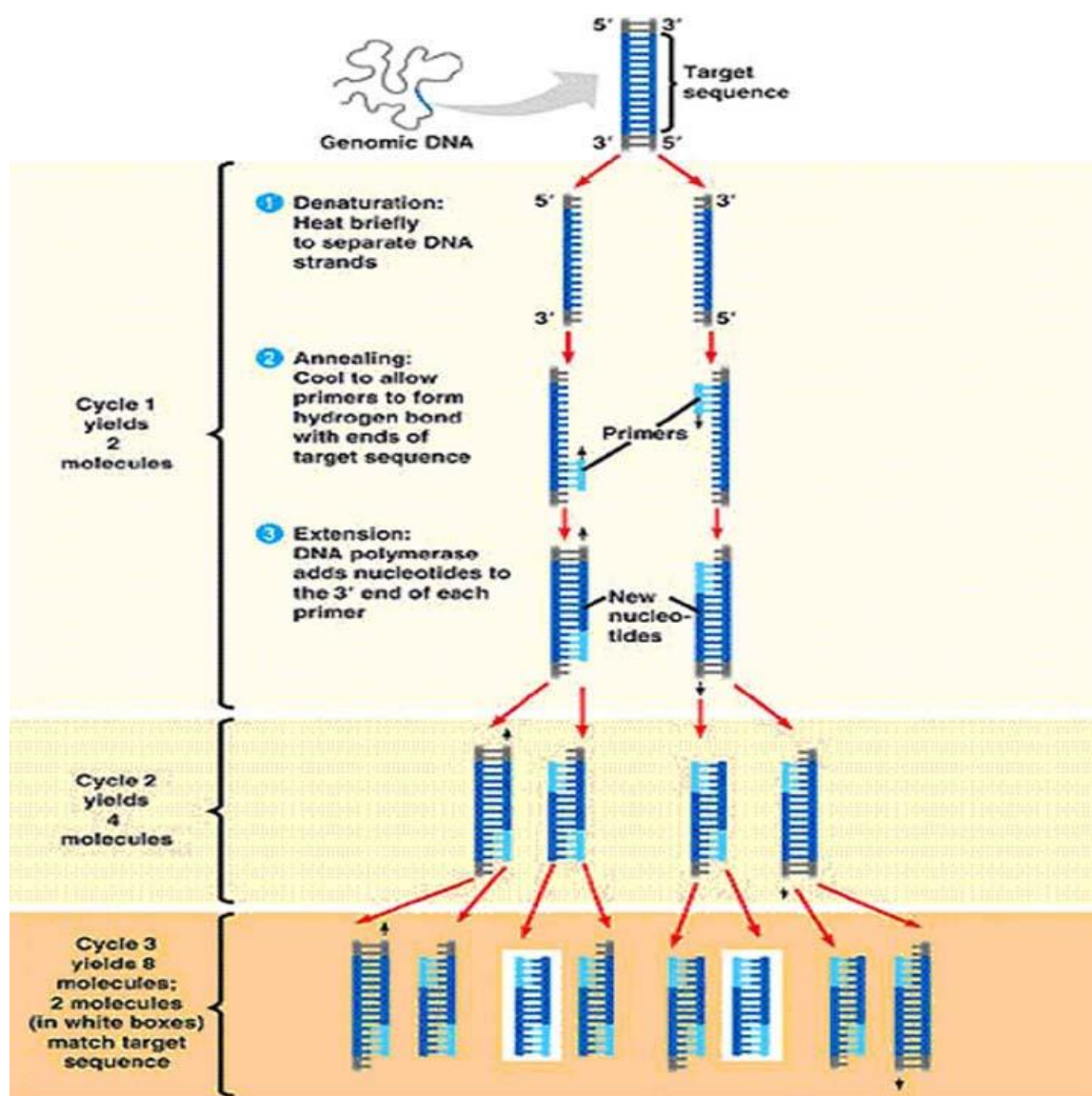


Fig. 3.8. Rappresentazione schematica di una reazione di PCR (www.aaranyak.org).

Per mostrare graficamente il procedere della reazione di PCR viene prodotto un grafico di amplificazione, ossia un grafico cartesiano standard in cui sull'asse della x si trova il numero del ciclo di PCR, mentre sull'asse delle y si trova la fluorescenza relativa  $\Delta R_n$ , calcolata come la fluorescenza del prodotto in ogni punto temporale meno la fluorescenza basale di background (Fig. 3.9).

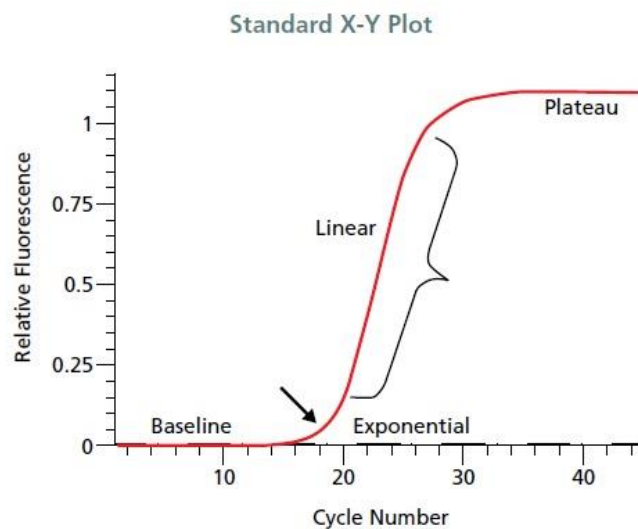
Come si può notare dal grafico, diverse fasi di amplificazione si susseguono:

1. la concentrazione iniziale di template è estremamente bassa; quindi la fluorescenza risultante dall'accumulo del prodotto non riesce ad essere rivelata dalla strumentazione, per cui la fluorescenza relativa rimane al livello della *baseline*;
2. quando la fluorescenza raggiunge un valore significativamente (statisticamente) sopra la linea di base inizia una fase esponenziale. Il ciclo in cui comincia tale fase è

denominato ciclo soglia (Threshold Cycle, Ct). La maggior parte degli strumenti calcola automaticamente il livello soglia di fluorescenza sulla base del segnale medio della *baseline* e fissando tale soglia a un valore 10 volte più alto rispetto al background medio o 10 volte più alto rispetto alla deviazione standard sempre del background medio.

Durante la fase esponenziale, il quantitativo di prodotto raddoppia approssimativamente ad ogni ciclo;

3. quando la reazione comincia a subire inibizioni, per esempio dovute a limitazioni nelle quantità dei reagenti, essa entra in una fase lineare;
4. infine, la reazione di amplificazione non riesce più ad avvenire e si raggiunge una fase di plateau, in cui si registra il massimo di fluorescenza.



**Fig. 3.9.** Amplification plot di una PCR real-time (Sigma-Aldrich, qPCR Technical Guide).

Il valore del ciclo soglia Ct è il parametro più importante in una PCR real-time: essendo misurato nella fase esponenziale, in cui i reagenti non sono limitati, esso consente di quantificare il template iniziale. Se all'inizio della reazione di amplificazione è presente una grande quantità di template, serviranno relativamente pochi cicli di amplificazione per accumulare abbastanza prodotto tale da mostrare un segnale fluorescente sopra il livello di background; la reazione avrà quindi un Ct basso.

Al contrario, se all'inizio della PCR è presente una modesta quantità di template, serviranno più cicli per far sì che il segnale fluorescente superi la *baseline*; di conseguenza la reazione avrà un Ct più alto (Arya et al., 2005 - BIO-RAD, Real-Time PCR Applications Guide - Sigma-Aldrich, qPCR Technical Guide).

### 3.5.3.1 La rivelazione dei prodotti di PCR

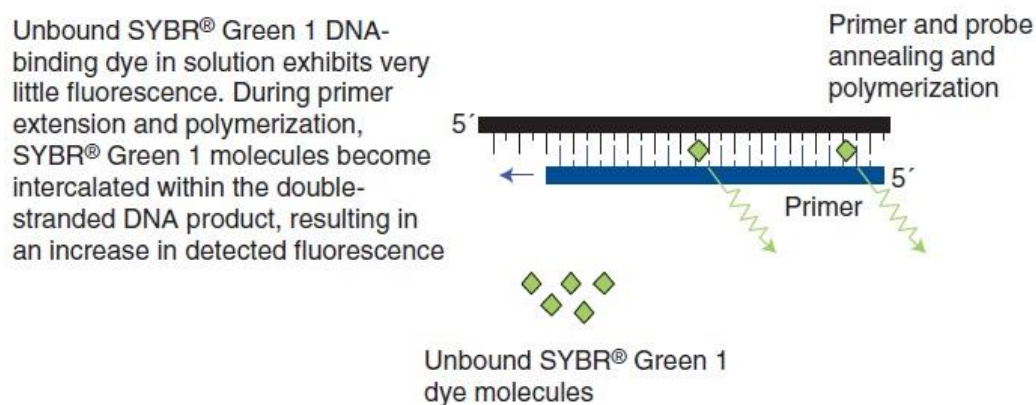
Un passaggio chiave nella pianificazione di un saggio di PCR real-time è costituito dalla scelta della sostanza chimica utilizzata per monitorare l'amplificazione della sequenza target.

La varietà di molecole fluorescenti disponibili può essere suddivisa in due tipologie fondamentali:

- molecole fluorescenti che si intercalano al DNA a doppio filamento (es. SYBR Green I);
- sonde sequenza-specifiche che consistono di oligonucleotidi marcati con molecole fluorescenti (es. TaqMan, *Molecular Beacons*, *Hybridization probe*, *Scorpion probe...*).

#### Molecole fluorescenti intercalanti del DNA

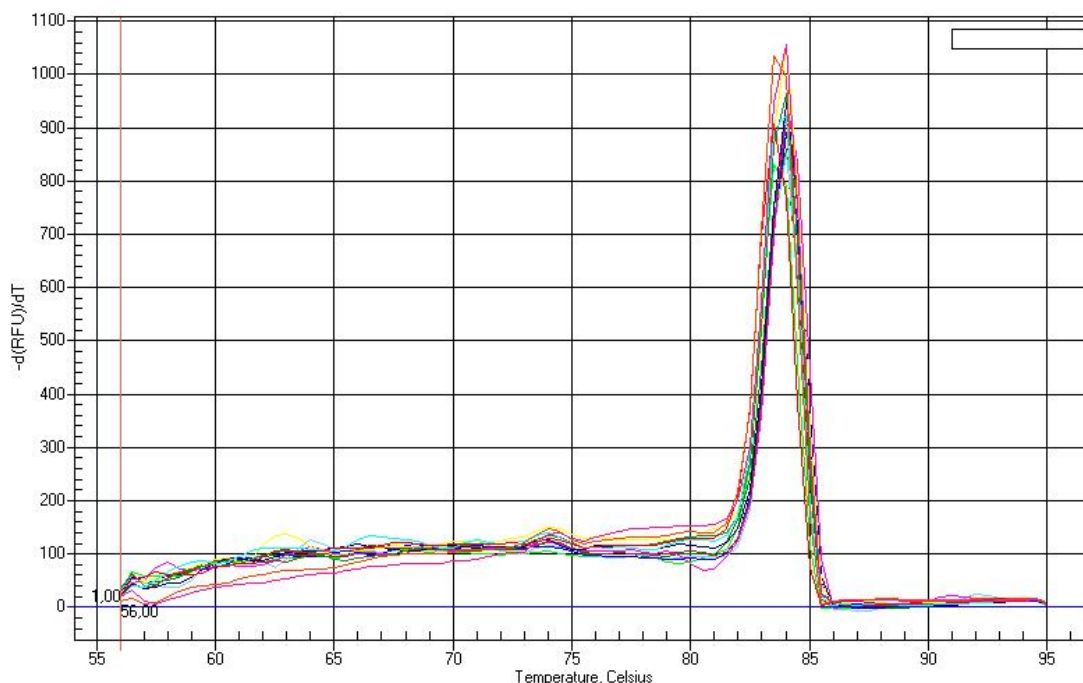
Il colorante più comunemente usato per la PCR real-time è il SYBR Green I, che si lega in modo aspecifico al DNA a doppio filamento (dsDNA). Se libero in soluzione, emette scarsa fluorescenza, ma quest'ultima aumenta fino a 1000 volte quando il SYBR Green si lega al dsDNA (Fig. 3.10). Quindi il segnale fluorescente di una reazione è proporzionale al quantitativo di dsDNA presente.



**Fig. 3.10.** Coloranti intercalanti sul DNA a doppio filamento: il SYBR Green I (Arya et al., 2005).

Dopo il completamento dell'amplificazione viene generata una curva di *melting* aumentando la temperatura e monitorando il segnale fluorescente: siccome il dsDNA si denatura, la fluorescenza diminuisce. La derivata prima negativa della variazione nella fluorescenza viene plottata in funzione della temperatura. Alla temperatura di *melting* dell'amplicone ( $T_m$ , la

temperatura alla quale il 50% di paia di basi di un duplex di DNA viene separato) un picco caratteristico lo distingue da altri prodotti, come i dimeri di primer, che hanno temperature di *melting* diverse (Fig. 3.11).



**Fig. 3.11.** Curva di melting o di dissociazione ([www.biomedcentral.com](http://www.biomedcentral.com)).

Il principale svantaggio dei coloranti intercalanti del DNA è la loro mancanza di specificità, ovvero il fatto che essi si legano a qualsiasi dsDNA. Di conseguenza, la presenza di prodotti aspecifici (come i dimeri di primer) può contribuire alla fluorescenza totale e influenzare l'accuratezza della quantificazione. (Arya et al., 2005 - BIO-RAD, Real-Time PCR Applications Guide).

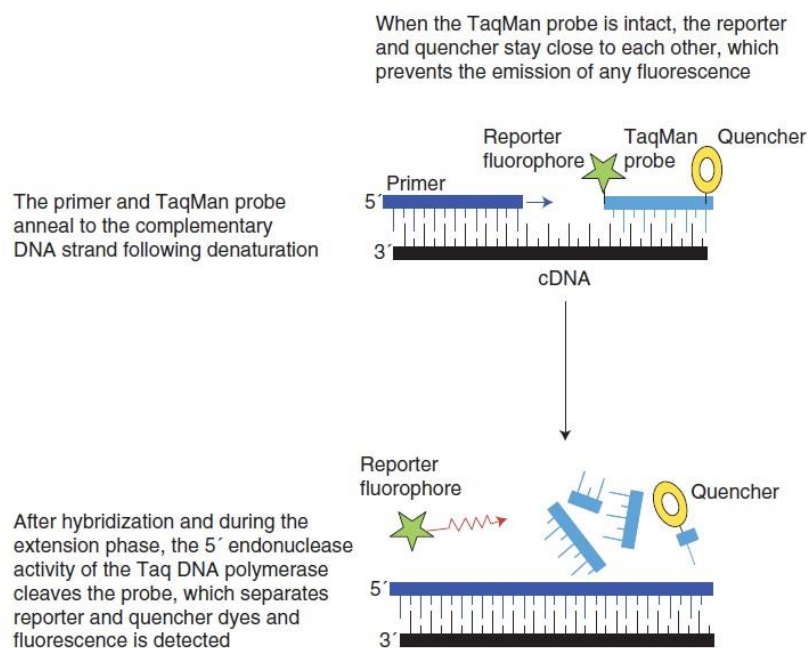
### Sonde fluorescenti

Le molecole utilizzate in questo tipo di rivelazione condividono alcune caratteristiche comuni. In generale sfruttano il fenomeno del trasferimento di energia per risonanza (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET), o qualche altre forma di smorzamento della fluorescenza, per fare in modo che il segnale fluorescente venga rivelato solo in presenza del prodotto di amplificazione. In questo modo viene garantito un sicuro vantaggio rispetto all'uso di coloranti intercalanti: la specificità della reazione assicura una maggiore accuratezza nella quantificazione.

D'altra parte, però, l'utilizzo di sonde comporta spesso costi più alti e una pianificazione non banale del saggio (Arya et al., 2005 - BIO-RAD, Real-Time PCR Applications Guide).

### Sonda TaqMan

La sonda TaqMan contiene un *reporter* fluorescente all'estremità 5' e un *quencher* all'estremità 3'. Mentre la sonda è intatta, la fluorescenza del *reporter* viene smorzata a causa della prossimità del *quencher*; durante le fasi di *annealing*/estensione della reazione di amplificazione, la sonda ibridizza al target e l'attività esonucleasica 5' → 3' della polimerasi idrolizza la sonda: ciò fa sì che il *reporter* venga separato dal *quencher* e che venga rivelato un segnale fluorescente, proporzionale al quantitativo di prodotto di amplificazione (Fig. 3.12) (Arya et al., 2005 - BIO-RAD, Real-Time PCR Applications Guide).



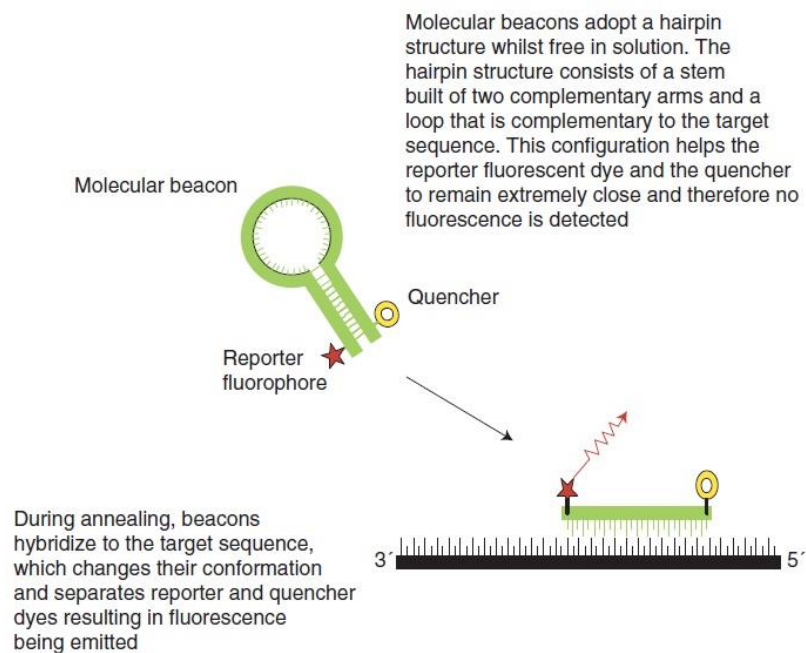
**Fig. 3.12.** Saggio TaqMan (Arya et al., 2005).

### Molecular Beacon

Tale sonda presenta una struttura a forcina, con un “fusto” e un anello. Un *reporter* fluorescente è attaccato all'estremità 5' e un *quencher* all'estremità 3'. L'anello è progettato in modo da ibridizzare specificamente a una sezione di 15-30 nucleotidi della sequenza target. Il “fusto” è formato da due successioni di 5-6 nucleotidi complementari gli uni agli altri. Quando la sonda si trova nella struttura a forcina, non viene rivelata alcuna fluorescenza a

causa della prossimità tra *reporter* e *quencher*. Durante la fase di *annealing* della reazione di amplificazione, il *beacon* si lega alla sequenza target, facendo in modo che *reporter* e *quencher* risultino separati e permettendo la rivelazione della fluorescenza, proporzionale alla quantità di amplicone (Fig. 3.13).

A differenza della sonda TaqMan, il *beacon* non viene distrutto durante l'amplificazione, perché viene utilizzata una DNA polimerasi che manca di attività esonucleasica (Arya et al., 2005 - BIO-RAD, Real-Time PCR Applications Guide).



**Fig. 3.13.** Molecular Beacon (Arya et al., 2005).

### *Hybridization probe*

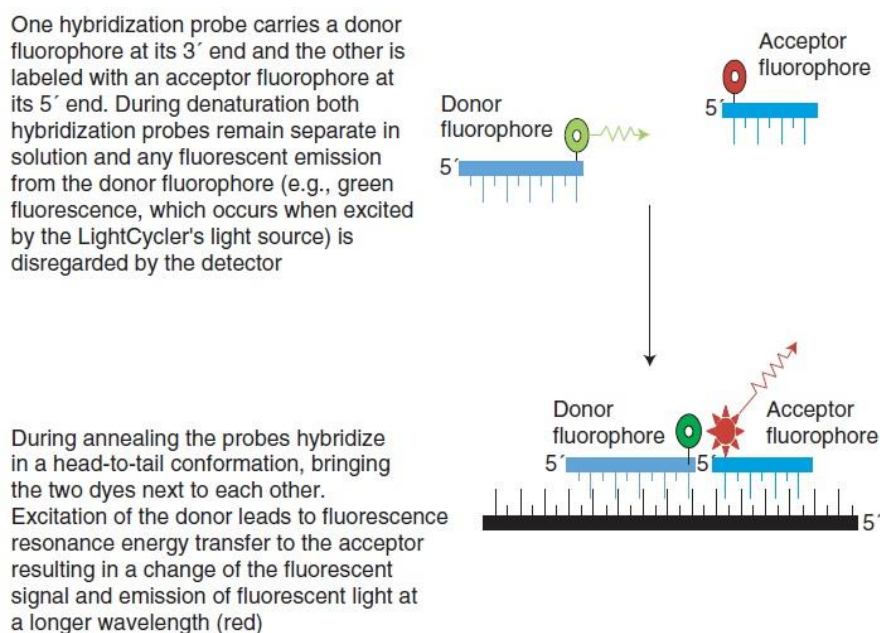
In questo tipo di saggio vengono impiegate due sonde di oligonucleotidi create in modo da legarsi a sequenze adiacenti sul target.

Una sonda contiene un fluoroforo donatore all'estremità 3', mentre la seconda un fluoroforo accettore all'estremità 5'. I due fluorofori vengono scelti in modo che lo spettro di emissione del donatore si sovrapponga significativamente allo spettro di eccitazione dell'accettore.

L'eccitazione viene svolta ad una lunghezza d'onda specifica per il donatore e la reazione è monitorata alla lunghezza d'onda di emissione dell'accettore. Durante lo step di *annealing* della PCR, le sonde ibridizzano sulle loro sequenze target in una disposizione testa-coda:

questo pone vicine le molecole fluorescenti, permettendo che avvenga il fenomeno di FRET dal donatore all'accettore.

Il quantitativo crescente di fluorescenza dell'accettore è proporzionale all'ammontare di amplicone presente (Fig. 3.14) (Arya et al., 2005 - BIO-RAD, Real-Time PCR Applications Guide).



**Fig. 3.14.** Hybridization probe (Arya et al., 2005).

### *Scorpion probe*

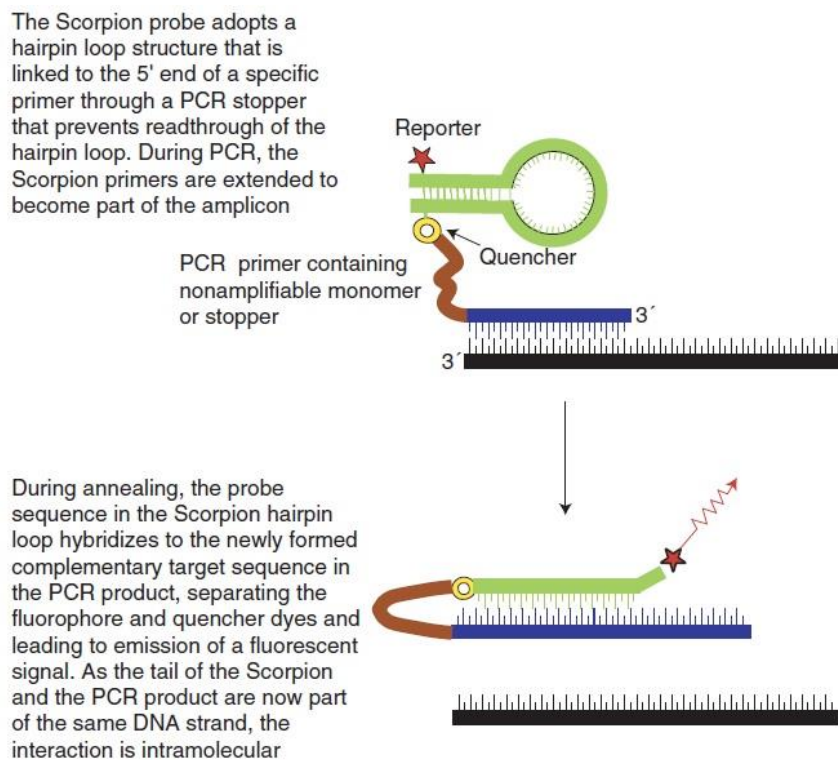
Simile al *Molecular beacon*, anche lo *Scorpion* ha una configurazione a forcina, con *reporter* all'estremità 5' e *quencher* all'estremità 3'. All'interno dell'anello si trova una serie di nucleotidi che ibridizzano sulla sequenza target dell'amplicone. Al *quencher* (quindi all'estremità 3' della forcina) è legato un monomero non amplificabile, chiamato anche *PCR stopper*, il quale è a sua volta legato all'estremità 5' di un *primer*.

Durante il primo ciclo di amplificazione, il *primer* viene allungato e, in tal modo, viene generata, sullo stesso filamento, la sequenza complementare alla serie nucleotidica dell'anello. Il *PCR stopper* serve per evitare che niente altro tranne che la porzione primer dello *Scorpion* venga copiata, cioè per impedire che venga copiata la sequenza della forcina dello *Scorpion*.

Dopo la denaturazione, la nuova fase di *annealing* fa sì che l'anello dello *Scorpion* ibridizzi al target sull'amplicone, in modo da separare *reporter* e *quencher* e da rivelare un segnale



fluorescente, proporzionale quindi alla quantità di amplicone (Fig. 3.15) (Arya et al., 2005 - BIO-RAD, Real-Time PCR Applications Guide).



**Fig. 3.15.** Scorpion probe (Arya et al., 2005).

### 3.5.3.2 Analisi dei dati

La quantificazione assoluta viene compiuta comparando i valori Ct dei campioni “sconosciuti” con una curva standard. Per costruire quest’ultima è richiesto un template di concentrazione nota; tale template viene poi diluito in serie e le soluzioni diluite servono come standard. La curva standard (nel caso il logaritmo del numero di copie di acido nucleico sia plottato contro Ct, la curva è una retta) viene quindi usata per determinare la quantità del target nei campioni “sconosciuti” mediante interpolazione. Il risultato dell’analisi è la quantità di acido nucleico (numero di copie,  $\mu\text{g}$ ) per un dato quantitativo di campione (per cellula,  $\mu\text{g}$  o RNA totale).

Nella quantificazione relativa, il risultato dell’analisi è invece un rapporto: il quantitativo relativo (*fold change*, differenza in numero di volte) di un acido nucleico target per quantità equivalenti di campioni test e di controllo. Per la normalizzazione del risultato viene di solito utilizzato il livello di espressione di uno o più controlli endogeni: essi sono geni di riferimento (detti anche *geni housekeeping*) teoricamente espressi a un livello costante nei diversi tessuti

di un organismo, in tutti gli stadi di sviluppo e in diverse condizioni sperimentali (Arya et al., 2005 - BIO-RAD, Real-Time PCR Applications Guide).

#### Quantificazione relativa normalizzata con un gene di riferimento

Nella quantificazione relativa un campione viene scelto come calibratore (o campione di controllo) e l'espressione del gene target in tutti gli altri campioni viene indicata come aumento o diminuzione rispetto al calibratore.

Per determinare l'espressione relativa di un gene target, devono essere determinati i livelli di espressione del gene target e del gene di riferimento sia per il campione test che per il calibratore. In pratica devono essere individuati i valori Ct come mostrato in Tabella 3.2

**Tabella 3.2.** Valori Ct richiesti per la quantificazione relativa normalizzata con un gene di riferimento.

|                     | Campione test         | Calibratore          |
|---------------------|-----------------------|----------------------|
| Gene target         | $Ct_{(target, test)}$ | $Ct_{(target, cal)}$ |
| Gene di riferimento | $Ct_{(ref, test)}$    | $Ct_{(ref, cal)}$    |

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

Per l'amplificazione dei trascritti di nostro interesse, sono stati utilizzati specifici primers per i geni in esame (Tabella 3.3).

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

| <b>Gene</b> | <b>Dimensione<br/>dell'amplicone<br/>(bp)</b> | <b>Efficienza<br/>dell'amplificazione<br/>(%)</b> | <b>Riferimento</b>             | <b>Numero di<br/>accesso<br/>GenBank</b> |
|-------------|---|---|--------------------------------|--|
| P-gp        | 139   | 112   | Franzellitti &<br>Fabbri, 2013 | EF057747                                 |
| MRP         | 194   | 100   | Della Torre et al.,<br>2014    | FM999810.2                               |
| CAT         | 132   | 96  | Koutsogiannaki et<br>al., 2014 | AY743716                                 |
| GST         | 172   | 100   | Koutsogiannaki et<br>al., 2014 | AF527010                                 |
| CA          | 102   | 95  |                                | LK934681                                 |
| EP          | 100   | 100   |                                | AY364453                                 |

In accordo con le linee guida internazionali che definiscono i criteri di validità e qualità per i protocolli di qPCR (linee guida MIQE, Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time Experiments; Bustin et al., 2009), l'efficienza della reazione è stata calcolata dalla pendenza (slope) di una retta di regressione ottenuta correlando i valori Ct e la quantità nominale di RNA ottenuta a partire da diluizioni scalari di un campione di cDNA (ciascuna diluizione è stata analizzata in triplicato). I valori ottenuti in questo lavoro di Tesi sono risultati conformi con quelli riportati nei precedenti lavori (Tabella 3.3).

Tutte le reazioni sono state condotte in un sistema per PCR real-time del tipo StepOne (Life Technologies), impiegando un protocollo termico standard del tipo "fast mode". Sia per l'amplificazione dei geni bersaglio che per i controlli endogeni, le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 10 µL contenente: iTaq Universal Master mix (Biorad Laboratories) 2X contenente tutti i reagenti necessari per l'amplificazione (DNA polimerasi, dNTPs, etc...) e il reporter Sybr Green I, i due primers forward e reverse, ciascuno alla concentrazione 0,2 o 0,5 µM (dipendente dalla coppia di primers utilizzata) e una quantità di cDNA corrispondente a 15 ng di RNA totale di partenza. I controlli endogeni utilizzati in questo lavoro di Tesi sono *RNA elicasi (HEL)* il trascritto codificante il *fattore di eloganzione 1 (ef1)*. Il calcolo dei *fold change* e l'analisi dei risultati è stato effettuato attraverso i software StepOne e Expression Suite (Life Technologies), che utilizzano il

metodo di quantificazione relativa descritto da Schmittgen e Livak (2008). Questo si basa sul confronto dei valori di Ct rilevati per il gene bersaglio tra il campione in esame (e un campione di riferimento (ovvero il controllo sperimentale) attraverso le seguenti formule matematiche:

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

$\Delta Ct = Ct(\text{gene bersaglio}) - Ct(\text{media geometrica controllo endogeno})$  • le variazioni relative dei livelli d'espressione vengono quindi definite come:

$FI = (1+E)^{-\Delta\Delta Ct} = (1+E)^{-[\Delta Ct(\text{trattato}) - \Delta Ct(\text{controllo})]}$  Dove E è l'efficienza della reazione di PCR.

### **3.6 Trattamento statistico dei dati**

I dati sono stati analizzati utilizzando il pacchetto software statistico SigmaStat. Le differenze significative tra i campioni trattati e i controlli sono state determinate mediante l'ANOVA a una via, seguita da un confronto multiplo utilizzando il test di Bonferroni come test *post hoc*. Le differenze tra i dati sono state ritenute statisticamente significative per valori di  $p < 0,05$ .

## 4. Risultati

### 4.1 Osservazione delle fasi di sviluppo embrionale e larvale



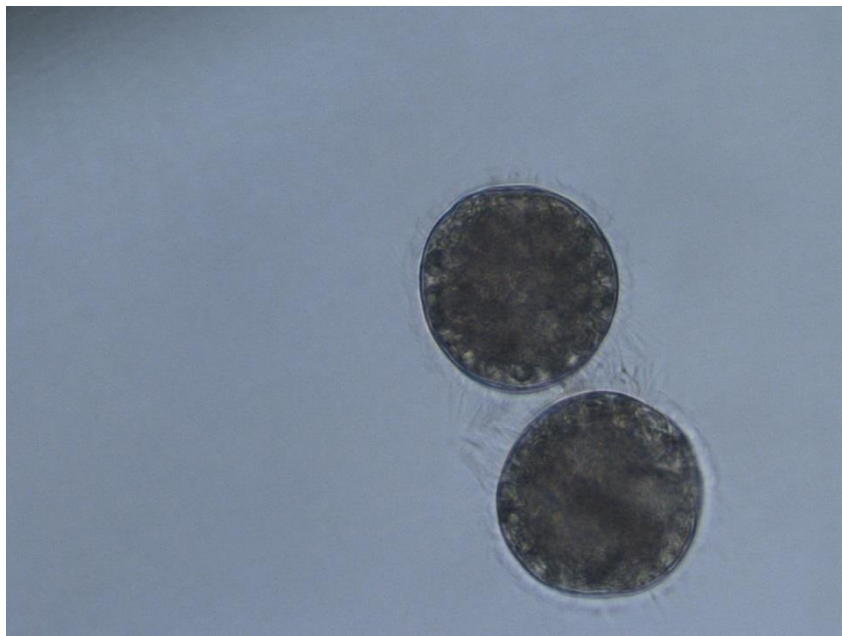
**Fig. 4.1.** Uovo fertilizzato con globulo polare 30 minuti dopo la fecondazione. Visualizzazione al microscopio ottico invertito con ingrandimento 32X.



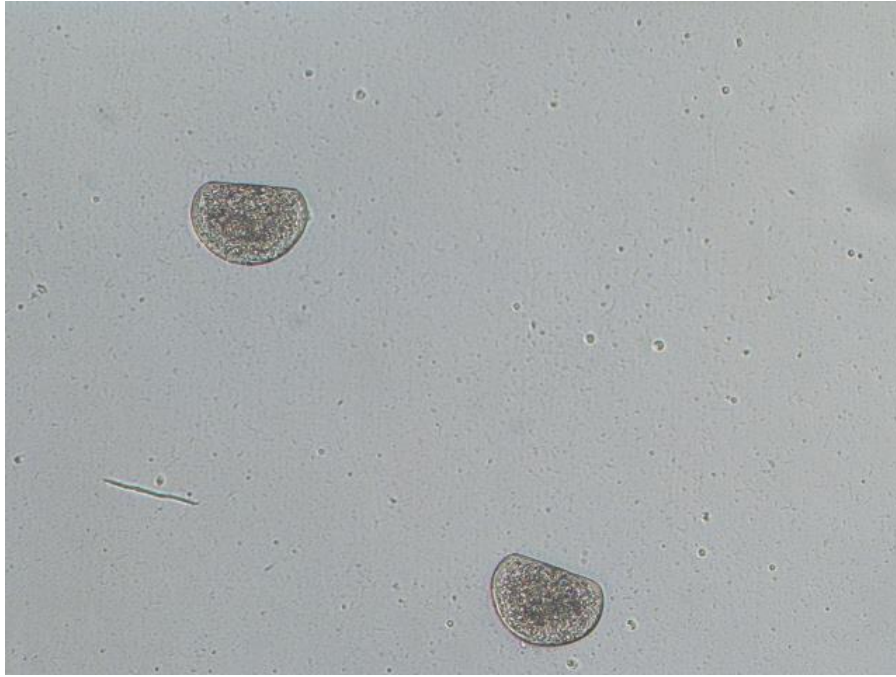
**Fig. 4.2.** Embrione in divisione, stadio a 4 cellule. Visualizzazione al microscopio ottico invertito con ingrandimento 32X.



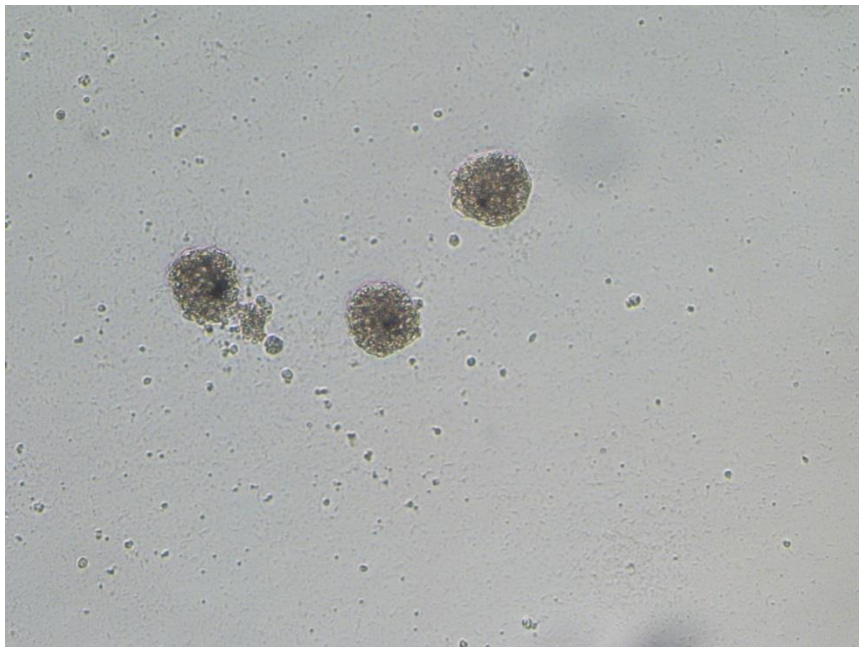
**Fig. 4.3.** Embrione in divisione cellulare. Visualizzazione al microscopio ottico invertito con ingrandimento 32X.



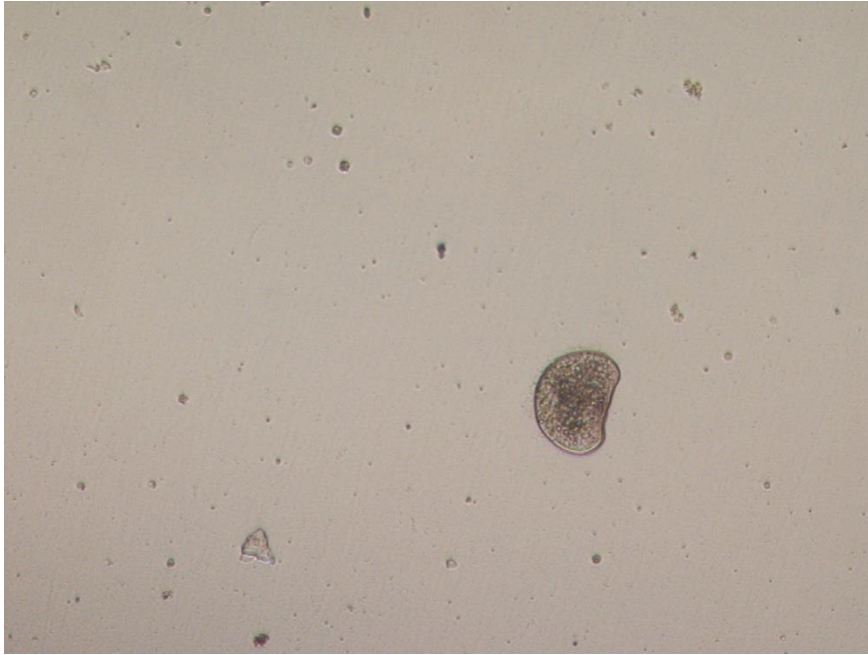
**Fig. 4.4.** Larve trocofore 24 ore dopo la fecondazione. Visualizzazione al microscopio ottico invertito con ingrandimento 32X.



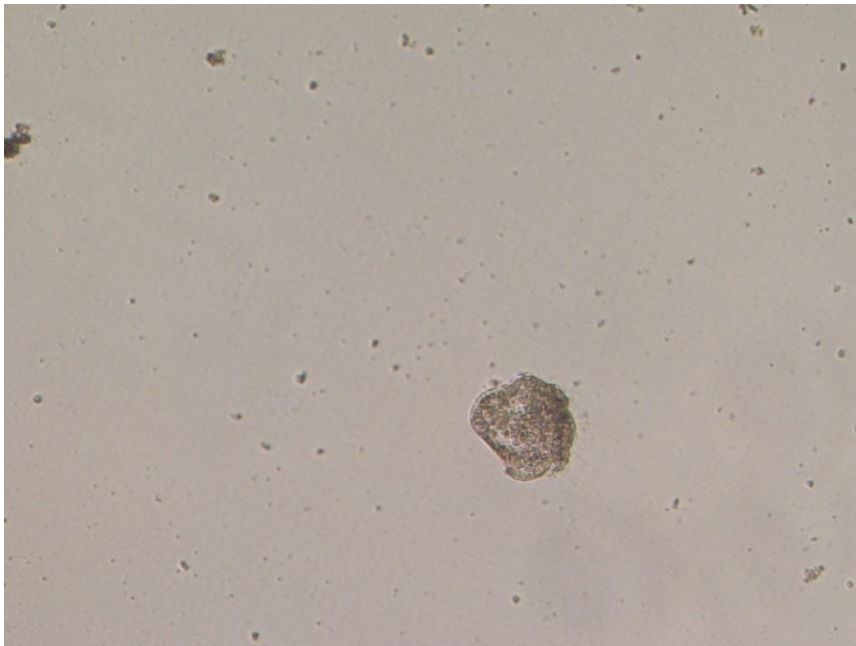
**Fig. 4.5.** Larve veliger 48 ore dopo la fecondazione. Visualizzazione al microscopio ottico invertito con ingrandimento 10X.



**Fig. 4.6.** Larve veliger malformate (ritardo nello sviluppo) 48 ore dopo la fecondazione. Visualizzazione al microscopio ottico invertito con ingrandimento 10X.



**Fig. 4.7.** Larva veliger malformata (cerniera convessa) 48 ore dopo la fecondazione. Visualizzazione al microscopio ottico invertito con ingrandimento 10X.



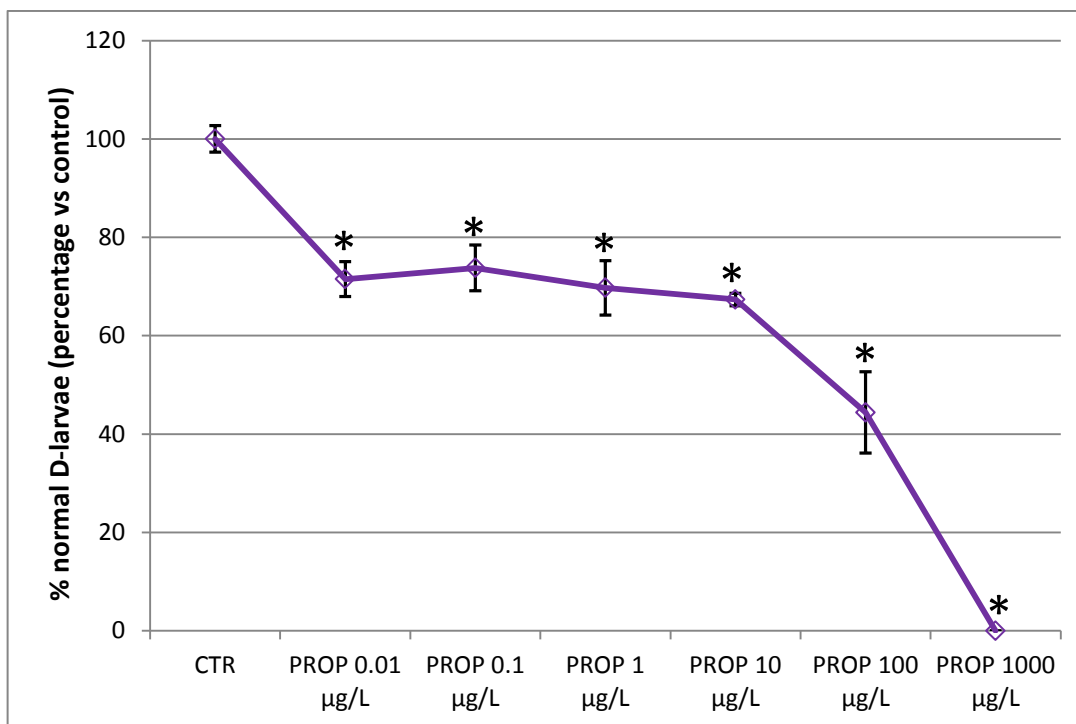
**Fig. 4.8.** Larva veliger malformata (mantello che protrude fuori dalla conchiglia) 48 ore dopo la fecondazione. Visualizzazione al microscopio ottico invertito con ingrandimento 10X.

Le diverse fasi dello sviluppo embrionale e larvale e le malformazioni dello stadio di larva veliger sono mostrate in Fig. 4.1 – 4.8.



## 4.2 Saggio di embriotossicità

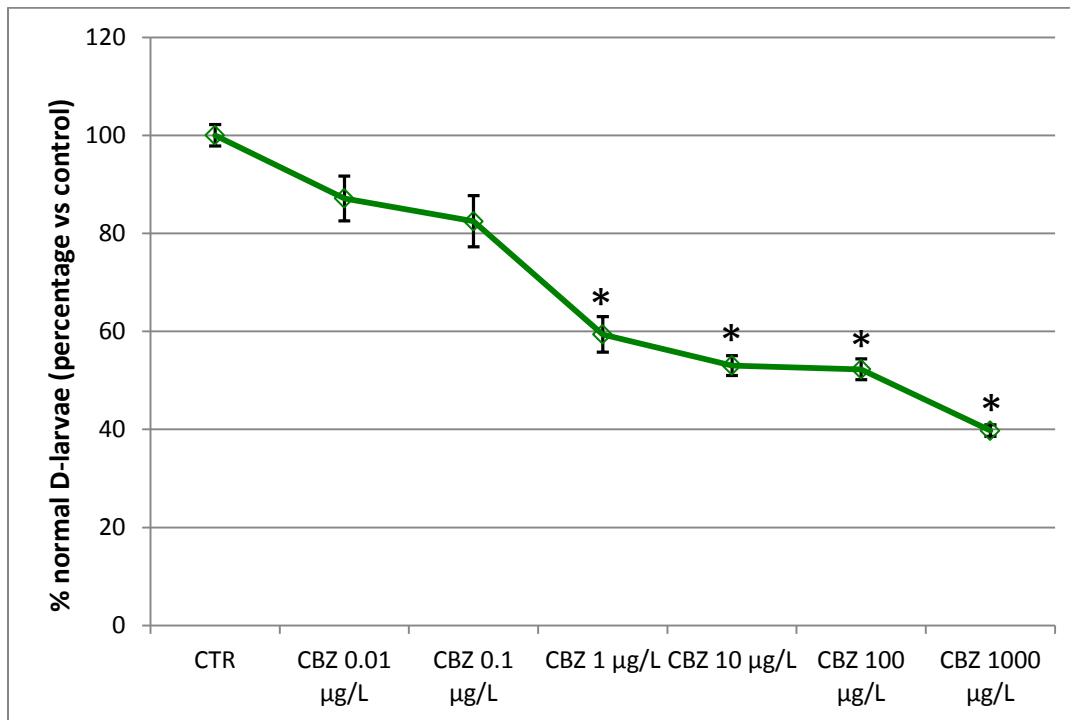
### 4.2.1 Test con propranololo



**Fig. 4.9.** Effetti di diverse concentrazioni di propranololo (0,01 - 0,1 - 1 - 10 - 100 - 1000 µg/L) sul normale sviluppo larvale di *Mytilus galloprovincialis* nel test di embriotossicità. I dati sono riportati come percentuale di larve veliger normali rispetto alla percentuale del controllo e sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 6). Gli asterischi indicano valori significativamente diversi dal controllo: \*p < 0,05.

In tutti i trattamenti effettuati col propranololo, ovvero a tutte le concentrazioni saggate, si è riscontrata una diminuzione statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) della percentuale di larve veliger normali (senza malformazioni o ritardi nello sviluppo) rispetto al controllo. Alla concentrazione più alta tra quelle testate (1000 µg/L) è stata osservata l'assenza totale di larve veliger normali (Fig. 4.9).

#### 4.2.2 Test con carbamazepina

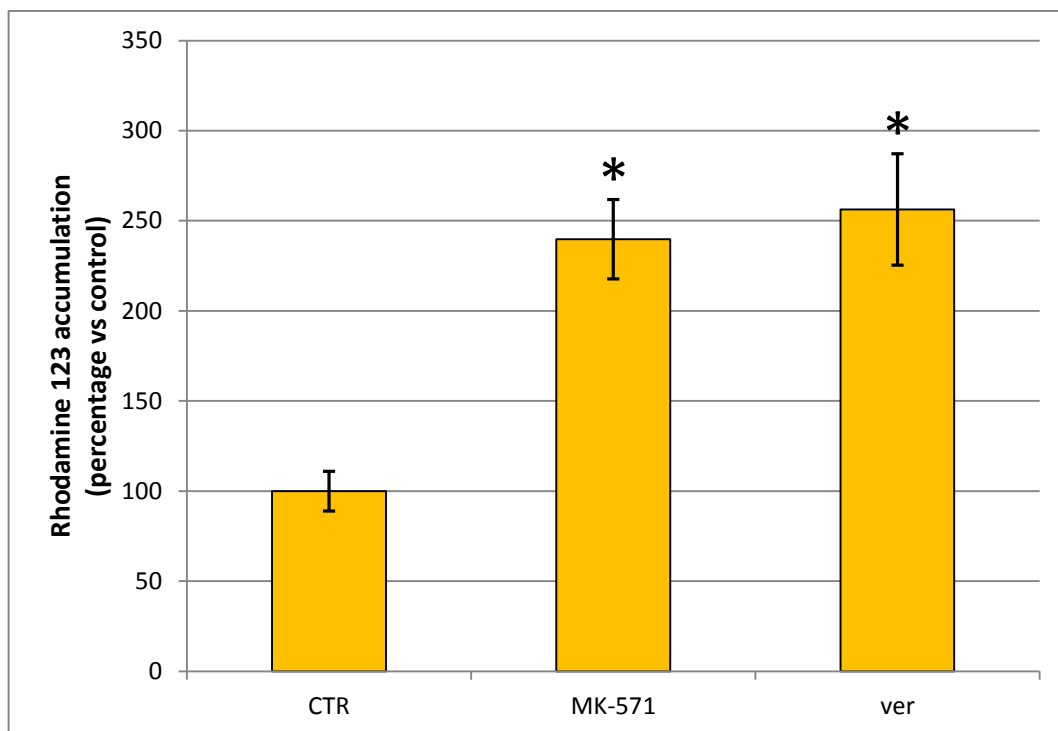


**Fig. 4.10.** Effetti di diverse concentrazioni di carbamazepina (0,01 - 0,1 - 1 - 10 - 100 - 1000 µg/L) sul normale sviluppo larvale di *Mytilus galloprovincialis* nel test di embriotossicità. I dati sono riportati come percentuale di larve veliger normali rispetto alla percentuale del controllo e sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 4). Gli asterischi indicano valori significativamente diversi dal controllo: \*p < 0,05.

A partire dal trattamento con concentrazione di carbamazepina pari a 1 µg/L si è riscontrata una diminuzione statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) della percentuale di larve veliger normali (senza malformazioni o ritardi nello sviluppo) rispetto al controllo. Anche alle concentrazioni di 0,01 e 0,1 µg/L è stata osservata una riduzione della percentuale di veliger normali rispetto al controllo, ma tale riduzione non è statisticamente significativa (Fig. 4.10).

## 4.3 Saggio di valutazione dell'attività delle proteine MXR

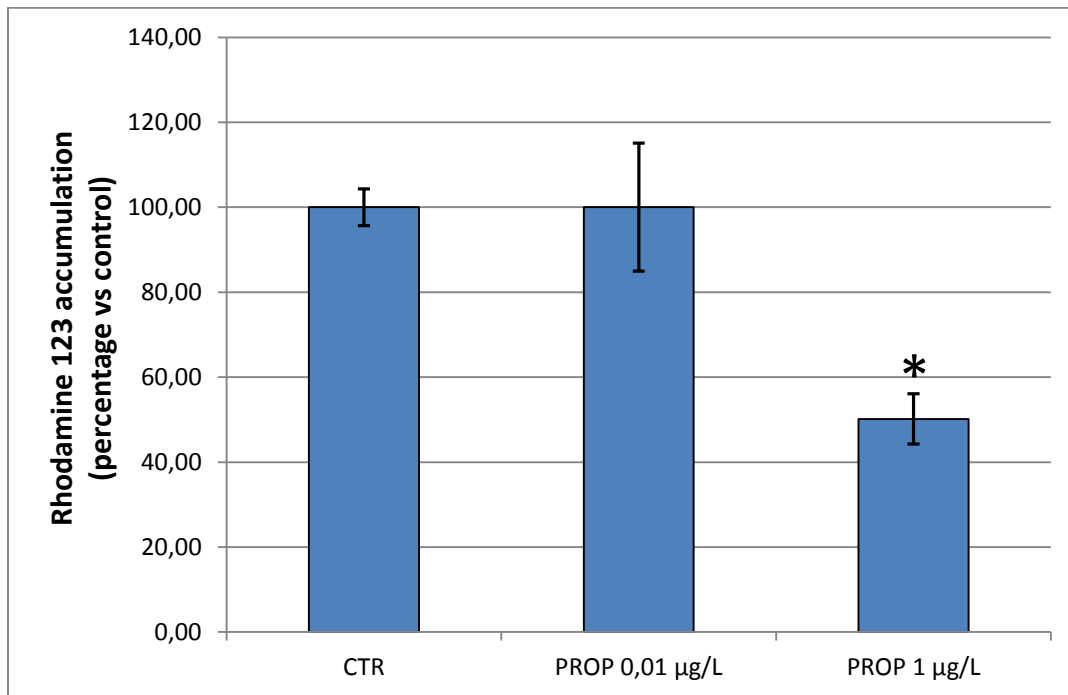
### 4.3.1 Test con inibitori



**Fig. 4.11.** Accumulo di rodamina 123 all'interno delle cellule delle larve veliger in presenza di inibitori delle proteine MXR (MK-571 e verapamil). L'accumulo di rodamina 123 è inversamente proporzionale rispetto all'attività delle proteine MXR. I dati sono riportati come percentuale dei valori di controllo e sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 5). Gli asterischi indicano valori significativamente diversi dal controllo: \*p < 0,05.

In presenza di entrambe le tipologie di inibitori delle proteine MXR (MK-571, inibitore di MRP, e verapamil, inibitore di P-gp) si è verificato un aumento statisticamente significativo nell'accumulo di rodamina 123 rispetto al controllo, cioè l'attività delle proteine MXR è risultata significativamente minore per entrambi i trattamenti con inibitori rispetto al controllo (Fig. 4.11).

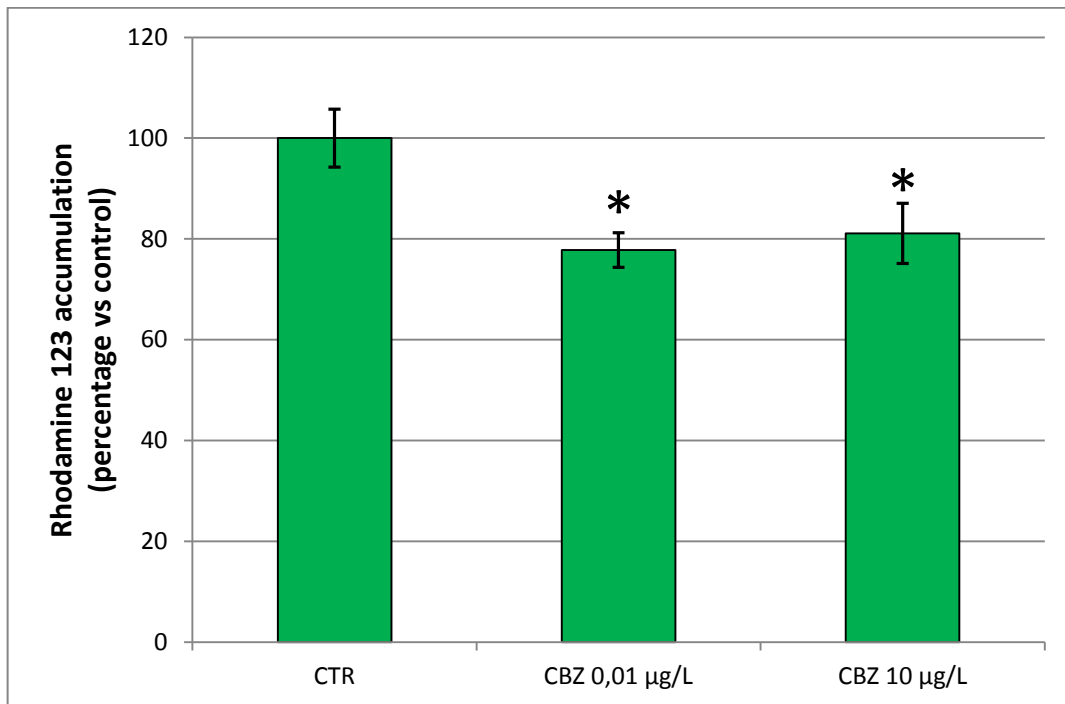
### 4.3.2 Test con propranololo



**Fig. 4.12.** Accumulo di rodamina 123 all'interno delle cellule delle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di propranololo (0,01 e 1 µg/L). L'accumulo di rodamina 123 è inversamente proporzionale rispetto all'attività delle proteine MXR. I dati sono riportati come percentuale dei valori di controllo e sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 6). L'asterisco indica un valore significativamente diverso dal controllo: \*p < 0,05.

Non è stata rilevata differenza nell'accumulo di rodamina 123 tra le larve di controllo e quelle esposte a 0,01 µg/L di propranololo, mentre alla concentrazione pari a 1 µg/L si è verificata una diminuzione statisticamente significativa rispetto al controllo, ovvero l'attività delle proteine MXR è risultata significativamente maggiore nel caso del trattamento a 1 µg/L di propranololo rispetto al controllo (Fig. 4.12).

### 4.3.3 Test con carbamazepina

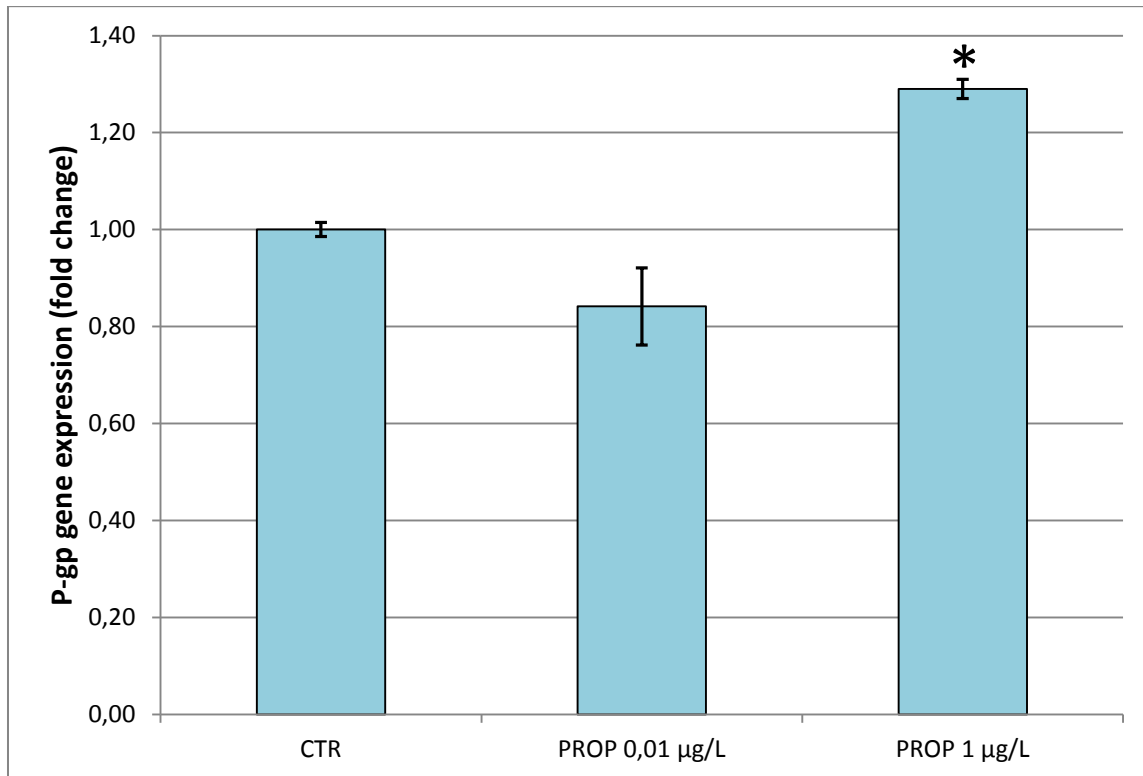


**Fig. 4.13.** Accumulo di rodamina 123 all'interno delle cellule delle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di carbamazepina (0,01 e 10 µg/L). L'accumulo di rodamina 123 è inversamente proporzionale rispetto all'attività delle proteine MXR. I dati sono riportati come percentuale dei valori di controllo e sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 4). Gli asterischi indicano valori significativamente diversi dal controllo: \*p < 0,05.

Ad entrambe le concentrazioni saggate (0,01 e 10 µg/L) è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa nell'accumulo di rodamina 123 rispetto al controllo, ovvero l'attività delle proteine MXR è risultata significativamente maggiore nei campioni trattati rispetto al controllo (Fig. 4.13).

## 4.4 Espressione genica

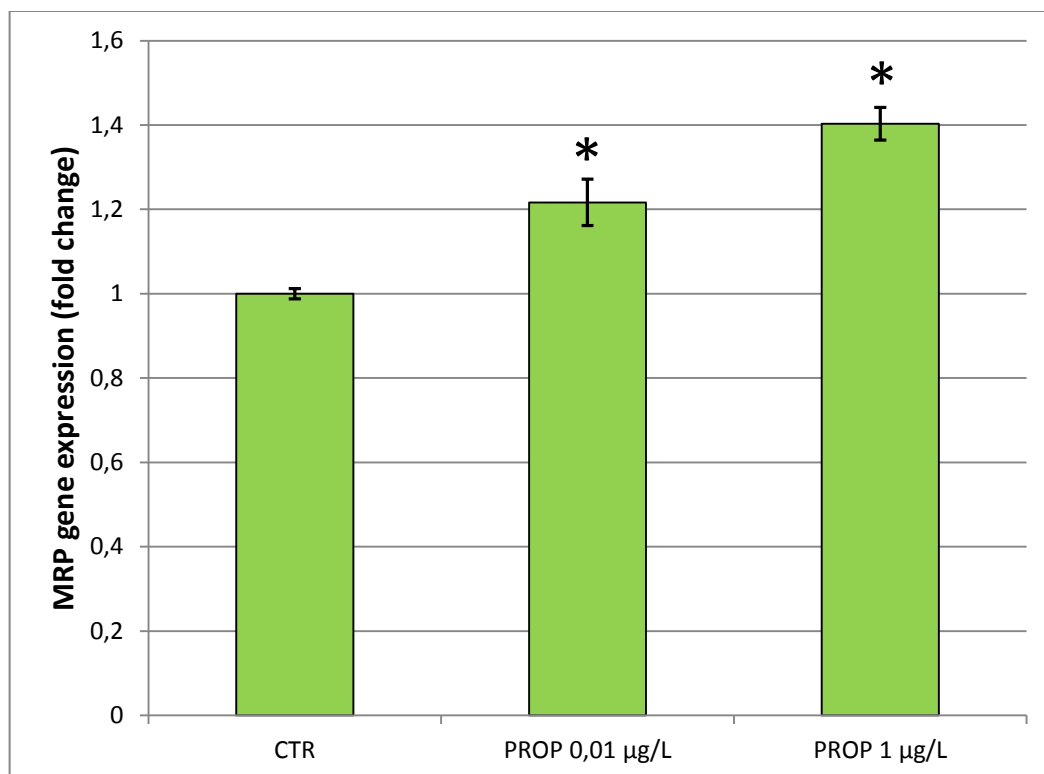
### 4.4.1 Espressione del gene codificante per la P-glicoproteina (P-gp) – Test con propranololo



**Fig. 4.14.** Livelli di espressione del gene codificante per P-gp nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di propranololo (0,01 e 1 µg/L). I dati sono espressi come media ± ES (n = 3) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo. L'asterisco indica un valore significativamente diverso dal controllo: \*p < 0,05.

Il gene che codifica per la P-glicoproteina (P-gp) è risultato sovra-espresso in modo statisticamente significativo rispetto al controllo nei campioni sottoposti a 1 µg/L di propranololo, mentre non si sono verificate variazioni statisticamente significative tra i campioni esposti a 0,01 µg/L di propranololo e il controllo (Fig. 4.14).

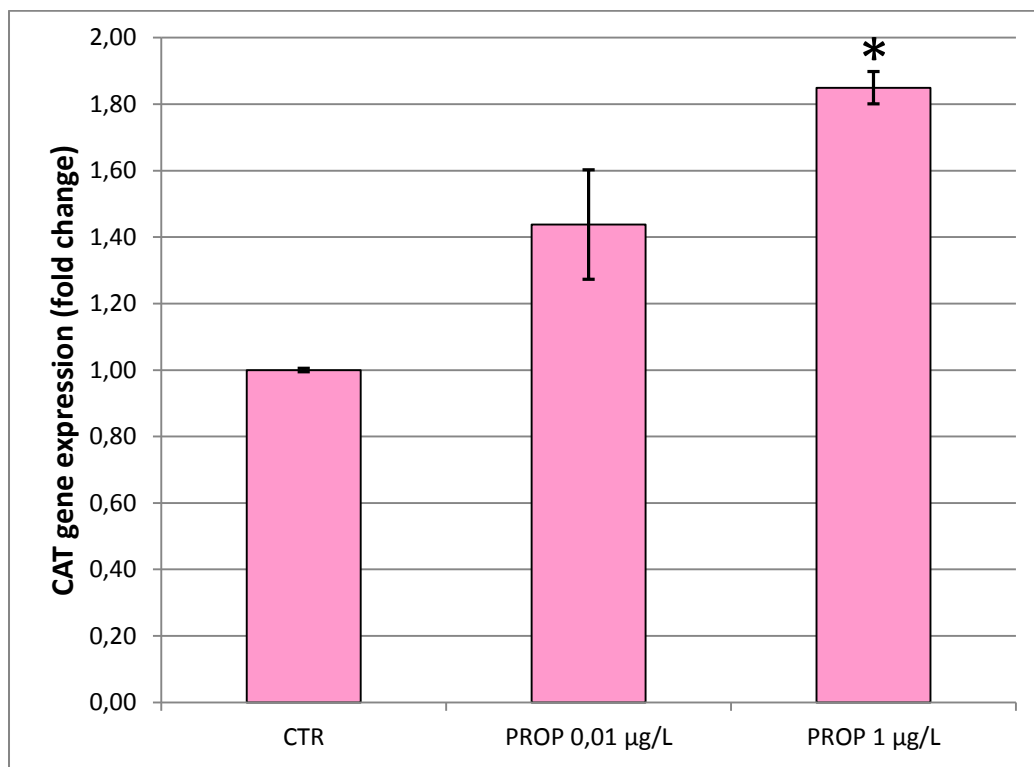
#### 4.4.2 Espressione del gene codificante per la *Multidrug Resistance-associated Protein* (MRP) – Test con propranololo



**Fig. 4.15.** Livelli di espressione del gene codificante per MRP nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di propranololo (0,01 e 1 µg/L). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 3) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo. Gli asterischi indicano valori significativamente diversi dal controllo: \*p < 0,05.

Ad entrambe le concentrazioni di propranololo saggate (0,01 e 1 µg/L) è stata evidenziata una sovra-espressione statisticamente significativa del gene codificante per la *Multidrug Resistance-associated Protein* (MRP) rispetto al controllo (Fig. 4.15).

#### 4.4.3 Espressione del gene codificante per la catalasi (CAT) – Test con propranololo

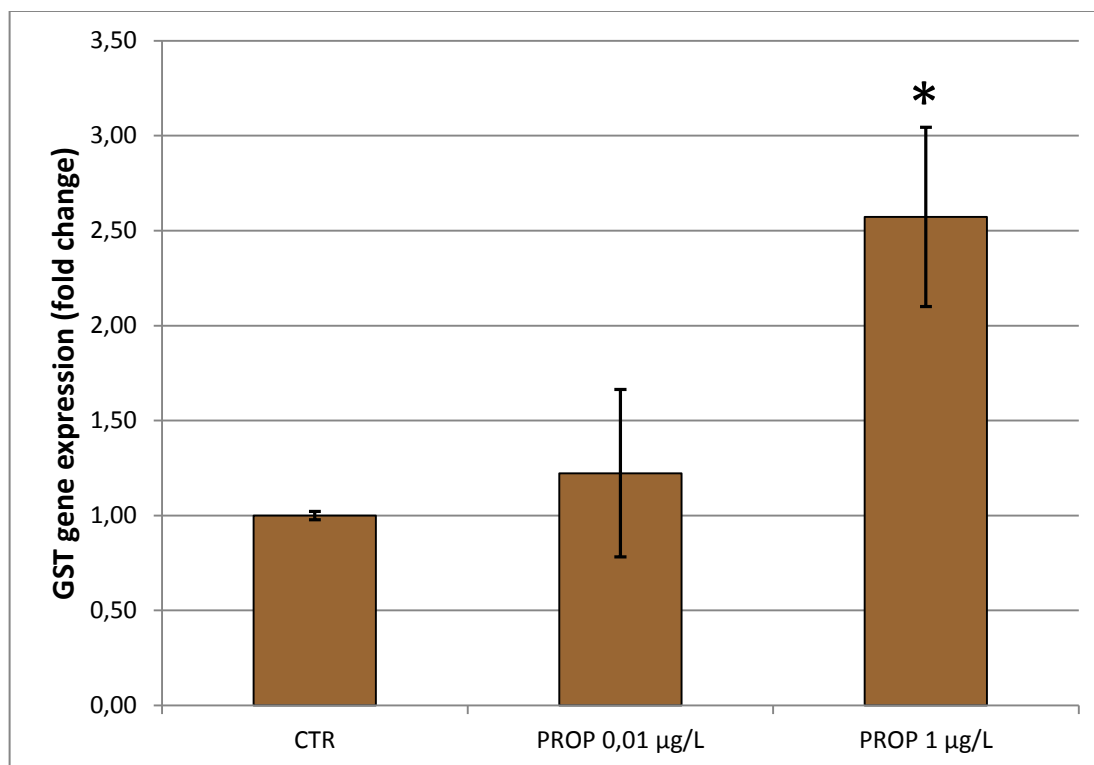


**Fig. 4.16.** Livelli di espressione del gene codificante per CAT nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di propranololo (0,01 e 1 µg/L). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 3) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo. L'asterisco indica un valore significativamente diverso dal controllo: \*p < 0,05.

Alla concentrazione di 1 µg/L di propranololo è stata osservata una sovra-espressione statisticamente significativa del gene codificante per la catalasi (CAT) rispetto al controllo. Alla concentrazione di 0,01 µg/L, invece, si è registrato un aumento nell'espressione di tale gene, ma questo aumento non è significativo (Fig. 4.16).



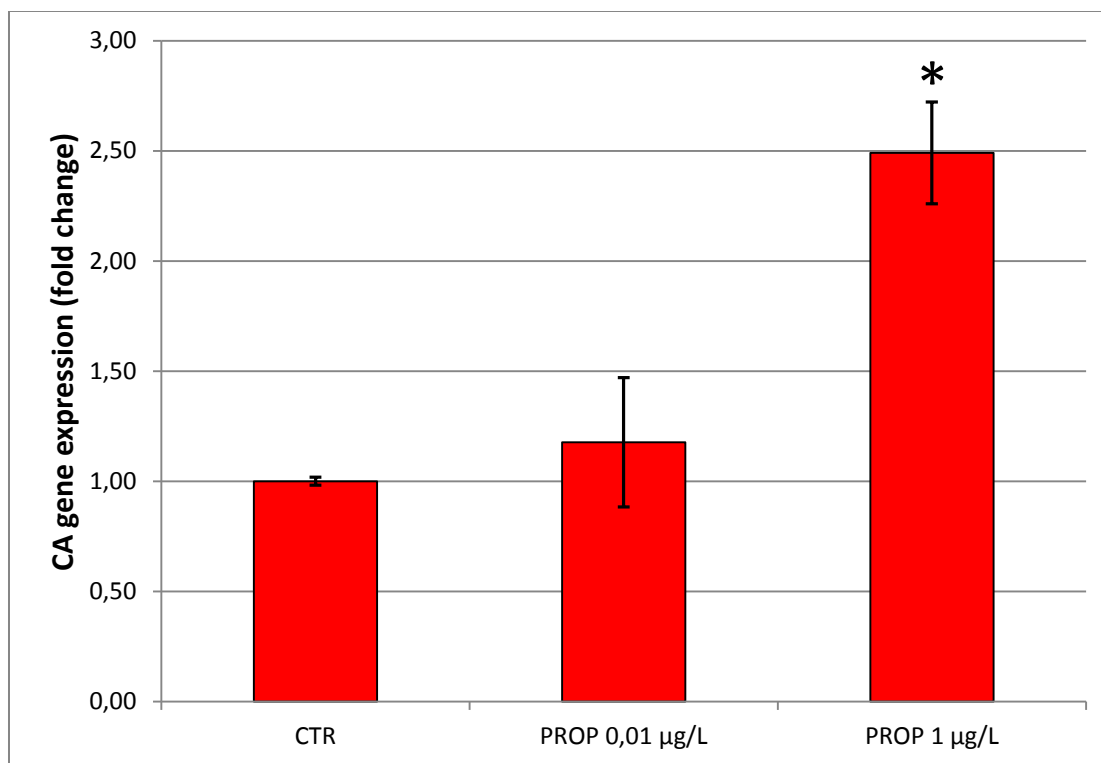
#### 4.4.4 Espressione del gene codificante per la glutazione S-transferasi (GST) – Test con propranololo



**Fig. 4.17.** Livelli di espressione del gene codificante per GST nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di propranololo (0,01 e 1 µg/L). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES ( $n = 3$ ) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo. L'asterisco indica un valore significativamente diverso dal controllo: \* $p < 0,05$ .

Il gene che codifica per la glutazione S-transferasi (GST) è risultato sovra-espresso in modo statisticamente significativo rispetto al controllo nei campioni sottoposti a 1 µg/L di propranololo, mentre non si sono verificate variazioni statisticamente significative tra i campioni esposti a 0,01 µg/L di propranololo e il controllo (Fig. 4.17).

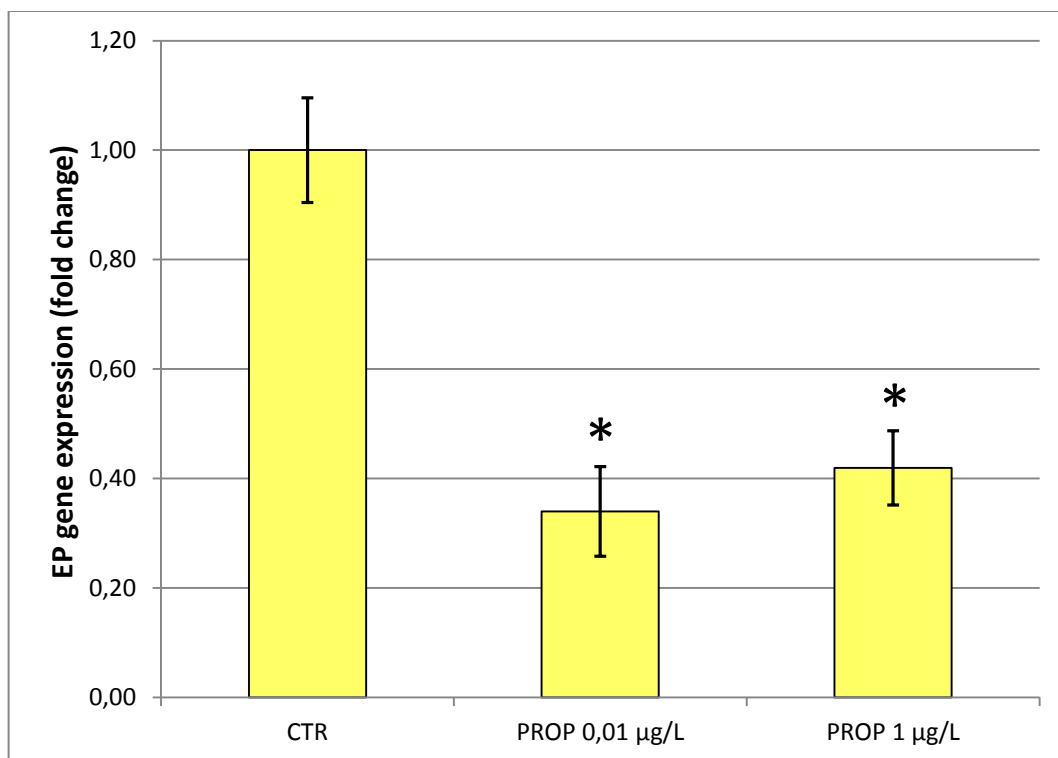
#### 4.4.5 Espressione del gene codificante per l'anidrasi carbonica (CA) – Test con propranololo



**Fig. 4.18.** Livelli di espressione del gene codificante per CA nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di propranololo (0,01 e 1 µg/L). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 3) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo. L'asterisco indica un valore significativamente diverso dal controllo: \*p < 0,05.

Alla concentrazione di 1 µg/L di propranololo è stata evidenziata una sovra-espressione statisticamente significativa del gene codificante per l'anidrasi carbonica (CA) rispetto al controllo. Alla concentrazione di 0,01 µg/L, invece, non si è registrata variazione nell'espressione rispetto al controllo (Fig. 4.18).

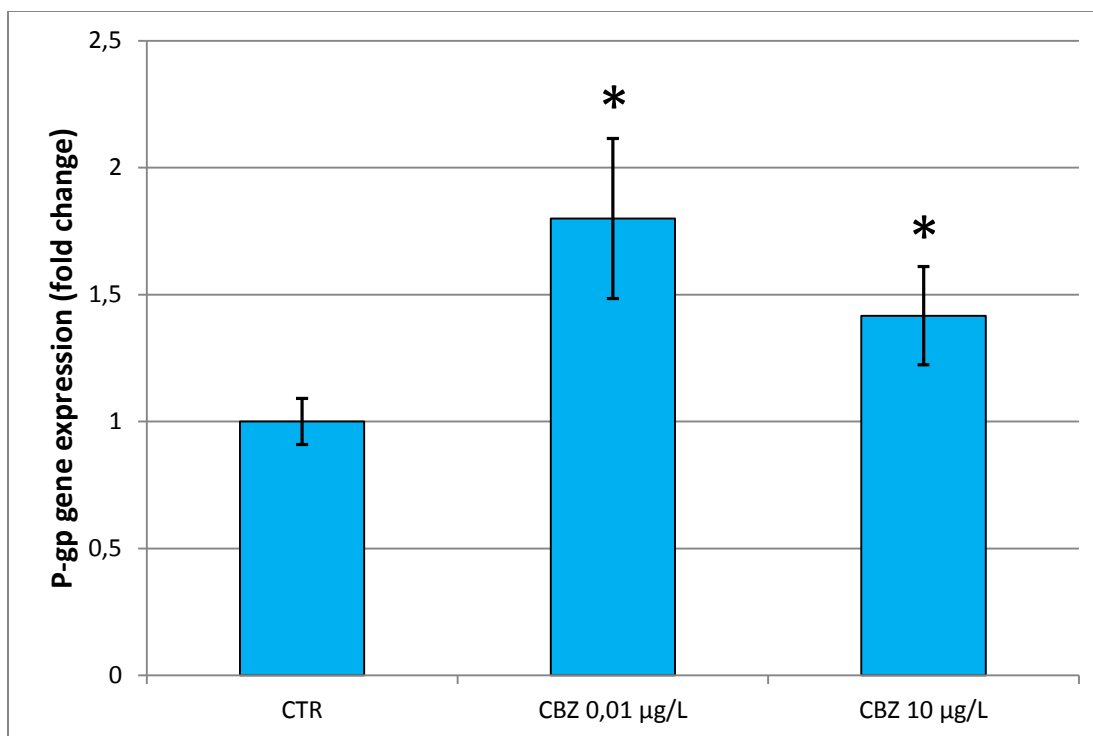
#### 4.4.6 Espressione del gene codificante per la proteina extrapalliale (EP) – Test con propranololo



**Fig. 4.19.** Livelli di espressione del gene codificante per EP nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di propranololo (0,01 e 1 µg/L). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES ( $n = 3$ ) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo. Gli asterischi indicano valori significativamente diversi dal controllo: \* $p < 0,05$ .

Il gene che codifica per la proteina extrapalliale (EP) è risultato sovra-espresso in modo statisticamente significativo rispetto al controllo nei campioni esposti a entrambe le concentrazioni saggate di propranololo (0,01 e 1 µg/L) (Fig. 4.19).

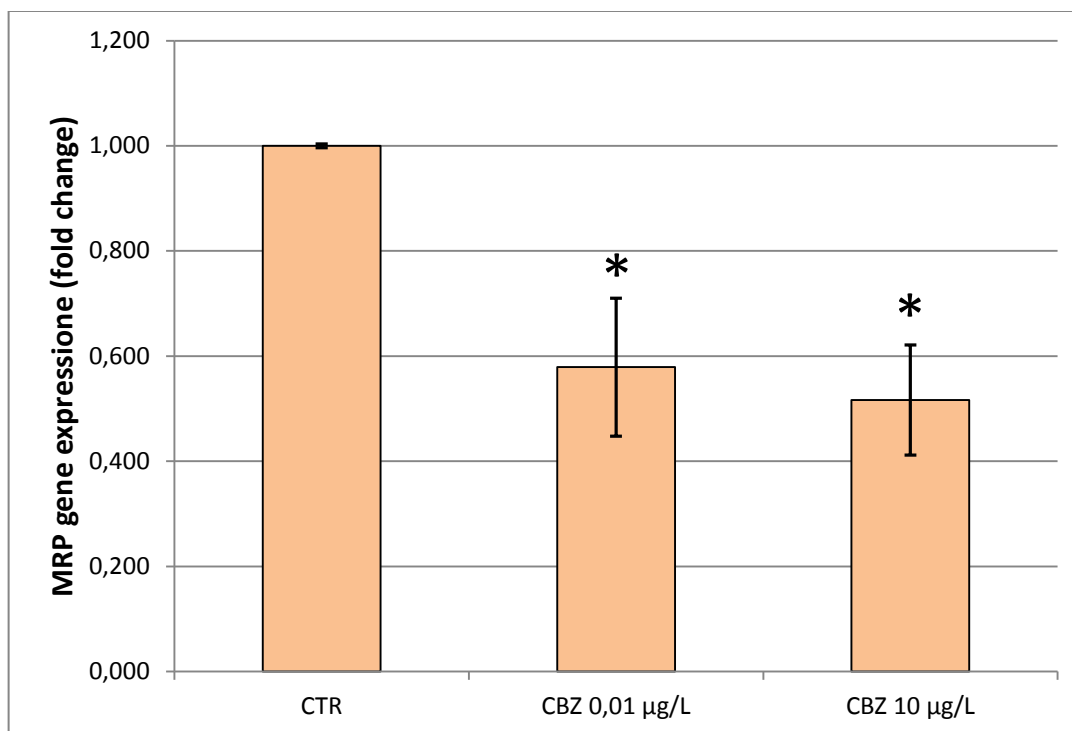
#### 4.4.7 Espressione del gene codificante per la P-glicoproteina (P-gp) – Test con carbamazepina



**Fig. 4.20.** Livelli di espressione del gene codificante per P-gp nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di carbamazepina (0,01 e 10 µg/L). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 3) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo. Gli asterischi indicano valori significativamente diversi dal controllo: \*p < 0,05.

Ad entrambe le concentrazioni di carbamazepina saggiate (0,01 e 10 µg/L) è stata evidenziata una sovra-espressione statisticamente significativa del gene codificante per la P-glicoproteina (P-gp) rispetto al controllo (Fig. 4.20).

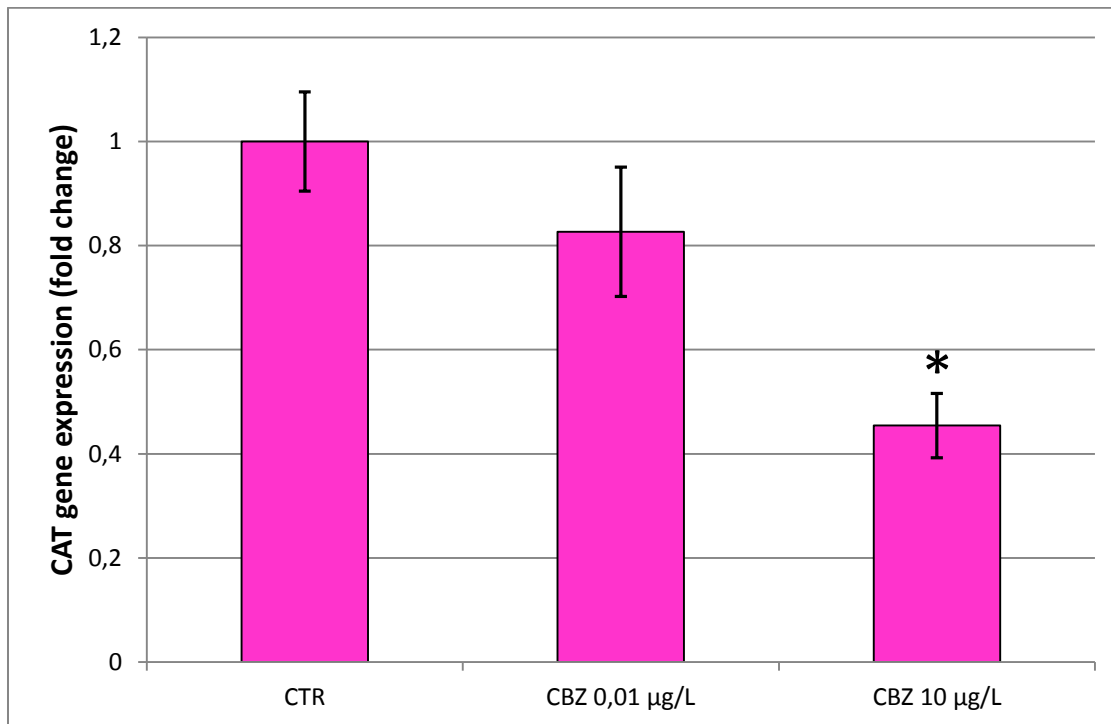
#### 4.4.8 Espressione del gene codificante per la *Multidrug Resistance-associated Protein* (MRP) – Test con carbamazepina



**Fig. 4.21.** Livelli di espressione del gene codificante per MRP nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di carbamazepina (0,01 e 10 µg/L). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 3) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo. Gli asterischi indicano valori significativamente diversi dal controllo: \*p < 0,05.

Il gene che codifica per la Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) è risultato sotto-espresso in modo statisticamente significativo rispetto al controllo nei campioni sottoposti a entrambe le concentrazioni saggate di carbamazepina (0,01 e 10 µg/L) (Fig. 4.21).

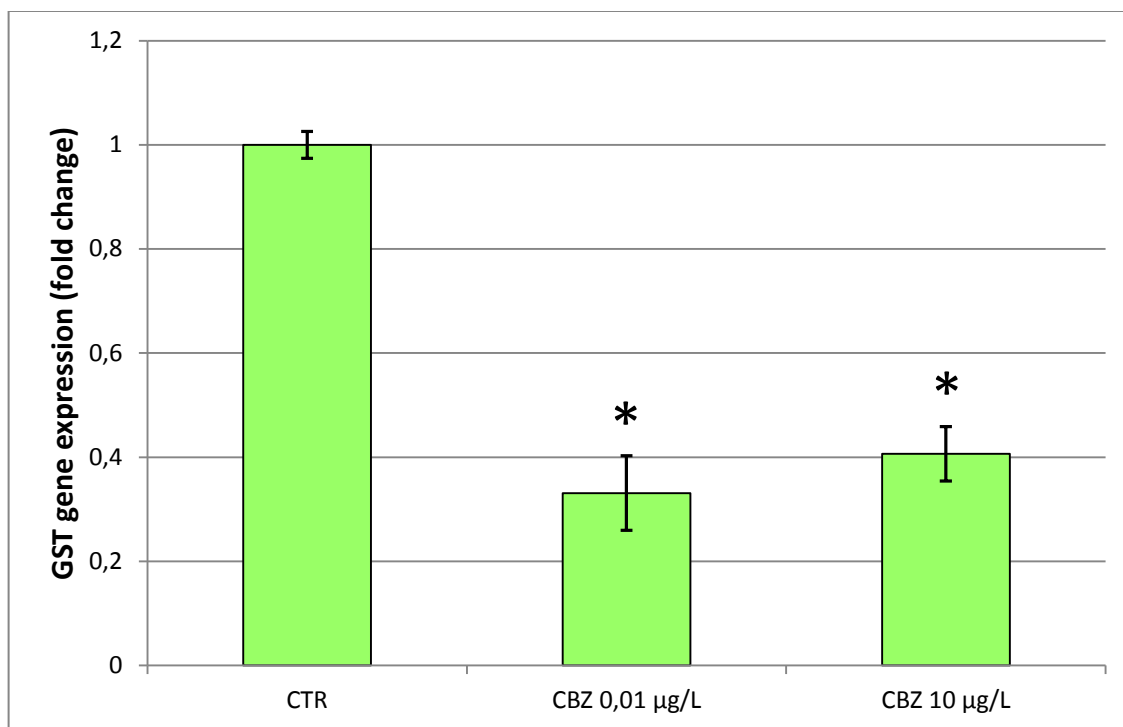
#### 4.4.9 Espressione del gene codificante per la catalasi (CAT) – Test con carbamazepina



**Fig. 4.22.** Livelli di espressione del gene codificante per CAT nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di carbamazepina (0,01 e 10 µg/L). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 3) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo. L'asterisco indica un valore significativamente diverso dal controllo: \*p < 0,05.

Alla concentrazione di 10 µg/L di carbamazepina è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa nell'espressione del gene che codifica per la catalasi (CAT) rispetto al controllo. Non ci sono variazioni significative, invece, tra campioni esposti a 0,01 µg/L di carbamazepina e controllo (Fig. 4.22).

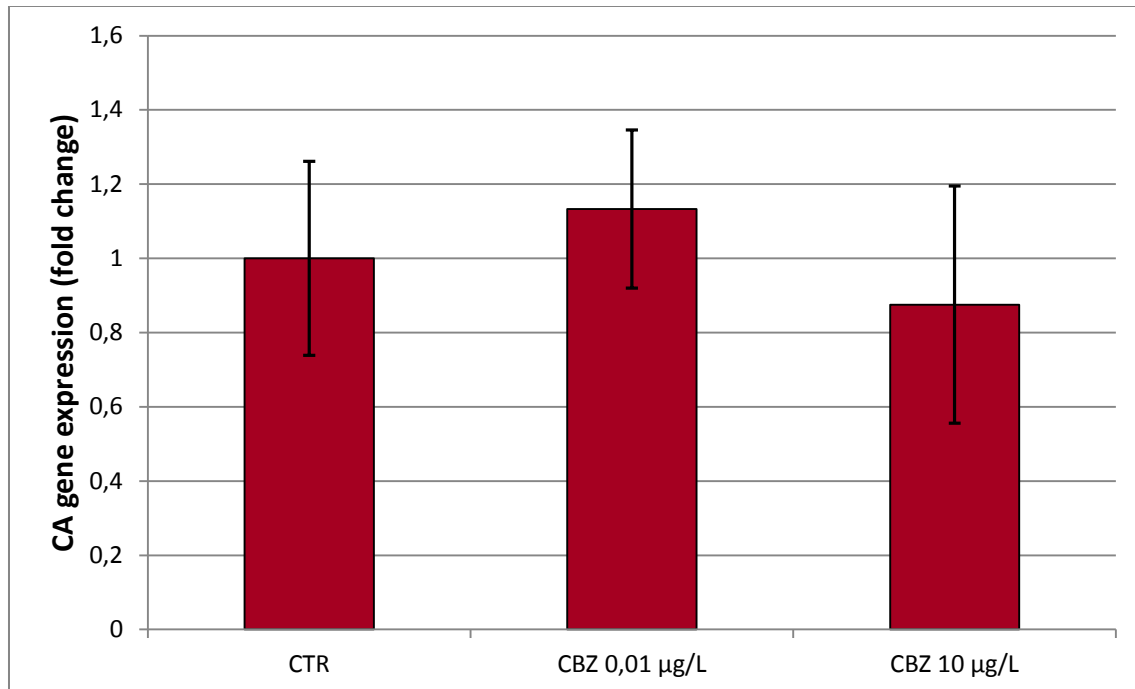
#### 4.4.10 Espressione del gene codificante per la glutatione S-transferasi (GST) – Test con carbamazepina



**Fig. 4.23.** Livelli di espressione del gene codificante per GST nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di carbamazepina (0,01 e 10 µg/L). I dati sono espressi come media ± ES (n = 3) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo. Gli asterischi indicano valori significativamente diversi dal controllo: \*p < 0,05.

Il gene che codifica per la glutatione S-transferasi (GST) è risultato sotto-espresso in modo statisticamente significativo rispetto al controllo nei campioni esposti a entrambe le concentrazioni saggate di carbamazepina (0,01 e 10 µg/L) (Fig. 4.23).

#### 4.4.11 Espressione del gene codificante per l'anidrasi carbonica (CA) – Test con carbamazepina

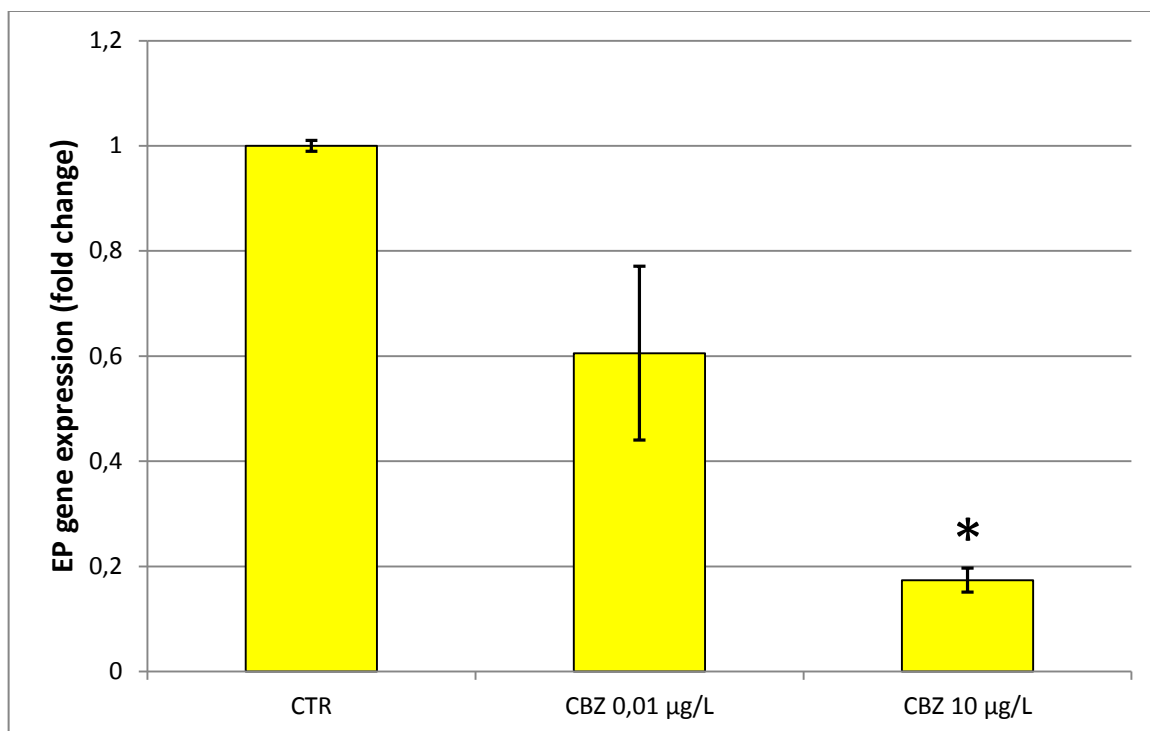


**Fig. 4.24.** Livelli di espressione del gene codificante per CA nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di carbamazepina (0,01 e 10 µg/L). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 3) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo.

Né nei campioni trattati con 0,01 µg/L di carbamazepina, né in quelli esposti a 10 µg/L dello stesso farmaco sono state registrate, rispetto al controllo, differenze statisticamente significative nell'espressione del gene che codifica per l'anidrasi carbonica (CA) (Fig. 4.24).



#### 4.4.12 Espressione del gene codificante per la proteina extrapalliale (EP) – Test con carbamazepina



**Fig. 4.25.** Livelli di espressione del gene codificante per EP nelle larve veliger esposte a due diverse concentrazioni di carbamazepina (0,01 e 10 µg/L). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n = 3) delle variazioni relative (*fold change*) tra trattamento e controllo. L'asterisco indica un valore significativamente diverso dal controllo: \*p < 0,05.

Alla concentrazione di 10 µg/L di carbamazepina è stata rilevata una diminuzione statisticamente significativa nell'espressione del gene che codifica per la proteina extrapalliale (EP) rispetto al controllo. Anche nei campioni esposti a 0,01 µg/L di carbamazepina si è registrato un tale andamento di riduzione nei livelli di espressione rispetto al controllo, ma la variazione non risulta significativa dal punto di vista statistico (Fig. 4.25).



## **5. Discussione e conclusioni**

Nonostante il problema della presenza dei farmaci in ambiente acquatico sia stato evidenziato a partire dagli anni '70, esso è stato per lungo tempo sottovalutato, in quanto la tossicità di tali sostanze è stata principalmente valutata mediante saggi acuti, tramite i quali si è arrivati alla conclusione che i farmaci non causino tossicità acuta nei confronti degli organismi acquatici, in quanto i valori di EC<sub>50</sub> risultano molto più alti rispetto alle concentrazioni che effettivamente si trovano in ambiente.

Negli ultimi anni, però, ci si è resi conto che tale tipologia di test risulta inadatta a determinare i potenziali danni che gli organismi viventi potrebbero subire, dal momento che i farmaci non sono inquinanti convenzionali. Essi sono infatti progettati per essere bioattivi a basse concentrazioni e sono concepiti per avere effetti terapeutici attraverso specifici meccanismi di azione. Nel caso in cui gli organismi non target che vengono a contatto con i farmaci in ambiente presentino i bersagli molecolari specifici dell'azione dei farmaci verso gli organismi target, allora anche essi possono subire effetti derivanti da tale esposizione. Inoltre non possono essere escluse anche ulteriori modalità di azione, differenti rispetto a quelle che agiscono sull'organismo target.

Per questi motivi è necessario adottare ulteriori test più mirati, pianificati focalizzandosi sul meccanismo di azione del farmaco e sui target molecolari specifici, valutando le risposte degli organismi esposti mediante *biomarker* a livello biochimico e molecolare.

Nell'ambito di tale prospettiva, è stato deciso di saggiare gli effetti di due farmaci, il propranololo e la carbamazepina, su uno stadio larvale del mitilo, *Mytilus galloprovincialis*, in quanto si tratta di una fase particolarmente delicata dello sviluppo di una specie molto utilizzata come organismo sentinella. Oltre al test di embriotossicità, svolto per determinare la presenza di malformazioni o ritardi nello sviluppo della larva, sono stati realizzati saggi di valutazione di risposte biochimico-molecolari, come lo studio dell'attività di proteine implicate nella *Multixenobiotic Resistance* (MXR) e l'analisi dell'espressione di geni che codificano per proteine coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici, nello stress ossidativo e nella biomineralizzazione.

Già a partire dalla concentrazione più bassa saggiata (0,01 µg/L), il propranololo dimostra di avere effetti dannosi sullo sviluppo larvale di *M. galloprovincialis*: si registra infatti una

diminuzione statisticamente significativa della percentuale di larve veliger normali (non malformate) rispetto al controllo. Tale riduzione si mantiene intorno allo stesso livello aumentando la concentrazione di farmaco somministrato fino ai 10 µg/L. A 100 µg/L si osserva un netto calo ulteriore, per poi arrivare all'assenza totale di larve veliger normali nei campioni esposti a 1000 µg/L (Fig. 4.9).

Risulta quindi evidente che le concentrazioni ambientali di propranololo alterino lo sviluppo fisiologico di *M. galloprovincialis*. Per questo motivo sono stati indagati vari meccanismi biochimico-molecolari, per capire dove tali alterazioni vengono prodotte.

In quanto considerevolmente coinvolte nelle reazioni delle cellule alla presenza di xenobiotici, sono state studiate le proteine MXR, in particolare la P-glicoproteina (P-gp) e la *Multidrug Resistance-associated Protein* (MRP).

Mediante i risultati del saggio di valutazione dell'attività delle proteine MXR con inibitori è possibile rilevare che entrambe le proteine sono presenti e attive nello stadio larvale veliger, dal momento che, utilizzando inibitori selettivi, l'accumulo di rodamina 123 (substrato dei trasportatori MXR) aumenta in modo significativo rispetto al controllo in entrambi i casi di inibizione (Fig. 4.11).

Questo risultato è in accordo con quanto verificato da Navarro et al. (2012) su un altro mitilo, ma di acqua dolce: *Dreissena polymorpha*. Navarro et al. hanno usato la calceina-am (Ca-AM) come *proxy* dell'attività di efflusso delle proteine MXR e come inibitori di tali proteine la reversina 205, che agisce su P-gp, e MK-571, che agisce su MRP. Entrambi gli inibitori hanno aumentato, in modo significativo rispetto al controllo, l'accumulo di calceina nelle larve 48 ore dopo la fecondazione: ciò significa che in tale stadio larvale sono presenti e attive sia P-gp che MRP (Navarro et al., 2012).

È stata poi valutata l'attività delle proteine MXR nelle larve veliger sviluppatesi in acqua contenente concentrazioni ambientali di propranololo (0,01 e 1 µg/L). I risultati mostrano che alla concentrazione di 1 µg/L si ha un aumento nell'attività MXR rispetto al controllo.

Già Smital et al. (2003) hanno osservato in *M. galloprovincialis* che le proteine MXR sono inducibili, ovvero che la loro attività può aumentare come risposta alla presenza in ambiente di sostanze inquinanti (Smital et al., 2003).

Un aumento nell'attività di una proteina può essere dovuto a una maggiore quantità di quella proteina, dunque a un incremento nell'espressione del gene che codifica per la proteina in questione. Si è dunque deciso di valutare l'espressione dei geni codificanti per P-gp e MRP mediante la quantificazione dei trascritti, aspettandosi di osservare un aumento di tale espressione nei campioni trattati con 1 µg/L di propranololo, visti i risultati del saggio

dell'attività MXR. Si noti che la relazione tra espressione genica e attività di una proteina non è necessariamente diretta, a causa dei fenomeni di processamento post trascrizionali, dei meccanismi traduzionali, delle modificazioni post traduzionali: il trascritto potrebbe, per esempio, essere presente, ma non tradotto in proteina; la proteina potrebbe, per esempio, essere presente, ma inattiva.

Come ipotizzato, l'espressione del gene codificante per P-gp aumenta significativamente, rispetto al controllo, nelle larve esposte a 1 µg/L di propranololo, rimanendo invariata nei campioni esposti a 0,01 µg/L di farmaco (Fig. 4.14). Si ha una crescita anche nel livello di espressione del gene codificante per MRP, rispetto al controllo, nei campioni trattati con 1 µg/L di propranololo, ma anche in quelli esposti alla concentrazione di 0,01 µg/L (Fig. 4.15). Ciò dimostra quindi che l'induzione dell'attività delle proteine MXR determinata dal propranololo è legata a un aumento nell'espressione dei geni che codificano per tali proteine.

Navarro et al. (2012) hanno riscontrato simili risultati di induzione sull'espressione genica delle proteine MXR da parte di contaminanti ambientali nelle larve di *Dreissena polymorpha*: il dacthal, un erbicida clorurato, e il mercurio hanno fatto aumentare, rispetto al controllo, i livelli di espressione dei geni che codificano per P-gp e MRP nelle larve di 24 ore dopo la fecondazione (Navarro et al., 2012).

Franzellitti et al. (2011) hanno studiato l'effetto del propranololo su diversi tessuti di adulti di *M. galloprovincialis*: nella ghiandola digestiva i livelli di espressione del gene codificante per P-gp nei campioni trattati con concentrazioni ambientali di propranololo sono risultati statisticamente inferiori rispetto al controllo, mentre nel mantello/gonadi tali livelli si sono dimostrati statisticamente maggiori rispetto al controllo. Dal momento che il propranololo agisce sia come β-bloccante (e come tale sembra causare una diminuzione nella produzione di cAMP), sia come antagonista del recettore 5-HT1 (e in quanto tale sembra provocare un aumento nei livelli di cAMP) (si veda l'introduzione), e visto che l'espressione del gene codificante per P-gp nel mitilo pare essere sotto il controllo trascrizionale di cAMP/PKA (Martin-Diaz et al., 2009), Franzellitti et al. hanno ipotizzato che nei tessuti delle ghiandola digestiva dell'adulto di *M. galloprovincialis* il propranololo agisca principalmente come β-bloccante, inibendo il *pathway* del cAMP e riducendo di conseguenza i livelli di espressione del gene codificante per P-gp, e che nel mantello/gonadi, invece, il propranololo agisca specialmente come antagonista del recettore 5-HT1, stimolando indirettamente il *pathway* del cAMP e aumentando i livelli di espressione genica di P-gp (Franzellitti et al., 2011). A supporto di queste ipotesi vanno riportate le osservazioni di Garnerot et al., (2006), che hanno

mostrato che le fibre serotonergiche sono assenti o scarse nella ghiandola digestiva dei bivalvi, mentre nelle gonadi è presente una grande quantità di tali fibre (Garnerot et al., 2006). Il fatto che nelle larve veliger di *M. galloprovincialis* esposte a concentrazioni ambientali di propranololo si registri un aumento nei livelli di espressione del gene codificante per P-gp potrebbe dipendere dalla presenza di recettori della serotonina del tipo 5-HT<sub>1</sub>, e quindi da un principale meccanismo di antagonista di tali recettori da parte del propranololo. Non possiamo escludere tuttavia che negli stadi larvali il propranololo agisca secondo ulteriori meccanismi molecolari, differenti a quelli riscontrati nell'adulto.

È stata indagata anche l'espressione del gene codificante per la glutatione S-transferasi (GST), uno dei principali enzimi coinvolti nelle reazioni di fase II del metabolismo degli xenobiotici. Nei campioni esposti a 1 µg/L di propranololo l'espressione genica di GST aumenta in modo statisticamente significativo rispetto al controllo, mentre la concentrazione di 0,01 µg/L non fa variare l'espressione in modo significativo, sempre rispetto al controllo (Fig. 4.17).

Il fatto che si riscontri un aumento nell'espressione genica di GST alla concentrazione di 1 µg/L può essere spiegato ipotizzando che ciò sia dovuto appunto alla presenza del farmaco e ai tentativi delle cellule di far fronte ad essa, accrescendo la sintesi degli enzimi deputati alla biotrasformazione e all'eliminazione degli xenobiotici.

Dal momento che numerosi studi hanno verificato che spesso gli xenobiotici inducono stress ossidativo, si è voluta analizzare l'espressione del gene codificante per la catalasi (CAT), enzima antiossidante. Come per GST, anche in questo caso la concentrazione di 1 µg/L di propranololo fa crescere l'espressione genica di CAT rispetto al controllo, mentre a 0,01 µg/L non si riscontrano variazioni significative (Fig. 4.16).

L'aumentata espressione genica di CAT nei campioni esposti a 1 µg/L di farmaco fa pensare a un possibile aumento di ROS e ai conseguenti attivazione e potenziamento dei vari meccanismi antiossidanti per evitare una condizione di stress ossidativo.

Come riportato da Gorinstein et al. (2003) i mitili provenienti da aree inquinate possono mostrare attività antiossidante maggiore rispetto a quelli prelevati da zone meno inquinate.

Franzellitti et al. (2011) hanno evidenziato come nei tessuti degli adulti di *M. galloprovincialis* esposti a concentrazioni ambientali di propranololo l'attività di CAT e di GST dipenda anche dal tipo di tessuto, con incrementi o decrementi rispetto al controllo probabilmente derivanti da diverse capacità antiossidanti e differenti tassi di accumulo e quindi di biotrasformazione degli xenobiotici a seconda del tessuto.

Infine, le malformazioni indotte dal propranololo sulla conformazione delle larve veliger osservate al microscopio per il saggio di embriotossicità hanno indotto a ipotizzare

un'alterazione nei meccanismi di biomineralizzazione: per questo motivo si è scelto di indagare l'espressione di due geni codificanti per altrettante proteine coinvolte nella formazione della conchiglia: l'anidrasi carbonica (CA) e la proteina extrapalliale (EP).

Alla concentrazione di 1 µg/L di propranololo si registra un aumento significativo nell'espressione genica di CA rispetto al controllo, mentre a 0,01 µg/L non si osservano cambiamenti nei livelli di espressione (Fig. 4.18).

L'espressione genica di EP ha un andamento inverso invece, in quanto ad entrambe le concentrazioni di propranololo saggiate si verifica una diminuzione dei livelli di espressione rispetto al controllo (Fig. 4.19).

Come riportato nell'introduzione, l'anidrasi carbonica permette la formazione dello ione  $\text{HCO}_3^-$ , mentre la proteina extrapalliale è in grado di legare lo ione  $\text{Ca}^{2+}$ : entrambe sembrano quindi essere di fondamentale importanza perché avvenga il corretto sviluppo della conchiglia del mitilo.

Le variazioni di espressione genica di tali proteine nei campioni esposti al farmaco testimoniano come molto probabilmente i meccanismi di biomineralizzazione vengano alterati, contribuendo ad originare le malformazioni osservate nel test di embriotossicità.

Per quanto riguarda gli effetti della carbamazepina nel saggio di embriotossicità, a partire dal trattamento con concentrazione pari a 1 µg/L si riscontra una diminuzione statisticamente significativa della percentuale di larve veliger normali (senza malformazioni) rispetto al controllo. Tale riduzione si mantiene intorno allo stesso livello aumentando la concentrazione di farmaco somministrato, fino ai 100 µg/L, per poi far registrare un netto calo ulteriore a 1000 µg/L (Fig. 4.10).

Come per quanto osservato col propranololo, risulta quindi evidente che le concentrazioni ambientali di carbamazepina danneggino lo sviluppo fisiologico di *M. galloprovincialis*. Sono stati quindi indagati vari meccanismi biochimico-molecolari per rilevare eventuali alterazioni.

Il test sull'attività delle proteine MXR evidenzia come nei campioni esposti ad entrambe le concentrazioni ambientali di carbamazepina scelte per effettuare il saggio (0,01 e 10 µg/L) si riscontrino un aumento nell'attività MXR rispetto al controllo, in linea con l'induzione già verificata con il propranololo (Fig. 4.13).

Come ci si può aspettare dai risultati dell'attività MXR, l'espressione del gene codificante per P-gp aumenta in modo statisticamente significativo, rispetto al controllo, nei campioni trattati con entrambe le concentrazioni di carbamazepina (Fig. 4.20).

Sorprendentemente, però, l'espressione genica di MRP risulta ridotta significativamente, rispetto al controllo, sia a 0,01 che a 10 µg/L di carbamazepina (Fig. 4.21).

Come riportato nell'introduzione, la carbamazepina interagisce con il sistema dell'adenilato ciclasi e riduce i livelli intracellulari di cAMP e l'espressione del gene codificante per P-gp nel mitilo sembra essere sotto il controllo trascrizionale di cAMP/PKA (Martin-Diaz et al., 2009). Coerentemente con tale meccanismo molecolare, Martin-Diaz et al. (2009) hanno evidenziato che l'espressione genica di P-gp diminuisce significativamente, rispetto al controllo, nei tessuti (ghiandola digestiva, branchie, mantello/gonadi) degli adulti di *M. galloprovincialis* esposti a concentrazioni ambientali di carbamazepina (Martin-Diaz et al., 2009). Tali autori hanno riscontrato una diminuzione statisticamente significativa, rispetto al controllo, anche nell'espressione genica di MRP negli stessi tessuti degli adulti di *M. galloprovincialis*, trattati con le medesime concentrazioni di carbamazepina. Viene quindi proposto che anche l'espressione del gene codificante per MRP nel mitilo sia sotto il controllo trascrizionale di cAMP/PKA, come riscontrato da Rohlf & Glazer (1995) per le cellule di mammifero (Rohlf & Glazer, 1995).

I risultati ottenuti in questa tesi sull'espressione genica di P-gp e MRP nelle larve veliger del mitilo esposte a carbamazepina sono parzialmente contrastanti con quanto verificato per gli adulti e potrebbero dipendere da diversi e/o ulteriori meccanismi molecolari dell'azione del farmaco rispetto a quelli rilevati negli adulti.

Per quanto riguarda la glutatione S-transferasi (GST), ad entrambe le concentrazioni saggate di carbamazepina (0,01 e 10 µg/L) si registra una diminuzione statisticamente significativa, rispetto al controllo, nell'espressione del gene codificante per GST (Fig. 4.23).

L'espressione del gene codificante per la catalasi (CAT) rimane invariata, rispetto al controllo, nei campioni esposti a 0,01 µg/L di carbamazepina, mentre si riduce, in modo statisticamente significativo rispetto al controllo, nei campioni trattati con 10 µg/L (Fig. 4.22). Martin-Diaz et al. (2009) hanno invece rilevato che l'attività della GST e della CAT aumentano, rispetto al controllo, nei tessuti (ghiandola digestiva e mantello/gonadi) degli adulti di *M. galloprovincialis* esposti a concentrazioni ambientali di carbamazepina (Martin-Diaz et al., 2009).

Il fatto che nelle larve veliger si verifichi una riduzione nell'espressione di geni che codificano per un enzima deputato al metabolismo degli xenobiotici e per un enzima antiossidante, potrebbe indicare che il farmaco causa un danno tale per cui gli enzimi deputati ai meccanismi messi in atto dalla cellula per far fronte ai possibili effetti deleteri non riescono



più nemmeno a sviluppare la loro azione ai livelli fisiologici, in quanto la situazione è già compromessa.

Per quanto riguarda, infine, i geni codificanti per l'anidraasi carbonica e per la proteina extrapalliale, l'espressione genica di CA risulta simile a quella del controllo sia per i campioni trattati con 0,01 µg/L di carbamazepina, sia per quelli esposti a 10 µg/L del farmaco (Fig. 4.24). L'espressione genica di EP, invece, presenta una riduzione significativa, rispetto al controllo, nei trattamenti a 10 µg/L di carbamazepina (Fig. 4.25).

L'alterazione di una proteina coinvolta nella biomineralizzazione fa ipotizzare che anche altri tra i molteplici processi che vengono attuati durante la formazione della conchiglia possano essere danneggiati dalla carbamazepina e influire sul corretto sviluppo larvale, come suggerito anche dai risultati del test di embriotossicità.

In conclusione, concentrazioni di propranololo e carbamazepina nell'intervallo di quelle misurate in ambiente inducono alterazioni nelle risposte cellulari alla presenza degli xenobiotici, per esempio andando a modificare il metabolismo e l'estruzione delle potenziali sostanze tossiche e i meccanismi antiossidanti di difesa dallo stress ossidativo; inoltre causano alterazioni anche a livello dei meccanismi di biomineralizzazione. Queste variazioni, certamente insieme ad altre, molto probabilmente contribuiscono a causare le malformazioni subite dalle larve in fase di sviluppo, malformazioni che risultano crescere in percentuale all'aumentare della concentrazione di farmaco somministrata, ma che comunque sono già presenti in quantitativo significativamente maggiore rispetto al controllo nei campioni esposti a concentrazioni ambientali di propranololo e carbamazepina.

Questi studi dimostrano come, a fronte di mancate risposte dei test acuti di ecotossicità, i farmaci presenti in ambiente possono avere effetti deleteri per gli organismi acquatici. In particolare, le fasi larvali risultano molto sensibili: i dati di questa tesi indicano che esse subiscono significative alterazioni nello sviluppo, compresa la capacità di iniziare la costruzione delle valve. E' importante notare come gli effetti abbiano luogo anche a concentrazioni ambientali, sottolineando l'importanza di studi specifici per comprendere la reale pericolosità dei residui dei farmaci ad uso umano o veterinario nell'ambiente acquatico. La presente ricerca ha permesso di identificare vari bersagli cellulari e molecolari interessati dall'effetto di propranololo e carbamazepina, dalle attività di proteine di trasporto a livello di membrana, all'espressione di geni codificanti per enzimi detossificanti e coinvolti nella biomineralizzazione. La continuazione di questo studio potrà chiarire ulteriormente le interazioni dei farmaci ambientali con i bersagli cellulari-molecolari alla base dello sviluppo

larvale; d'altra parte permetterà di acquisire conoscenze circa il ruolo, per ora non conosciuto, di geni e proteine coinvolte nella biomineralizzazione e quindi cruciali nella formazione della conchiglia.

## **6. Bibliografía**

Addadi L., Joester D., Nudelman F., Weiner S., 2006. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry – A European Journal* 12, 980-987.

Aguirre-Martínez G.V., Owuor M.A., Garrido-Pérez C., Salamanca M.J., Del Valls T.A., Martín-Díaz M.L., 2015. Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere* 120, 75-85.

AHI Animal Health Institute Environmental Risk Assessment Working Group, 1997. Analysis of data and information to support a  $PEC_{soil}$  trigger value for Phase I. A retrospective review of ecotoxicity data from environmental risk assessments submitted to FDA/CVM to support the approval of veterinary drug products in the United States from 1973-1997. Washington DC: AHI.

Ankley G.T., Brooks B.W., Huggett D.B., Sumpter J.P., 2007. Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environmental Science & Technology* 41, 8211-8217.

Anzenbacher P., Anzenbacherová E., 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 737-747.

Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R.H., 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5 (2), 209-219.

Ashton D., Hilton M., Thomas K.V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment* 333, 167-184.

ASTM American Society for Testing and Materials, 2004. International Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Salt Water Bivalve Mollusks. E 724-98.

Bard S. M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defence mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48, 357-389.

Bargagli B., Cruscanti M., Leonzio C., Bacci E., 1998. I bioindicatori. In: Vighi M., Bacci E., *Ecotossicologia*. UTET, Torino, Italia, pp. 237.

Belcher A.M., Wu X.H., Christensen R.J., Hansma P.K., Stucky G.D., Morse D.E., 1996. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature* 381, 56-58.

BIO-RAD, Real-Time PCR Applications Guide.

Boelsterli U.A., 2007. *Mechanistic Toxicology. The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets*. Second Edition. CRC Press - Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.

Brunelli F., Gelli F., Pregnolato L., Pumo T.C., Scialoja M.G., Bencivelli S., Selvatico L., Roncarati A., Savorelli F., 2004. Rilevazione delle emergenze idriche con sensori di preallarme e valutazione dei sedimenti e delle acque destinate allo molluschicoltura attraverso test ecotossicologici (*Mytilus galloprovincialis*). *Biologia Marina Mediterranea* 11 (2), 490-492.

Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55:4, 611-622.

CDER/USFDA Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, 1997. Retrospective review of ecotoxicity data submitted in environmental assessments for public display. Washington DC: FDA. Docket N° 96N-0057.

Chen G., Pan B., Hawver D.B., Wright C.B., Potter W.Z., Manji H.K., 1996. Attenuation of cyclic AMP production by carbamazepine. *Journal of Neurochemistry* 67, 2079–2086.

Chomczynski P., Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.

Christen V., Hickmann S., Rechenberg B., Fent K., 2010. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: a concept for their identification based on their mode of action. *Aquatic Toxicology* 96, 167–181.

Cole S.P, Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Almquist K.C., Stewart A.J., Kurz E.U., Duncan A.M., Deeley R.G., 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650-1654.

Cubero-Leon E., Ciocan C.M., Hill E.M., Osada M., Kishida M., Itoh N., Kondo R., Minier C., Rotchell J.M., 2010. Estrogens disrupt serotonin receptor and cyclooxygenase mRNA expression in the gonads of mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology* 98, 178–187.

Dailianis S., Piperakis S.M., Kaloyianni M., 2005. Cadmium effects on ROS production and DNA damage via adrenergic receptors stimulation: role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and PKC. *Free Radical Research* 39, 1059-1070.

Della Torre C., Bocci E., Focardi S.E., Corsi I., 2014. Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Marine Environmental Research* 93, 56-63.

Depledge M., 1989. The rational basis for detection of the early effects of marine pollutants using physiological indicators. *Ambio* 18, 301-302.

Depledge M.H., Fossi M.C., 1994. The role of biomarker in environmental assessment: invertebrates. *Ecotoxicology* 3, 173-179.

Diaz-Enrich M.J., Ramos Martinez J.I., Ibarguren I., 2003. Implication of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, guanosine 3',5'-cyclic monophosphate, adenosine 5'-mono-, di-, and triphosphate and fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of the glycolytic pathway in

relation to the gametogenic cycle in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Molecular and Cellular Biochemistry* 252, 339–345.

Di Giulio R.T., Washburn P.T., Wenning R.J., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 1103-1123.

Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D., 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 15665-15670.

Dröge W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82, 47-95.

EMA/CHMP European Medicines Agency/Committee for Medicinal Products for Human Use, 2006. Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. London, UK: EMA. EMA/CHMP/SWP/4447/00.

EMA/CVMP European Medicines Agency/Committee for Medicinal Products for Veterinary Use, 2008. Revised guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38. London, UK: EMA. EMA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1.

Fabbri E., Capuzzo A., 2010. Cyclic AMP signaling in bivalve molluscs: an overview. *Journal of Experimental Zoology A* 313, 179-200.

Fabbri E., Franzellitti S., 2015. Human pharmaceuticals in the marine environment: focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34, 1-14.

Fabbri R., Montagna M., Balbi T., Raffo E., Palumbo F., Canesi L., 2014. Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* 99, 1-8.

Falini G., Albeck S., Weiner S., Addadi L., 1996. Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science* 271, 67-69.

Fent K., Weston A.A., Caminada D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76, 122-159.

Franzellitti S., Buratti S., Valbonesi P., Capuzzo A., Fabbri E., 2011. The  $\beta$ -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 101, 299-308.

Franzellitti S., Fabbri E., 2013. Cyclic-AMP mediated regulation of ABCB mRNA expression in mussel haemocytes. *PLoS ONE* 8(4): e61634. doi:10.1371/journal.pone.0061634

Garcia-Morales I., Sancho Rieger J., Gil-Nagel A., Herranz Fernandez J.L., 2007. Antiepileptic drugs: from a scientific evidence to clinical practice. *Neurologist* 13, S20-28.

Garnerot F., Pellerin J., Blaise C., Mathieu M., 2006. Immunohistochemical localization of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the gonad and digestive gland of *Mya arenaria* (Mollusca: Bivalvia). *General and Comparative Endocrinology* 149, 278-284.

Gorinstein S., Moncheva S., Katrich E., Toledo F., Arancibia P., Goshev I., Trakhtenberg S., 2003. Antioxidants in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as an indicator of black sea coastal pollution. *Marine Pollution Bulletin* 46, 1317–1325.

Gosling E., 2015. *Marine Bivalve Molluscs*. Second Edition. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Hahn M.E., 2002. Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment. *Science of the Total Environment* 28, 49-69.

Hattan S.J., Laue T.M., Chasteen N.D., 2001. Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc, *Mytilus edulis*. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 4461-4468.

Heberer T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 131, 5-17.

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026-1030.

Hipfner D.R., Almquist K.C., Leslie E.M., Gerlach J.H., Grant C.E., Deeley R.G., Cole S.P., 1997. Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH<sub>2</sub> terminus. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 23623-23630.

Huggett D.B., Brooks B.W., Peterson B., Foran C.M., Schlenk D., 2002. Toxicity of selected beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals ( $\beta$ -blockers) on aquatic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 229-235.

Iserentant R., De Sloover J., 1976. Le concept de bioindicateur. *Mem. Soc. Roy. Bot. Belg.* 7, 15-24.

Juliano R.L., Ling V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 455, 152-162.

Klein I., Sarkadi B., Varadi A., 1999. An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461, 237-262.

Koutsogiannaki S., Evangelinos N., Koliakos G., Kaloyianni M., 2006. Cytotoxic mechanisms of Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> involve Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE) activation by ROS. *Aquatic Toxicology* 78, 315-324.

Koutsogiannaki S., Franzellitti S., Fabbri E., Kaloyianni M., 2014. Oxidative stress parameters induced by exposure to either cadmium or 17 $\beta$ -estradiol on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. The role of signaling molecules. *Aquatic Toxicology* 146, 186-195.



Kurelec B., Pivcevic B., 1991. Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 19, 291-302.

Kurelec B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology* 22, 12-43.

Lacoste A., Malham S.K., Cueff A., Poulet S.A., 2001. Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a  $\beta$ -adrenergic receptor-cAMP signaling pathway. *General and Comparative Endocrinology* 122, 252–259.

Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P.C., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204, 216-237.

Lesser M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* 68, 253-278.

Levi-Kalisman Y., Falini G., Addadi L., Weiner S., 2001. Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *Journal of Structural Biology* 135, 8-17.

Loo T.W., Clarke D.M., 1999. Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochemistry and Cell Biology* 77, 11-23.

Losso C., Volpi Ghirardini A., 2010. Overview of ecotoxicological studies performed in the Venice Lagoon (Italy). *Environment International* 36, 92-121.

Lowenstam H.A., Weiner S., 1989. *On Biomineralization*. Oxford University Press, New-York, USA.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

Luckenbach T., Fischer S., Sturm A., 2014. Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 165, 28-52.

Mao Che L., Golubic S., Le Campion-Alsumard T., Payri C., 2001. Developmental aspects of biomineralization in the polynesian pearl oyster *Pinctada margaritifera* var. *cumingii*. *Oceanologica Acta* 24, S37-S49.

Marie B., Luquet G., Bédouet L., Milet C., Guichard N., Medakovic D., Marin F., 2008. Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95 kDa calcium-binding glycoprotein. *ChemBioChem* 9, 2515-2523.

Marin F., Luquet G., Marie B., Medakovic D., 2008. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current Topics in Developmental Biology* 80, 209-276.

Martin-Diaz L., Franzellitti S., Buratti S., Valbonesi P., Capuzzo A., Fabbri E., 2009. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 94, 177-185.

Medakovic D., 2000. Carbonic anhydrase activity and biomineralization process in embryos, larvae and adult blue mussels *Mytilus edulis* L. *Helgoland Marine Research* 54, 1-6.

Minier C., Lelong C., Djemel N., Rodet F., Tutundjian R., Favrel P., Mathieu M., Leboulenger F., 2002. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research* 54, 455-459.

Miyamoto H., Miyashita T., Okushima M., Nakano S., Morita T., Matsushiro A., 1996. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 9657-9660.

Montezinho L.P., Mork A., Duarte C.B., Penschuck S., Geraldés C.F., Castro M.M., 2007. Effects of mood stabilizers on the inhibition of adenylate cyclase via dopamine D(2)-like receptors. *Bipolar Disorders* 9, 290–297.

Navarro A., Weißbach S., Faria M., Barata C., Pina B., Luckenbach T., 2012. Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. *Aquatic Toxicology* 122-123, 144-152.

Nielsen C., 2004. Trochophora larvae: cell-lineages, ciliary bands and body regions. 1. Anellida and Mollusca. *Journal of Experimental Zoology* 302, 35-68.

NRC National Research Council, 1989. Biological markers in reproductive toxicology. National Academy Press, Washington D.C., USA.

Pierce B.A, 2005. *Genetica*. Zanichelli, Bologna, Italia.

Regoli F., Giuliani M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research* 93, 106-117.

Sheehan D., Meade G., Foley V.M., Dowd C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360, 1-16.

Rohlf C., Glazer R.I., 1995. Regulation of multidrug resistance through the cAMP and EGF signalling pathways. *Cellular signalling* 7, 431-443.

Rushmore T.H., Pickett C.B., 1993. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implication. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 11475-11478.

Sambrook J., Fritschi E.F., Maniatis T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Santos L.H.M.L.M., Araújo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 175, 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* 62, 1389-1395.

Schmitt H., Boucard T., Garric J., Jensen J., Parrott J., Péry A., Römbke J., Straub J.O., Hutchinson T.H., Sanchez-Argüello P., Wennmalm A., Duis K., 2010. Recommendations on the environmental risk assessment of pharmaceuticals: effect characterization. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6, Supplement 1, 588-602.

Schmittgen T.D., Livak K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nature Protocols* 3, 1101-1108.

Shpakov A.O., Shipilov V.N., Bondareva V.M., 2005. Sensitivity of adenylyl cyclase signalling system of the mollusk *Anodonta cygnea* ganglions to serotonin and adrenergic agonists. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040, 466–468.

Sigma-Aldrich, qPCR Technical Guide.

Simkiss K., Wilbur K.M., 1989. *Biom mineralization, Cell biology and Mineral Deposition*. Academic Press Inc., New-York, USA.

Smital T., Sauerborn R., Hackenberger B.K., 2003. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* 65, 443-465.

Suzuki M., Iwashima A., Tsutsui N., Ohira T., Kogure T., Nagasawa H., 2011. Identification and characterization of a calcium carbonate-binding protein , Blue Mussel Shell Protein (BMSP), from the nacreous layer. *ChemBioChem* 12, 2478-2487.

Suzuki M., Saruwatari K., Kogure T., Yamamoto Y., Nishimura T., Kato T., Nagasawa H., 2009. An acidic matrix protein , Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* 325, 1388-1390.

Szakacs G., Varadi A., Özvegy-Laczka C., Sarkadi B., 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discovery Today* 13, 379-393.

Tambutté S., Tambutté E., Zoccola D., Caminiti N., Lotto S., Moya A., Allemand D., Adkins J., 2007. Characterization and role of carbonic anhydrase in the calcification process of the azooxanthellate coral *Tubastrea aurea*. *Marine Biology* 151, 71-83.

Thomas K.V., Hilton M.J., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 49, 436-444.

Tierney A.J., 2001. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 128, 791-804.

Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 178-189.

Valbonesi P., Caselli F., Capuzzo A., Fabbri E., 2004. Modulation of adenylyl cyclase activity in the gills of *Tapes philippinarum*. *Journal of Experimental Zoology* 301, 952-960.

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, Part C* 146, 281-300.

VICH International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, 2000. Environmental impact assessment (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) – Phase I. VICH Guideline 6 (Ecotoxicity Phase I). London, UK: VICH. CVMP/VICH/592/98-FINAL.

VICH International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, 2005. Environmental impact assessment (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) – Phase II Guidance. VICH Guideline 38 (Ecotoxicity Phase II). London, UK: VICH. CVMP/VICH/790/03-FINAL.

Weiss I.M., Tuross N., Addadi L., Weiner S., 2002. Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *Journal of Experimental Zoology* 293, 478-491.

Wilbur K.M., Jodrey L.H., 1955. Studies on the shell formation. V. The inhibition of shell formation by carbonic anhydrase inhibitors. *The Biological Bulletin* 108, 359-365.

Winston G.W., Di Giulio R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 19, 137-161.

Xu C., Li C.Y.T., Kong A.N.T., 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research* 28, 249-268.

Yin Y., Huang J., Paine M.L., Reinhold V.N., Chasteen N.D., 2005. Structural characterization of the major extrapallial fluid protein of the mollusc *Mytilus edulis*: implications for function. *Biochemistry* 44, 10720-10731.

Yu M.H., 2005. *Environmental Toxicology. Biological and health effects of pollutants*. Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Zhang Y., Geissen S.U., Gal C., 2008. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151–1161.

## **Siti Web consultati**

[pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

[www.arpa.vda.it](http://www.arpa.vda.it)

[www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it)