

Alma Mater Studiorum — Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Ambientali: tutela e gestione delle risorse naturali

Ciclo XXVIII

Settore concorsuale: 05D1

Settore scientifico-disciplinare: BIO 09/ FISIOLOGIA

**Sviluppo di indicatori biologici in organismi
acquatici di interesse commerciale esposti a
farmaci di rilevanza ambientale**

Presentata da: **Alisar Kiwan**

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Enrico Dinelli

Prof.ssa Elena Fabbri

Esame finale anno 2016

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutte le persone che hanno permesso e contribuito alla realizzazione di questo progetto di dottorato.

Voglio esprimere la mia gratitudine al mio supervisore, la Prof.ssa Elena Fabbri, per la disponibilità ed il sostegno dimostrato in questi anni di ricerca.

Un ringraziamento speciale va a tutte le persone del laboratorio EPB di Ravenna per il supporto scientifico e morale. Le Dott.sse Paola Valbonesi, Silvia Franzellitti, Sara Buratti ed Anna Piano per il continuo aiuto, la gentilezza e l'immensa disponibilità fornita in questi tre anni. Il Dott., nonché amico, Marco Capolupo per essere la calma nella tempesta.

Ringrazio il Parco del Delta del Po di Comacchio per aver fornito le anguille oggetto di studio.

Desidero ringraziare il Prof. Vance Trudeau del CAREG dell'Università di Ottawa e tutti i ragazzi del TEAMENDO lab, che mi hanno permesso di intraprendere una speciale esperienza di ricerca nonché una singolare avventura di vita.

Grazie a tutti gli studenti transitati al CIRSA in questi anni, nonché ai colleghi di dottorato per i momenti di vita condivisi.

Un profondo ringraziamento dal cuore va ai compagni più cari, vicini e lontani, per essere così incredibilmente pazienti e per essere dei veri amici.

Infine, il ringraziamento più grande è per mamma e papà, per essere la mia luce nei giorni più bui.

INDICE

Scopo della ricerca	5
1. Introduzione	7
1.1 I nuovi contaminanti emergenti dell'ambiente acquatico.....	8
1.2 Farmaci e legislazione europea.....	14
1.3 La "Read – Across Hypothesis": modello concettuale per la valutazione del rischio	17
1.4 Gli organismi oggetto di studio.....	22
1.4.1 Mitilo Mediterraneo	23
1.4.2 Anguilla Europea	25
1.5 I Biomarker: strumenti per la valutazione della qualità ambientale	28
1.6 Riferimenti Bibliografici	37
2. Regolazione adrenergica della glicogenolisi epatica nell'anguilla europea delle Valli di Comacchio .42	
2.1 Introduzione.....	44
2.2 Materiali e Metodi	47
2.3 Risultati	52
2.4 Discussione e Conclusioni	62
2.5 Riferimenti Bibliografici	68
3. Alterazioni di farmaci β-bloccanti sul metabolismo glucidico dell'anguilla attraverso perfusione cellulare.....	70
3.1 Introduzione.....	72
3.2 Materiali e Metodi	75
3.3 Risultati	79
3.4 Discussione e Conclusioni	86
3.5 Riferimenti Bibliografici	92
4. Valutazione degli effetti della caffeina sul mitilo mediterraneo attraverso una batteria di biomarker	95
4.1 Introduzione.....	97
4.2 Materiali e Metodi	100
4.3 Risultati	105
4.4 Discussione e Conclusioni	112
4.5 Riferimenti Bibliografici	117
5. Approccio biologico per la valutazione della qualità ambientale della laguna costiera Piailassa Piombone	120
5.1 Introduzione.....	122

5.2 Materiali e Metodi	125
5.3 Risultati	130
5.4 Discussione e Conclusioni	140
5.5 Riferimenti Bibliografici	146
6. Conclusioni Generali.....	148
7. Attività di ricerca presso l'Università di Ottawa (Canada)	152
7.1 Introduzione.....	154
7.2 Materiali e Metodi	157
7.3 Risultati	161
7.4 Discussione e Conclusioni	165
7.5 Riferimenti Bibliografici	169

Scopo della ricerca

La presenza di residui farmaceutici in ambiente è diventata da diversi anni un importante tema di ricerca. La continua immissione e la incompleta rimozione da parte degli impianti di depurazione, rende questi composti pericolosi per gli organismi acquatici e potenzialmente dannosi anche per l'uomo stesso che li assume attraverso la dieta.

Dopo una prima indagine sulla problematica dei farmaci in ambiente, la regolamentazione europea e gli effetti tossici/avversi di questi composti sugli organismi acquatici (**Capitolo I**), l'obiettivo della ricerca è stato quello di valutare gli effetti sub-letali di farmaci di rilevanza ambientale su due organismi d'interesse commerciale: il mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) e l'anguilla europea (*Anguilla anguilla*). Gli effetti sono stati valutati tramite lo sviluppo e l'applicazione di indicatori biologici in studi condotti sia in laboratorio che in campo.

Sull'anguilla è stato condotto un primo studio fisiologico volto a capire come è controllata la regolazione adrenergica del metabolismo glucidico epatico in vari stadi di sviluppo della specie. Lo studio ha permesso di identificare nel glucosio rilasciato dalle cellule, il parametro che meglio rappresenti le alterazioni a carico del metabolismo glucidico (**Capitolo II**). Questo studio è stato propedeutico al fine di valutare la reale interferenza di farmaci a livello epatico. La messa a punto di un test *in vitro* dinamico, mai utilizzato in precedenza per valutare gli effetti dei farmaci, ha permesso di testare l'effetto di due farmaci β -bloccanti (propranololo ed atenololo) sul metabolismo glucidico (**Capitolo III**). Come sistema sperimentale sono stati scelti gli epatociti isolati dal fegato in quanto rappresentano il modello standard per studiare gli effetti fisiologici e biochimici della regolazione adrenergica sia nelle cellule di mammifero che di pesce.

Sul mitilo sono stati testati gli effetti della caffeina dopo esposizione sub-cronica in condizioni di laboratorio applicando una batteria di dieci biomarker (**Capitolo IV**). Successivamente il mitilo è stato impiegato come indicatore biologico in uno studio in campo per valutare la qualità, dal punto di vista biologico, di una laguna costiera e per ricercare la presenza di residui farmaceutici nel sito di studio (**Capitolo V**).

L'approccio utilizzato per condurre gli studi si è basato sul modello concettuale della "Read – Across Hypothesis" (Rand-Weaver et al., 2013). Questa teoria si basa su tre principi fondamentali: il meccanismo d'azione dei farmaci, la conservazione dei bersagli molecolari tra mammiferi ed organismi acquatici e l'importanza della via fisiologica che viene alterata.

La ricerca ha voluto ampliare le conoscenze riguardo gli effetti avversi/indesiderati dei residui farmaceutici presenti in ambiente sugli organismi marini, e fornire degli strumenti utili da poter applicare nella valutazione del rischio ambientale causato da farmaci.

1. Introduzione

1.1 I nuovi contaminanti emergenti dell'ambiente acquatico

I contaminanti emergenti sono una classe di nuove sostanze che, con l'incremento economico e sociale, sono state rilasciate nei corpi d'acqua in quantità rilevanti con conseguente rischio per gli ecosistemi acquatici. Queste sostanze non vengono normalmente monitorate poiché spesso non sono incluse nella legislazione ambientale ed il loro destino non è sempre chiaro. Negli ultimi 15 anni è cresciuto l'interesse della comunità scientifica e degli enti di protezione per valutare il rischio posto da farmaci e da prodotti per la cura personale (PPCPs) nell'ambiente.

Appartengono alla categoria dei PPCPs una grande varietà di composti chimici con proprietà chimico-fisiche particolari. Con il termine "medicinale" si intende una sostanza dispensata nelle farmacie che previene o allevia i sintomi di una malattia o di una funzione fisiologica. Nell'ambiente però esistono anche altri composti che non appartengono alla categoria dei farmaci. Con l'acronimo PPCPs infatti si intendono tutti quei composti chimici usati quotidianamente per l'uomo, gli animali domestici/allevamento, nell'agricoltura, nella cosmesi *etc.* I farmaci sono utilizzati per trattare e prevenire le malattie sia negli uomini che negli animali, e generalmente sono classificati a seconda della loro funzione terapeutica. I prodotti per la cura personale sono solitamente utilizzati nella cosmesi e comprendono prodotti per il *makeup*, saponi, deodoranti, creme solari e dentifrici. I PPCPs racchiudono la forma parentale di un composto chimico, ovvero l'ingrediente attivo di un farmaco, ma anche i metaboliti attivi ed i prodotti di trasformazione (Daughton, 2007).

Grazie all'avvento di tecniche analitiche sempre più avanzate, come tecniche di rilevamento cromatografico e spettrometria di massa, è stato possibile rilevare limiti di concentrazioni nel range di ng- μ g/L e ciò ha reso possibile quantificare nell'ambiente un grande numero di composti farmaceutici. Annualmente tonnellate di queste sostanze vengono prodotte sia ad uso umano che veterinario (Fent et al., 2006; Glassmeyer et al., 2009). I farmaci ad uso umano più comunemente utilizzati sono antiinfiammatori, analgesici, antibiotici, regolatori lipidici, β -bloccanti, steroidi ed ormoni (Fent et al., 2006; Santos et al., 2010). Sono concepiti per avere un meccanismo fisiologico d'azione specifico e spesso progettati per

resistere all'inattivazione prima di svolgere il loro compito terapeutico. Queste caratteristiche, paradossalmente, sono responsabili del loro bioaccumulo e degli effetti tossici negli ecosistemi sia terrestri che acquatici (Fent et al., 2006). I farmaci, a differenza dei contaminanti convenzionali (pesticidi, detergenti, metalli, etc.), sono continuamente rilasciati a concentrazioni molto basse che potrebbero dar luogo a tossicità anche senza alti tassi di persistenza (Santos et al., 2010).

Nonostante le tecniche analitiche abbiano permesso di indentificare questi composti in tutti i corpi idrici quali acque reflue (Gómez et al., 2007; Verenitch et al., 2006), di falda (Sacher et al., 2001), minerali (Benotti et al., 2009) superficiali (Calamari et al., 2003; Moldovan et al., 2006) e marine (Weigel et al., 2002), ancora poche sono le conoscenze riguardo gli effetti ecotossicologici sugli ecosistemi di acqua dolce ma soprattutto sugli ambienti marino-costieri. Secondo uno studio di Martinez *et al.* (2007), più di 2,3 milioni di persone vivono sulla costa (4% della popolazione mondiale) e più del 50% dei paesi costieri presentano l'80-100% della loro popolazione totale entro 100 km dal litorale. Con l'aumento sempre più intenso della popolazione mondiale sulla linea di costa, è facile pensare ad un rilascio sempre maggiore di residui farmaceutici nell'ambiente e, di conseguenza, vi è la necessità di conoscere tutti i potenziali scenari che potrebbero verificarsi nell'ambiente marino (Gaw et al., 2015). Inoltre se il continuo rilascio di farmaci negli ecosistemi costieri è in grado di indurre un impatto biologico, potrebbe costituire uno stress ulteriore per questo tipo di ambienti già fortemente impattati dai cambiamenti climatici, l'eutrofizzazione e la sovra pesca (Crain et al., 2009). Come riportato in figura 1.1.1, tutte le classi di farmaci sono presenti nelle acque marine di tutto il mondo.

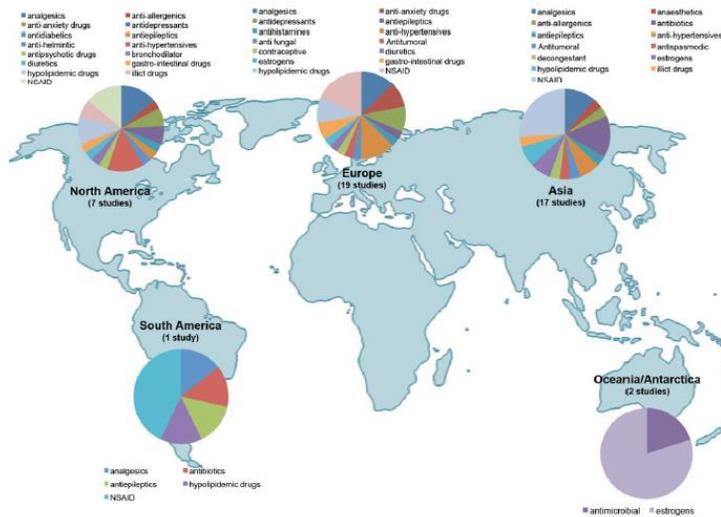


Fig. 1.1.1: Classi di farmaci riscontrati in ambiente marino in varie parti del mondo. Da Fabbri e Franzellitti 2015.

Una volta escreti dall’organismo i farmaci ed i loro metaboliti ancora attivi raggiungono l’ambiente acquatico tramite una moltitudine di vie (Fig. 1.1.2). La principale è attraverso le acque reflue di scarichi domestici, ospedalieri e delle ditte produttrici di farmaci (Daughton e Ternes, 1999). Poiché i depuratori non sono sempre in grado di degradare totalmente questi composti, i tassi di rimozione variano dal 7 al 99% e dipendono fortemente dalle caratteristiche chimico-fisiche delle sostanze e dal tipo di trattamento all’interno del depuratore (Kümmerer, 2009a). Dai depuratori, i farmaci raggiungono così i fiumi, entrano nei laghi ed arrivano fino alle coste riversandosi in mare.

Gli scarichi delle imbarcazioni rappresentano un’ulteriore fonte di contaminazione dell’ambiente acquatico (MARPOL Annex IV 73/78). Le navi possono infatti scaricare le acque reflue trattate a 4 miglia dalla costa e a 12 miglia per i reflui non trattati (Organisation IM, 2003). La quantità di reflui può essere davvero elevata se si pensa che certe navi da crociera trasportano un numero di passeggeri equivalente a quello di piccole città; inoltre i reflui di queste imbarcazioni non sempre ricevono dei trattamenti di depurazione adeguati prima di essere smaltiti.

L’acquacoltura è un'altra fonte di inquinamento dell’ambiente acquatico. La produzione globale di pesci e frutti di mare sta crescendo rapidamente con il 90% dell’acquacoltura situata in Asia (Sapkota et al., 2008). In questa pratica numerosi farmaci, principalmente antibiotici ad uso

umano, vengono utilizzati come profilassi verso le malattie; tuttavia fino al 75% della dose che viene somministrata può essere dispersa nell'ambiente a causa di mancata ingestione, escrezione renale del farmaco tal quale ed escrezione di metaboliti ancora attivi attraverso le feci (Grigorakis e Rigos, 2011). Le concentrazioni di antibiotici che vengono somministrate sono tal volta elevatissime con valori fino a 2,5 mg/L riscontrati in un allevamento di gamberi in Vietnam (Le e Muneke, 2004).

La zootecnia e l'orticoltura nelle vicinanze dei fiumi, contribuiscono all'apporto di farmaci in ambiente. Gli antibiotici vengono aggiunti ai mangimi per gli animali per curare e prevenire le malattie soprattutto negli allevamenti intensivi (Kemper, 2008). Nonostante in Europa sia vietato, l'uso di basse dosi di antibiotici nei mangimi come promotori della crescita è ancora presente in alcune regioni del mondo. Altri paesi permettono l'uso di antibiotici quali ossitetraciclina e streptomina nei campi agricoli (Kümmerer, 2009a); l'utilizzo di biosolidi municipali come fertilizzanti per i terreni, costituisce un'ulteriore fonte di farmaci riversati in ambiente (Kümmerer, 2009b).

Infine, un altro accesso in ambiente è costituito dallo smaltimento dei rifiuti. La percolazione delle discariche è infatti una via attraverso cui i farmaci, smaltiti nei rifiuti clinici e domestici, penetrano l'ambiente acquatico. Un esempio è rappresentato dall'isola di Maiorca in cui è stata riscontrata una concentrazione di farmaci nei percolati pari a 27 µg/L (Kümmerer, 2009b).

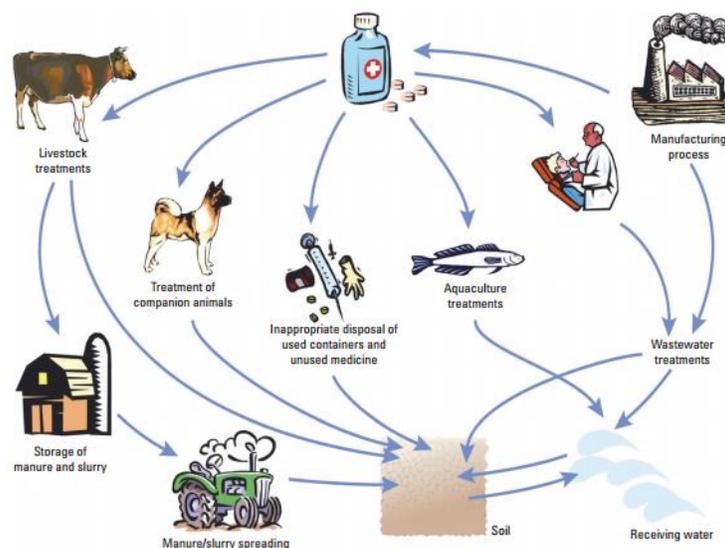


Fig. 1.1.2: Principali vie di ingresso di PPCPs nell'ambiente acquatico. Da Boxall *et al.* 2004

Nonostante il presupposto che basse concentrazioni farmaceutiche deriverebbero dalla diluizione di acque dolci nei corpi di acqua di mare, diversi farmaci sono stati riscontrati in mare a concentrazioni che eccedono la soglia di sicurezza per la concentrazione ambientale prevista in ambiente (PEC) di 0,01 µg/L (EMEA 2006). Oltre ai fenomeni di diluizione, anche processi di degradazione (biotica ed abiotica) e fisico-chimici avvengono nell'ambiente marino. Studi recenti hanno dimostrato che l'idrodinamismo marino, più nello specifico l'influenza del termoclino, può avere un forte impatto nel definire le strade di dispersione, nell'identificare il destino, la distribuzione ed il rischio di esposizione dei farmaci negli ecosistemi costieri (Bayen et al., 2013; Fenet et al., 2014). Cambiamenti di pH e salinità nella transizione tra l'acqua dolce e quella salata influenzano enormemente le proprietà elettrostatiche dei composti chimici. Parametri come la costante di dissociazione acida (pKa) o il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (Kow) tendono ad essere modificati, aumentando quindi la lipofilia del farmaco rendendolo più facilmente assorbibile nella materia particolata o più bioaccumulabile dagli organismi.

Caratteristica peculiare dei farmaci è quella di essere disegnati per agire a basse dosi su specifiche vie metaboliche e molecolari nell'uomo così come negli animali. Sono quindi in grado di indurre gli stessi effetti o provocarne di inattesi anche su organismi non target che presentano gli stessi bersagli su cui i medicinali agiscono. Gli organismi acquatici infatti, sono dei target ideali poiché vengono esposti ai farmaci e ai loro residui per tutto il loro ciclo vitale. Essendo questi composti presenti in ambiente come miscele complesse contenenti una grande varietà di farmaci ed altri contaminanti con lo stesso meccanismo d'azione, possono causare effetti additivi che andrebbero a complicare ulteriormente la valutazione di rischio.

Per diversi anni test acuti standardizzati di ecotossicità, hanno portato i ricercatori a concludere che le concentrazioni riscontrate negli ambienti di acqua dolce, non avessero alcun effetto sugli organismi acquatici (Fent et al., 2006). Di conseguenza, dati gli alti tassi di diluizione degli ambienti marini, alcun effetto avverso era previsto per gli animali di questi ambienti.

I normali test si basavano su stime di mortalità/alterazione della riproduzione, senza tener conto della durata di esposizione (cronica per gli ambienti acquatici), della differente sensibilità

degli organismi e dei diversi meccanismi di azione dei farmaci in grado di indurre effetti sub-letali importanti dando luogo a danni irreversibili nel lungo periodo.

Studi recenti hanno evidenziato che i normali test proposti dalle agenzie di protezione ambientale, non sono abbastanza sensibili per valutare gli effetti avversi causati dalle basse concentrazioni ambientali soprattutto dopo esposizioni croniche. In particolare farmaci come caffeina, ibuprofene, carbamazepina e novobiocina sono risultati estremamente tossici sullo sviluppo embrio-larvale del riccio *Paracentrotus lividus* anche a concentrazioni ambientali (Aguirre-Martínez et al., 2015).

Nonostante il numero limitato di studi atti a valutare gli impatti dei farmaci sulla fauna marina, sono stati riscontrati molteplici effetti avversi per questi animali. Studi su mitili hanno mostrato una riduzione nel tasso di alimentazione dopo esposizione a paracetamolo; riduzione nella forza del bisso dopo somministrazione di diclofenac, propranololo ed ibuprofene; l'esposizione a carbamazepina ha mostrato un'induzione dello stress ossidativo ed alterazione della risposta immunitaria (Solé et al., 2010; Ericson et al., 2010; Martin-Diaz et al., 2009). Diclofenac e fluoxetina hanno indotto mortalità ed alterazioni del comportamento nell'anfipode *Echinogammarus marinus* (Guler et al., 2010; Bossus et al., 2013). Solo due studi sono presenti al momento sui pesci marini in cui si è osservato un'alterazione dell'espressione genica dopo esposizione ad estradiolo nel pesce piatto *Pleuronichthys verticalis* (Baker et al., 2009) e modificazioni nell'espressione proteica epatica nel salmone atlantico (*Salmo salar*) dopo esposizione ad atenololo, carbamazepina e paracetamolo (Hampel et al., 2015).

Poter stimare il reale impatto dei farmaci sugli organismi acquatici è un obiettivo indispensabile da raggiungere ai fini di salvaguardia ambientale e tutela della salute umana. Per tale motivo è fondamentale conoscere il potenziale di bioaccumolo ed il meccanismo d'azione dei farmaci accoppiati alla differente fisiologia degli organismi acquatici siano essi produttori primari (alghe, piante), consumatori primari (bivalvi, copepodi) o secondari (crostacei, pesci, uomo). Pochi sono i dati riguardo l'accumulo di farmaci nei tessuti degli organismi marini, soprattutto per la mancanza di metodi analitici attendibili per matrici così complesse. Alcuni studi hanno però dimostrato la presenza di residui farmaceutici in pesci, crostacei e molluschi di tutto il mondo (Chen et al 2015; Gomez et al., 2012; Al-Ansari et al., 2010; Schuetze et al.,

2008), confermando la presenza e la biodisponibilità di questi composti negli ambienti naturali. Antidepressivi, anticoncezionali ed antibatterici sono stati ritrovati anche in squali e delfini alimentando l'ipotesi di un possibile trasferimento di questi composti lungo la catena trofica marina (Gelsleichter e Szabo, 2013; Fair et al., 2009). Esiste quindi il bisogno di valutare gli impatti dei farmaci sulla rete trofica, che può infatti essere alterata direttamente dal bioaccumulo di queste sostanze o indirettamente attraverso la perdita di specie chiave sensibili ai farmaci. L'impatto sui produttori primari è un problema fondamentale per gli ecosistemi marini a causa del conseguente effetto sul ciclo dei nutrienti e per la disponibilità di cibo per gli altri organismi. Allo stesso modo, composti che alterano la crescita e la riproduzione nei pesci hanno il potenziale di influenzare predatori e prede. Il passaggio e l'accumulo di farmaci nei livelli apicali della rete trofica potrebbe causare, in concomitanza con altri fattori di stress (inquinamento, sovra pesca, etc.), degli squilibri e diminuire o annullare la resilienza degli ecosistemi marini.

Concentrazioni di farmaci sono state ritrovate anche in campioni di molluschi, pesci e crostacei provenienti dal Pacifico centrale e dall'Atlantico in vendita presso i supermercati dell'est Europa e dell'Asia (Fedorova et al., 2014). Certi farmaci sono inoltre stabili nei tessuti degli animali anche previa cottura, rappresentando un rischio quindi per le persone che li consumano attraverso la dieta (McEneff et al., 2014).

1.2 Farmaci e legislazione europea

Globalmente ogni giorno un numero sempre maggiore di farmaci raggiunge l'ambiente. Tuttavia esiste una lacuna nella legislazione in merito alla contaminazione ambientale da farmaci, probabilmente nata da un'insufficiente disponibilità di dati in grado di quantificare un profilo preciso di contaminazione. La mancanza soprattutto di dati tossicologici cronici su flora e fauna, rende impossibile fare un'analisi di rischio per esposizioni a lungo termine.

All'inizio degli anni '90, l'Unione Europea introdusse, con la direttiva 92/18/CEE, la necessità di valutare l'impatto ambientale come prerequisito fondamentale per ottenere l'autorizzazione alla messa in commercio per i farmaci ad uso veterinario. A tal proposito nel 1998 l'Agenzia

Europea per la Valutazione dei Medicinali (EMA) pubblicò le prime linee guida per la stima del rischio (EMA, 1998). Nel 2000 i membri dell'Unione Europea approvarono la *Water Framework Directive* (2000/60/CE), con lo scopo di stabilire le basi per la tutela e la protezione di tutti i corpi idrici. Successivamente nel 2001 e nel 2004 la Commissione Europea estese la direttiva del 1998 anche ai farmaci ad uso umano (Direttiva 2001/83/CE; Direttiva 2004/27/CE). Nel 2006 uscì il testo definitivo per la valutazione di impatto ambientale contenente i protocolli e le linee guida richieste dalla Commissione Europea. Questa direttiva stabiliva che l'autorizzazione alla messa in commercio per tutti i farmaci di nuova generazione doveva essere accompagnata da una valutazione di rischio ambientale.

La procedura prevedeva un approccio a due fasi. In fase I veniva valutata la concentrazione prevista in ambiente per un determinato farmaco (PEC) basata su considerazioni riguardo la natura chimica della sostanza, i dosaggi di somministrazione, il grado di diluizione previsto negli ambienti acquatici e la quantità venduta sul mercato. Se la PEC risultava essere superiore a 0,01 µg/L veniva prevista una fase II contraddistinta da test ecotossicologici da condurre su particolari bioindicatori, secondo appositi protocolli definiti dall'OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) e dall'*International Organization for Standardization* (ISO). A queste linee guida si aggiunsero anche le raccomandazioni della Commissione OSPAR sulle molecole con $\log K_{ow} > 4,5$. K_{ow} è il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua che indica la capacità di accumulo dei composti. Secondo l'US EPA (*Environmental Protection Agency USA*) le sostanze che presentano un $K_{ow} > 4,5$ devono essere considerate potenzialmente pericolose per l'ambiente. L'EMA stabilì quindi ulteriori prove di bioaccumulo, persistenza e tossicità per tutti quei composti con un $K_{ow} > 4,5$ (Fig. 1.2.1).

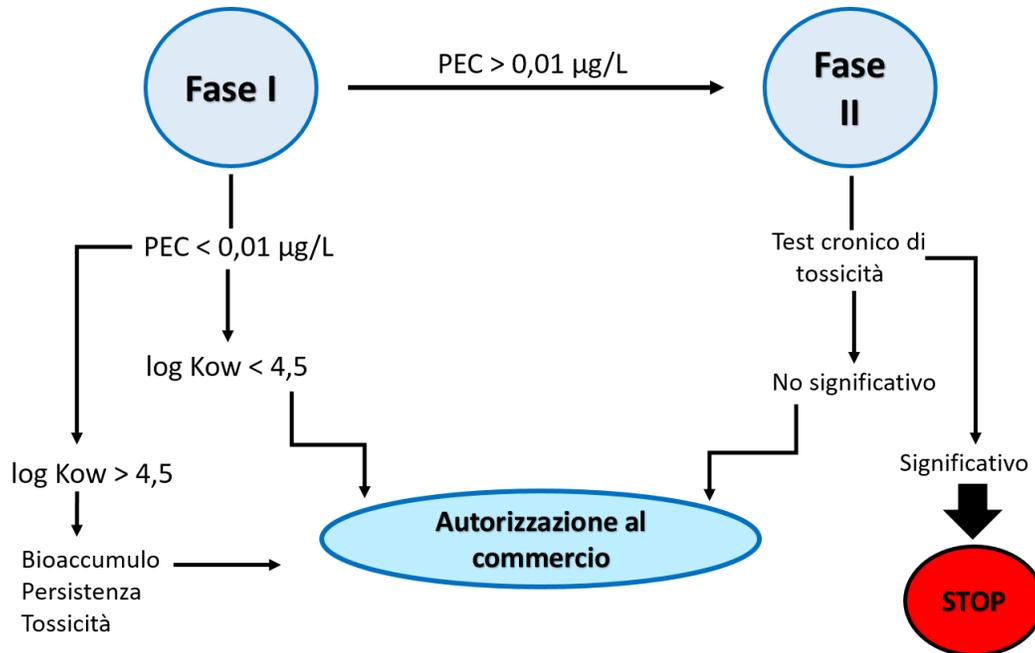


Fig. 1.2.1: Linee guida EMEA per la valutazione di rischio ambientale per farmaci ad uso umano

Nonostante queste linee guida, l'EMA ha avanzato alcune critiche alle sue stesse regolamentazioni. Diversi studi hanno dimostrato che alcuni farmaci sono in grado di indurre degli effetti anche a concentrazioni più basse della soglia di 0,01 µg/L come nel caso degli ormoni steroidei 17- α -etinilestradiolo (EE2) e il 17-metiltestosterone, i cui valori di LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) sono inferiori a 10 ng/L ed in alcuni casi ad 1 ng/L (Fujioka, 2002; Jobling et al. 2003). Per tale motivo, Christen *et al.* (2010) ha fornito una serie di raccomandazioni per identificare e definire questi composti altamente attivi ovvero di elevata preoccupazione (HC, *High Concern*) attraverso un approccio a tre step (maggiore dettagli nel paragrafo 1.3).

Recentemente l'Unione Europea ha emanato nell'agosto del 2013 la direttiva 2013/39 che per la prima volta include tre farmaci nell'elenco di controllo delle sostanze potenzialmente pericolose per l'ambiente: l'antiinfiammatorio diclofenac e gli ormoni steroidei 17- α -etinilestradiolo (EE2) ed il 17- β -ethinylestradiolo (E2). Il diclofenac è il principio attivo di alcuni antiinfiammatori non steroidei usato per la cura del dolore attraverso applicazioni orali e cutanee. Nel 2004 fece scalpore la notizia della morte di una popolazione di avvoltoi asiatici in

seguito all'ingestione di bestiame trattato con diclofenac, ampiamente usato anche in ambito veterinario (Oaks et al., 2004). EE2 è uno steroide sintetico frequentemente usato come estrogeno dei contraccettivi orali. Nel 2000, circa 100 milioni di donne facevano uso di questo contraccettivo ormonale (IARC 2007). E2 è l'ormone naturale estrogenico più attivo ed è anche un intermedio industriale di sintesi di altri estrogeni. Si è stimato che l'escrezione di estradiolo rappresenti il 5% dell'escrezione naturale umana (Christensen, 1998).

E' chiaro quindi che questi farmaci sono solo un esempio della grande varietà di sostanze che possono impattare la qualità dei corpi idrici e l'ambiente. Nel "Testo definitivo per la valutazione del rischio ambientale" (EMA 2006), è previsto che la Commissione Europea, sulla base degli studi condotti, debba elaborare un approccio strategico all'inquinamento dell'acqua dovuto a composti farmaceutici. Finora la letteratura non fornisce alcuna prova del fatto che i prodotti farmaceutici nell'ambiente acquatico rappresentano una minaccia per la salute umana quando si considera l'esposizione nell'acqua da bere (WHO, 2012). Tuttavia, dovrebbe essere inclusa nella normativa una valutazione del rischio per l'uomo in quanto esiste il pericolo causato dall'ingestione di pesci e molluschi contaminati.

1.3 La "Read – Across Hypothesis": modello concettuale per la valutazione del rischio

La problematica dei farmaci in ambiente è entrata in scena recentemente con la presa di coscienza che i farmaci, disegnati per agire su specifici bersagli nei mammiferi, potrebbero avere un effetto anche su organismi non target in cui i bersagli molecolari (generalmente enzimi e recettori) sono conservati. Questo concetto che prende il nome di "Read – Across Hypothesis" è stato formulato per la prima volta nel 2003 da Huggett *et al.* (2003a), ma la conservazione dei bersagli tra i gruppi di vertebrati era stata appurata già da tempo (Evans 1993). L'ipotesi prevede che l'interazione tra un farmaco ed il suo bersaglio molecolare produca una risposta farmacologica prima di una tossica, e richieda una concentrazione plasmatica simile a quella necessaria ad indurre un effetto nell'uomo (Rand-Weaver et al., 2013). Attraverso quest'ipotesi sarebbe possibile, tenendo conto delle caratteristiche del farmaco

(bersaglio molecolare, meccanismo d'azione, caratteristiche fisico-chimiche, *etc.*), predire il manifestarsi di un effetto (Winter et al., 2010). Quest'approccio è già da tempo attuato in ambito medico attraverso l'utilizzo di roditori per valutare gli effetti di un farmaco prima della messa in commercio. Oggigiorno si sta cercando di utilizzare specie modello come *Danio rerio*, per lo screening farmacologico (Sumanas et al., 2004), dimostrando che è possibile aumentare le conoscenze relative ad un farmaco partendo dai pesci per arrivare all'uomo, data l'elevata similarità dei bersagli molecolari (Menningen et al., 2011).

All'interno della "Read – Across Hypothesis" sono racchiusi diversi approcci per l'identificazione di farmaci in grado di presentare un rischio per l'ambiente e di conseguenza per la salute umana.

- Il "Fish Plasma Model" (Huggett et al., 2003a).
- Il concetto del "Mode of Action" (Christen et al., 2010)
- L' "Adverse Outcome Pathway" (Ankley et al., 2010)

Il "Fish Plasma Model" (FPM) viene presentato nel 2003 da Huggett *et al.* con lo scopo di determinare la capacità di un farmaco, presente in ambiente, di indurre un effetto sui pesci (Fig. 1.3.1). Il modello rapporta la concentrazione terapeutica umana (HPC_T) del farmaco con quella raggiunta nel pesce (FPC_{SS}), calcolata utilizzando il Log Kow (coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua, una misura di lipofilia) e la concentrazione ambientale (misurata o predetta). Tanto più la FPC_{SS} si avvicina alla HPC_T , tanto maggiore sarà la probabilità di vedere un effetto farmacologico; tuttavia bisogna considerare che il Log Kow è influenzato dalla pK_a (costante di dissociazione acida) e quindi potrebbe non dare una stima precisa per i composti ionici.

Il modello si basa sull'assunto che: i bersagli farmacologici siano conservati tra l'uomo e i pesci; se i bersagli sono presenti è possibile comparare la HPC_T con la FPC_{SS} assumendo una simile concentrazione interna efficace calcolando un rapporto di effetto (ER) dato dal rapporto tra HPC_T e FPC_{SS} ; la FPC_{SS} venga valutata usando un modello di bioconcentrazione basato sulla teoria dell'equilibrio di ripartizione, tenendo conto del coefficiente di distribuzione ottanolo/acqua in associazione alla concentrazione prevista in ambiente (PEC). Un $ER \leq 1$ indica che la FPC_{SS} attesa è uguale o superiore alla HPC_T ed indicherebbe un potenziale effetto tossico per il pesce.

Tuttavia il modello non tiene conto della differente sensibilità che gli organismi acquatici possono avere per i farmaci ad uso umano, e dell'esposizione prolungata in ambiente. Inoltre i farmaci che agiscono specificamente su determinate vie fisiologiche sono in grado di indurre degli effetti avversi anche a concentrazioni basse come quelle ambientali.

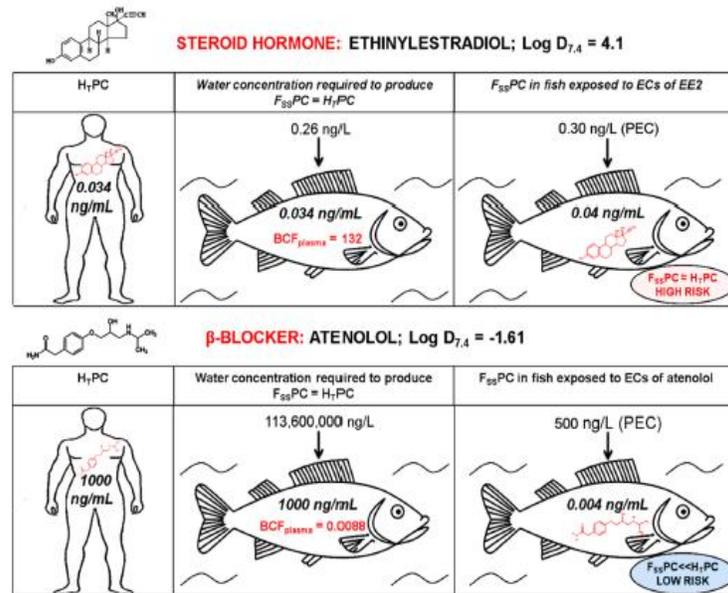


Fig. 1.3.1: Applicazione del FPM a due farmaci: etinilestradiolo (EE2) e atenololo (ATE). Il modello rapporta la HPC_T e la FPC_{SS} . Se $HPC_T \approx FPC_{SS}$, il rischio di avere un effetto farmacologico nel pesce è alto. EE2 a concentrazioni ambientali (es. PEC) può produrre $FPC_{SS} \approx HPC_T$, e quindi un alto rischio. ATE (altamente idrofilo) non tende a bioaccumularsi, $FPC_{SS} \ll HPC_T$ e quindi nessun effetto atteso. EC = concentrazione ambientale. (Da Rand-Weaver et al., 2013).

Il concetto del “Mode of Action” (MoA) viene sviluppato nel 2010 per identificare i composti farmaceutici altamente attivi, basandosi sulle conoscenze disponibili riguardanti le caratteristiche tossicologiche delle sostanze. E’ costituito da un approccio a tre fasi (Fig. 1.3.2), che si basa su due prerequisiti:

- I. Identificazione dei bersagli farmacologici umani. E’ necessario capire il meccanismo d’azione dei composti altamente attivi presupponendo che i bersagli farmacologici nell’uomo siano identici o simili sia nei vertebrati che negli invertebrati. Quest’assunzione si basa sul fatto che alcuni recettori, vie biochimiche ed enzimi sono conservati nell’evoluzione (ad es. recettori per gli ormoni steroidei, Menuet et al., 2002; recettori adrenergici, Nickerson et al., 2001; recettori insulinici e del glucagone, Navarro

et al., 1999). I composti che agiscono su questi recettori possono essere considerati altamente attivi, poiché sono coinvolti nella regolazione di importanti vie fisiologiche.

- II. Omologia tra i bersagli. I recettori e gli enzimi sono il più delle volte conservati tra i vari gruppi di vertebrati e, le omologie tra vertebrati ed invertebrati sono spesso incredibilmente elevate (omologie nelle sequenze tra pesci e uomo raggiungono il 90%, Oba et al., 2000).

Fase I: Individuazione del meccanismo d'azione del composto, in particolare la specificità a livello recettoriale. I farmaci con azione specifica infatti sono attivi anche se presenti in tracce.

Fase II: Valutazione del grado di omologia tra i bersagli umani e quelli degli organismi non target. Il rischio di indurre un effetto simile a quello che si riscontrerebbe nell'uomo aumenta all'aumentare del grado di omologia.

Fase III: Classificazione delle vie biologiche alterate/regolate dai farmaci. Solo i farmaci che agiscono su recettori/enzimi che regolano importanti vie biologiche (quali riproduzione e accrescimento) sono considerati composti altamente attivi.

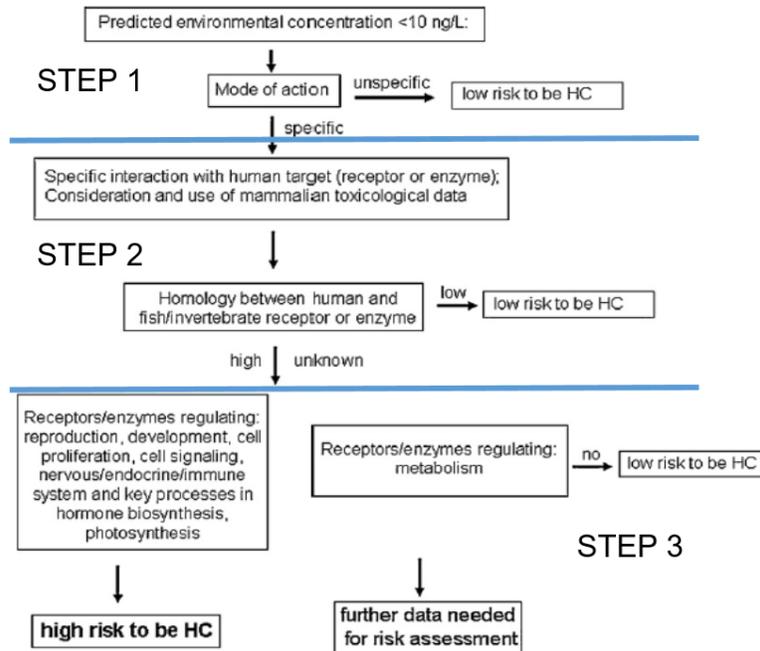


Fig. 1.3.2: Diagramma di flusso con i criteri che identificano i composti di elevata preoccupazione (HC) tra i farmaci ad uso umano. Nel primo step sono presenti due categorie (modo d’azione noto o non noto). Il secondo step rappresenta tre possibili categorie: omologia bassa, alta o sconosciuta. Le sostanze appartenenti alle ultime due categorie passano allo step tre formato da due categorie indipendenti: composti con basso o nullo rischio di essere HC e composti che presentano un alto rischio. (Modificato da Christen et al., 2010)

L’ “Adverse Outcome Pathway” (AOP) è un modello concettuale sviluppato nel 2010 da Ankley *et al.* per la valutazione del rischio ecologico. Si basa sul principio che un evento iniziale (ad es. interazione molecolare tra un farmaco ed il suo bersaglio) sia in grado di scatenare una serie di eventi sequenziali che portino ad un esito finale negativo nei vari livelli dell’organizzazione biologica (Fig. 1.3.3). Il termine “Adverse Outcome Pathway” (meccanismo che determina un effetto avverso) è stato proposto in opposizione al “Toxicity Pathway” (meccanismo di tossicità) definito nel 2007 dal *National Research Council* (NRC). Il meccanismo di tossicità è stato definito come “quella risposta cellulare in grado, se sufficientemente perturbata, di provocare effetti collaterali per la salute” (NRC, 2007). Benché il collegamento con un esito negativo sia implicito in questa definizione, il focus del NRC è esclusivamente sugli eventi scatenanti e le risposte cellulari che possono essere misurate *in vitro*. L’AOP estende la definizione di meccanismo di tossicità, considerando tutte quelle connessioni che collegano

l'evento scatenante ad un esito avverso rilevante per la valutazione di rischio. Un AOP completamente sviluppato deve tener conto del modo e del meccanismo d'azione delle sostanze. Nella valutazione di rischio ecologico, si intende quindi quantificare gli *endpoint* di importanza demografica che possono essere utilizzati per prevedere i potenziali impatti sulla popolazione.



Fig. 1.3.3: Diagramma concettuale delle caratteristiche fondamentali di un AOP. Ogni AOP inizia con un evento molecolare scatenante in cui si ha l'interazione tra un composto chimico ed il bersaglio molecolare. Questo porta ad una serie di eventi sequenziali che inducono un effetto avverso rilevante per la valutazione del rischio (es. sopravvivenza, sviluppo, riproduzione, etc.). I primi tre box sono i parametri che definiscono il meccanismo di tossicità per l'NRC. (Modificato da Ankley et al., 2010)

1.4 Gli organismi oggetto di studio

Gli organismi acquatici sono target importanti per studiare gli effetti dei residui farmaceutici, poiché vengono esposti per tutta la durata della loro vita a questi contaminanti attraverso le acque reflue. Dati di ecotossicità acuta sono stati riportati per un gran numero di farmaci, tuttavia, questi dati da soli non spiegano gli effetti ambientali e di conseguenza non sono sufficienti per la valutazione del rischio ambientale (Fent, 2003). In particolare mancano dati riguardanti gli effetti cronici di tali composti sugli organismi acquatici che sono stati indagati solo raramente (Fent et al., 2006).

Nel presente studio le specie acquatiche scelte come organismi target per il progetto di dottorato sono il mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) e l'anguilla europea (*Anguilla*

anguilla). Queste due specie oltre ad avere caratteristiche intrinseche che le rendono dei buoni bioindicatori della qualità ambientale (ad es. ampia distribuzione geografica, lungo ciclo biologico, *etc.*) ed essere facilmente manipolabili in laboratorio, ricoprono un ruolo socio-economico di estrema rilevanza sia a livello nazionale che mondiale. Sono infatti due organismi edibili di particolare interesse commerciale, la cui produzione incide enormemente sull'economia nazionale.

La mitilicoltura italiana costituisce una realtà riconosciuta a livello internazionale; l'Italia ricopre infatti il terzo posto tra i produttori mondiali ed il quarto per l'esportazione del prodotto (dati FAO <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/en>). In particolare in Emilia-Romagna, gli impianti che si sviluppano dal largo di Porto Garibaldi fino a Cesenatico, Rimini e Cattolica, producono circa 9 mila tonnellate di prodotto annuo per un valore commerciale di oltre 5 milioni di euro.

L'anguilla europea è da sempre parte della gastronomia di diversi paesi in tutta Europa. Tradizionalmente le anguille vengono allevate in allevamenti estensivi (lagune costiere e valli salmastre) ma, dato il repentino declino della specie (inserita nella lista rossa dello IUCN nel 2007), si è passati ad allevamenti di tipo intensivo in acque dolci. L'Italia è al terzo posto nella produzione europea dell'anguilla, preceduta solamente da Olanda e Danimarca, con una produzione annua di circa 1.000 tonnellate (FEAP Production Report 2015).

1.4.1 Mitilo Mediterraneo

I molluschi bivalvi, in particolare i mitili della specie *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819), oltre ad essere una specie edibile di interesse zootecnico, è una delle specie maggiormente utilizzate come bioindicatore dello stato ecologico degli ecosistemi marino costieri nei programmi di monitoraggio ambientale (Bolognesi and Cirillo, 2014). Il *M. galloprovincialis* appartiene alla famiglia Mytilidae, ordine Mytiloida, classe Bivalvia, phylum Mollusca. Sono bivalvi sessili che vivono nella zona intertidale ancorati a substrati rocciosi tramite il bisso, secrezione ghiandolare che indurendosi, lega stabilmente l'animale al substrato. Il corpo è compresso lateralmente e racchiuso da una conchiglia formata da due

valve, tenute insieme dorsalmente da un legamento a cerniera che ne determina l'apertura (Fig. 1.4.4.1). Questa caratteristica permette all'animale di evitare l'essiccamento durante le fasi di bassa marea, chiudendo in maniera ermetica le valve e tenendovi all'interno un certo quantitativo d'acqua. Le valve sono ricoperte dal mantello, tessuto responsabile dell'accumulo delle sostanze di riserva e dello sviluppo delle gonadi (Lubet, 1957). Le branchie svolgono la duplice funzione di garantire gli scambi gassosi e permettere la captazione delle particelle alimentari in sospensione. La filtrazione avviene per mezzo di un flusso unidirezionale di acqua garantito dall'azione modulata di un sifone inalante, che pompa l'acqua all'interno della cavità del mantello esponendola alla superficie branchiale, ed un sifone esalante con cui l'acqua viene espulsa all'esterno. Il sistema circolatorio è di tipo aperto, mentre quello nervoso è costituito da gangli pari e da commisture anastomizzate che permettono l'innervazione dei diversi distretti corporei.

I mitili sono organismi sessili filtratori con ampia distribuzione geografica, in grado di accumulare e tollerare una vasta gamma di composti di natura antropica anche a concentrazioni elevate, fornendo delle risposte circa lo stato di salute dell'animale stesso che della qualità ambientale. I mitili sono inoltre facilmente allevabili in condizioni di laboratorio e per tale motivo vengono spesso impiegati in test ecotossicologici volti a determinare eventuali correlazioni tra la presenza di specifici inquinanti (ad es. farmaci) nelle acque e l'alterazione dei processi biologici che definiscono il ruolo ecologico della specie negli ecosistemi marino costieri.

I mitili presentano un sistema vascolare aperto; il fluido circolante è l'emolinfa che pervade la maggior parte degli organi favorendo l'esposizione all'ambiente esterno e di conseguenza ai contaminanti. L'esposizione agli inquinanti può compromettere la risposta immunitaria dell'organismo, portando progressivamente allo sviluppo di infezioni e lesioni cancerose (Gagné et al., 2006). Gli emociti (cellule dell'emolinfa) svolgono diverse funzioni, in particolare costituiscono il sistema immunitario e sono importanti per l'accumulo di sostanze nutritive, di prodotti del metabolismo e dei pigmenti respiratori. Queste cellule sono particolarmente indicate per studi sperimentali in quanto rappresentano un sistema omogeneo, rendendo la valutazione della loro risposta fisiologica più chiara e semplice.

Altra componente importante nella fisiologia della specie è costituita dal sistema lisosomiale, particolarmente ricco negli emociti, che interviene nella risposta immunitaria per contrastare gli effetti avversi indotti dai contaminanti ambientali. I lisosomi sono organelli cellulari deputati alla degradazione delle macromolecole ed al riciclaggio delle sostanze organiche cellulari. Quando le cellule presentano un sovraccarico di prodotti di degradazione, possono verificarsi profonde alterazioni strutturali della membrana lisosomiale che determinano a loro volta la perturbazione dei naturali processi di degradazione e digestione intracellulare. Se protratta nel tempo questa condizione può avere come peggiore conseguenza la comparsa di fenomeni più o meno generalizzati di necrosi cellulare dovuta alla diffusione degli enzimi idrolitici nel citoplasma con importanti ripercussioni sullo stato nutrizionale degli individui esposti alle fonti inquinanti (UNEP/RAMOGGE, 1999).

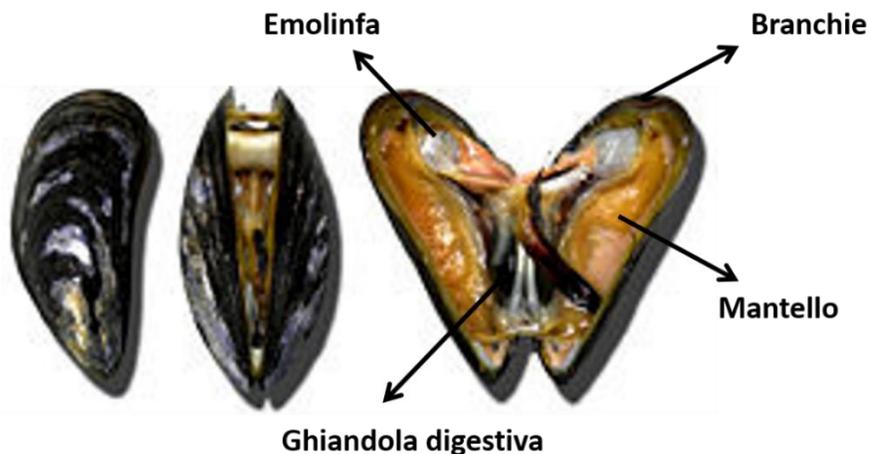


Fig. 1.4.1.1: Anatomia di *Mytilus galloprovincialis*

1.4.2 Anguilla Europea

L'utilizzo di pesci come modelli sperimentali è aumentato notevolmente negli ultimi anni, soprattutto data la maggiore consapevolezza dei problemi ambientali. Questi animali colonizzano svariati habitat acquatici e sono più presenti di tutte le altre classi di vertebrati, rendendoli per questo motivo, indicatori ideali della qualità ambientale. I pesci sono oggi usati in diverse situazioni sperimentali, dall'animale nel suo insieme, alle cellule isolate, ai geni. Queste preparazioni permettono di spiegare i meccanismi con cui le specie si adattano ai

cambiamenti ambientali, e di verificare come questi cambiamenti possono influenzare i pesci stessi.

L'anguilla europea (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1798) è un pesce teleosteo catadromo appartenente alla famiglia Anguillidae, ordine Anguilliformes, classe Actinopterygii, phylum Chordata. E' un animale acquatico caratterizzato da un corpo serpentiforme di forma cilindrica eccezione fatta per la parte terminale del corpo che è compressa lateralmente. Ulteriori dettagli morfologici sono descritti da Tesch (2003).

Il ciclo vitale di questo pesce (Fig. 1.4.2.1) dipende fortemente dalle condizioni oceaniche; i processi di maturazione, migrazione, di deposizione delle uova, dei trasporti larvali e di reclutamento si completano in mare aperto (Tesch, 2003). Dettagli più approfonditi riguardo al ciclo biologico sono descritti nel **Capitolo II**.

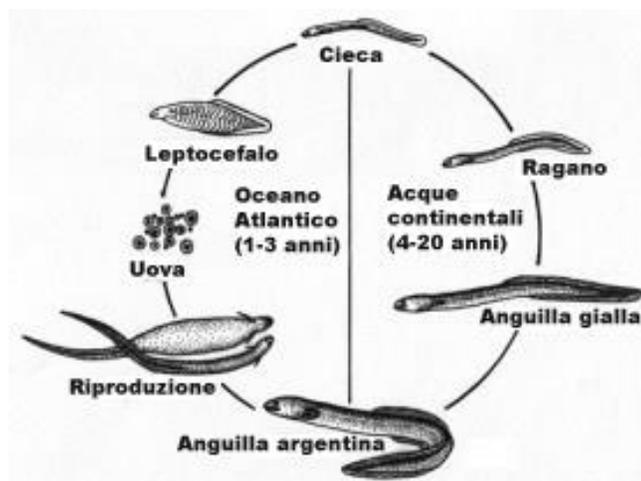


Fig. 1.4.2.1: Ciclo biologico di *Anguilla anguilla* (Mod. ICES)

Il sito di riproduzione si trova a migliaia di chilometri dal continente europeo, nel Mar dei Sargassi (Aarestrup et al., 2009). Le larve vengono trasportate lungo la corrente del Golfo e quella Nord-Atlantica verso le coste europee e nel bacino mediterraneo. La si ritrova dai Paesi Scandinavi e dall'Islanda fino alle coste mediterranee del Nord Africa e del Medio Oriente, e sul versante Atlantico del Marocco, comprese le isole Azzorre. In Italia è presente in tutte le acque dolci e salmastre della penisola (Fig. 1.4.2.2).

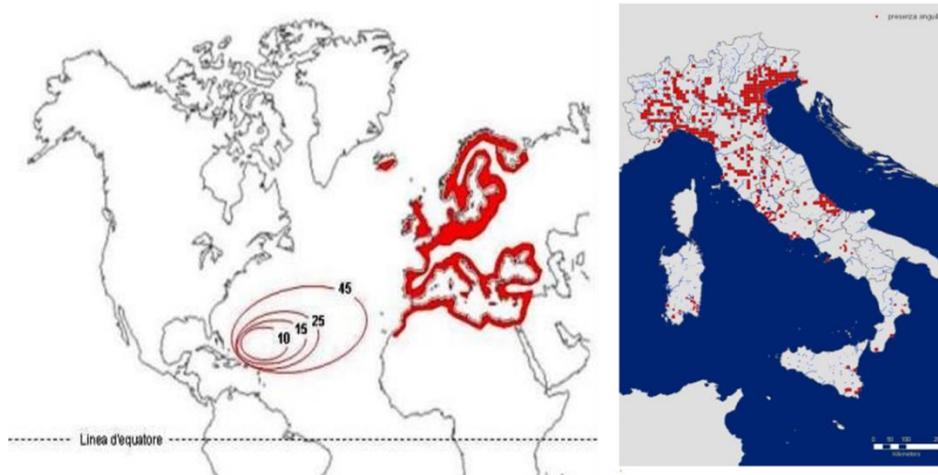


Fig. 1.4.2.2: A sinistra: distribuzione di *A. anguilla*. Sono indicate l'area di riproduzione e di dispersione larvale. I numeri indicano le dimensioni in mm raggiunte dalle larve secondo Schmidt. In rosso l'areale di distribuzione nelle acque continentali (fonte www.lagunaproject.it). A destra: distribuzione dell'anguilla in Italia (fonte www.regione.fvg.it)

Negli ultimi 30 anni, l'anguilla europea ha sofferto di un repentino declino in tutto il suo areale di distribuzione e gli stock sono ora considerati al di sotto dei limiti biologici di sicurezza (Moriarty and Dekker, 1997; Feunteun, 2002; Dekker, 2003; ICES 2010). Il reclutamento delle ceche è diminuito drasticamente all'inizio degli anni 80, crollando fino all' 1% dei suoi livelli originari (ICES, 2002). Il declino della popolazione è da imputare ad una serie di fattori concomitanti: l'eccessivo sforzo di pesca, la perdita di habitat, la presenza di parassiti, i cambiamenti climatici e la diminuzione nella qualità dell'acqua a causa degli inquinanti (Feunteun, 2002). Questo declino repentino ha portato, nel 2008, all'inserimento di questa specie nella lista rossa dello IUCN (*International Union for Conservation of Nature*).

Poiché l'anguilla presenta un'ampia distribuzione geografica nelle acque interne ed un ciclo vitale molto lungo (fase trofica della durata da 4-20 anni; Tesch 2003), risulta essere maggiormente esposta ai contaminanti ambientali rispetto ad altri pesci. Tende infatti a bioaccumulare gli inquinanti per le sue caratteristiche ecologiche (accrescimento bentonico) e fisiologiche (alto contenuto di grassi) (Belpaire et al., 2007). L'accumulo di tali contaminanti durante la fase di accrescimento potrebbe indebolire la qualità dei riproduttori (Van den Thillart et al., 2009; Maes et al., 2013), compromettendo il successo della migrazione e, di conseguenza,

contribuire al declino del reclutamento larvale (Capoccioni et al., 2014). Per queste caratteristiche, l'utilizzo dell'anguilla risulta essere un buon modello di studio per valutare gli effetti degli inquinanti presenti in ambiente.

1.5 I Biomarker: strumenti per la valutazione della qualità ambientale

Grazie agli sviluppi degli ultimi anni nel campo della tossicologia ambientale, è ora possibile capire molti effetti dei contaminanti sugli organismi marini a livello molecolare, cellulare, tissutale e dell'intero organismo. La valutazione delle risposte fisiologiche è di estrema importanza per stimare la performance riproduttiva degli animali, integrando i cambiamenti osservati nell'attività dei biomarker agli effetti degli inquinanti a livello di popolazione.

Con il termine biomarker si intende quella variazione biochimica, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata nei vari livelli dell'organizzazione biologica, in grado di fornire l'evidenza di un'esposizione ad uno o più composti inquinanti e/o un loro effetto (Cajaraville et al., 2000). Nonostante l'uso dei biomarker abbia luogo da diversi decenni (Stegeman, 1978; Lee et al., 1981), l'accettazione di questi approcci da parte delle agenzie di regolamentazione è stato modesto. Tuttavia le stesse agenzie hanno successivamente concordato che i biomarker risultino essere i migliori indicatori di stress ambientale soprattutto nel lungo periodo. Inizialmente queste risposte furono classificate come i) biomarker di esposizione ad un contaminante, ii) di effetto, o biomarcatori di suscettibilità agli effetti dell'esposizione (Peakall e Shugart, 1993). Recentemente però vengono più generalmente classificati come cambiamenti biochimici sub-letali dopo esposizione a xenobiotici (Hyne e Maher, 2003).

Al fine di stimare la qualità sia dell'ambiente acquatico che degli organismi in esso presente, è raccomandabile utilizzare un approccio basato sull'utilizzo di una batteria di biomarker in concomitanza con analisi chimico-fisiche e test ecotossicologici. L'utilizzo di biomarker è di estrema rilevanza, anche in studi di laboratorio, per poter determinare gli effetti

tossici degli inquinanti anche quando sono presenti a concentrazioni basse/sub-letali (Viarengo et al., 2007). La scelta dei biomarker è di fondamentale importanza e deve considerare:

1. Biomarker sensibili allo stress a livello molecolare e cellulare. Queste vie vengono attivate rapidamente e sono in grado di fornire segnali precoci di tossicità sugli organismi
2. Biomarker che valutano il danno a livello di tessuto
3. Biomarker che valutano gli effetti degli inquinanti a livello di organismo

L'utilizzo di biomarker cellulari in grado di valutare le alterazioni in seguito a stimoli stressori, è in grado di fornire una chiara risposta sulla sindrome da stress.

I lisosomi sono la componente subcellulare maggiormente coinvolta nella risposta immunitaria per contrastare eventuali effetti avversi indotti dai contaminanti ambientali. Sono organelli cellulari circondati da una membrana semipermeabile che contiene numerosi enzimi idrolitici coinvolti in vari processi cellulari quali digestione, difesa e riproduzione (Moore, 1976; Ferreira e Dolder, 2003). Un ruolo fondamentale è quello di degradare le macromolecole esogene e riciclare le sostanze organiche cellulari. Quando i lisosomi presentano un sovraccarico di prodotti di degradazione (IPA, metalli, farmaci, pesticidi, etc.), possono verificarsi alterazioni strutturali a carico della membrana lisosomiale in grado di alterare i normali processi di degradazione e digestione. Se questa condizione permane, nel lungo periodo può indurre fenomeni di necrosi cellulari con ripercussioni sullo stato nutrizionale degli organismi esposti alle fonti inquinanti (UNEP/RAMOGGE, 1999). I lisosomi rappresentano un ottimo indicatore poiché sono in grado di rispondere ad una vasta gamma di contaminanti, sono facili da visualizzare nelle cellule del sangue e in sezioni di tessuto, infine, non essendo specie-specifici, sono presenti in tutte le cellule nucleate.

Verranno di seguito descritti i biomarker utilizzati nel presente progetto di dottorato.

Stabilità delle membrane lisosomiali

Valutata tramite il Neutral Red Retention Assay (NRRRA) sviluppato per la prima volta da Lowe e Pipe (1994); si basa sul fatto che lisosomi danneggiati hanno membrane cellulari destabilizzate, indice di un critico stato di salute. Il colorante rosso neutro (altamente lipofilo) penetra le

membrane e si accumula nei lisosomi. Se le cellule godono di un buono stato di salute e le membrane sono integre, il colorante viene trattenuto nei lisosomi fino a 180 min. Se le membrane lisosomiali sono danneggiate il colorante si riversa nel citosol (Fig. 1.5.1). Il tempo di ritenzione risulterà tanto minore quanto maggiore è l'entità della destabilizzazione. In caso di danno severo il tempo di destabilizzazione è di circa 15 minuti.

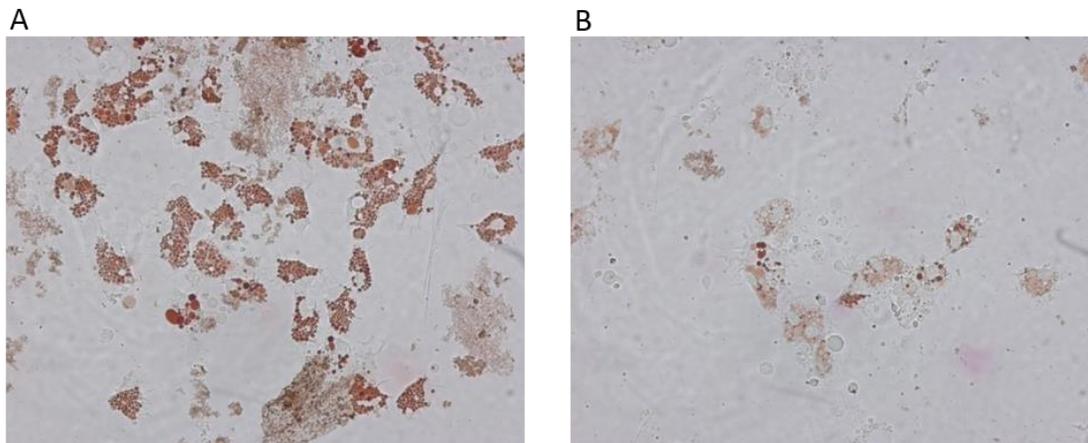


Fig. 1.5.1: Emociti di mitilo in buono stato di salute in cui è ben visibile all'interno dei lisosomi il colorante rosso neutro (A) ed emociti in cui può essere osservato un rilascio di più del 50% del colorante da parte dei lisosomi (B). Fattore di ingrandimento 40x.

La riduzione delle membrane lisosomiali è considerata un indice di stress fisiologico generale ed è stata inserita nella fase I di screening per la valutazione di impatto ambientale in diversi programmi di monitoraggio.

Contenuto di lipofuscine e lipidi neutri

Molto spesso è difficile valutare i cambiamenti molecolari a livello delle membrane lisosomiali, spesso poiché queste analisi richiedono un'intensa purificazione delle membrane stesse. Una metodologia semplice per valutare questo parametro è tramite l'uso di tecniche di citochimica. Questa metodologia è stata ampiamente usata per valutare l'integrità dei lisosomi, ed è considerata uno strumento rapido e sensibile per valutare gli effetti degli xenobiotici ed altri contaminanti a concentrazioni molto basse. Alcuni inquinanti ambientali sono in grado di indurre negli organismi un aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che può produrre alterazioni istopatologiche nel comparto lisosomiale di alcuni tessuti, diminuendo le difese

immunitarie dell'organismo. Un esempio è rappresentato dall'accumulo nei lisosomi di lipofuscine, pigmenti fluorescenti di colore bruno-verdastro (Fig. 1.5.2) che rappresentano i prodotti finali della perossidazione di acidi grassi polinsaturi e proteine. Nei lisosomi questi composti reagiscono con altri prodotti di degradazione, causando alterazioni nell'attività lisosomiale per inattivazione dei processi di degradazione enzimatica (Viarengo et al., 2007; Moore et al., 2007). Le lipofuscine sono composti caratterizzati principalmente da residui lipidici e proteici che si legano a carboidrati e metalli tra cui ferro, mercurio, alluminio, zinco e rame (George and Viarengo, 1985; Viarengo and Nott, 1993; Terman and Brunk, 2004). L'accumulo di questi pigmenti nel sistema vacuolare della ghiandola digestiva di mitilo rappresenta un indice di stress ossidativo nelle cellule ed è correlato ai livelli di perossidazione lipidica di membrana (Viarengo and Nott, 1993; Moore et al., 2006).

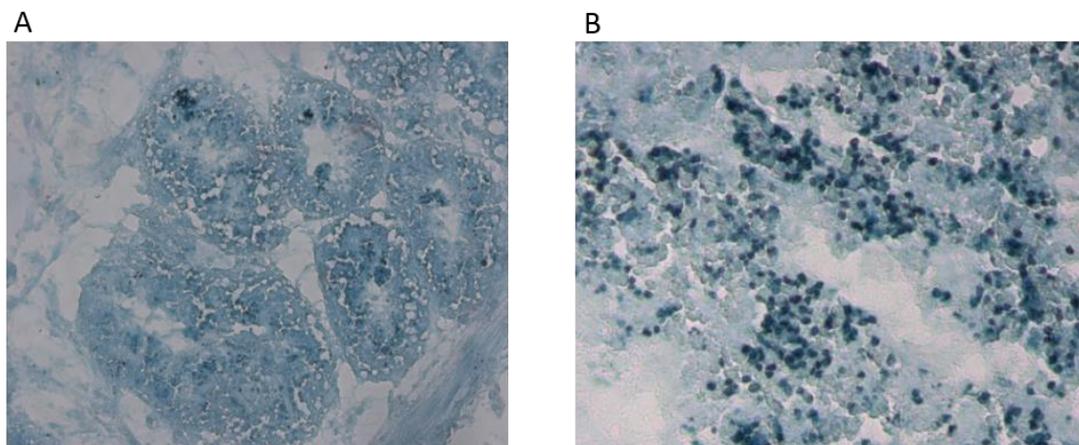


Fig. 1.5.2: Accumulo di lipofuscine (granuli scuri) osservato in fettine di 10 μm di spessore di ghiandola digestiva di mitilo. A: controllo; B: campione esposto ad inquinanti (fattore di ingrandimento 40x).

L'effetto degli inquinanti è spesso associato ad un metabolismo sbilanciato degli acidi grassi e ad un conseguente accumulo di lipidi neutri nel sistema lisosomiale. L'accumulo di questi composti nella ghiandola digestiva di mitilo e negli epatociti di pesce si è dimostrato essere un utile indicatore di cambiamenti nella fisiologia delle cellule (Koehler et al., 2004). Un accumulo di queste sostanze nella ghiandola digestiva di mitilo può essere visto come una forma di lipidosi indotta dai composti tossici (Moore, 1988). Dopo esposizione ai contaminanti, i lipidi neutri vengono inizialmente stoccati nel citoplasma per poi essere internalizzati nei lisosomi per

autofagia (Fig. 1.5.3). Un aumento nel contenuto di lipidi neutri nei lisosomi potrebbe essere correlato ad un aumento nel contenuto lipidico citosolico o ad una diminuzione nella produzione di acidi grassi (Viarengo et al., 2007).

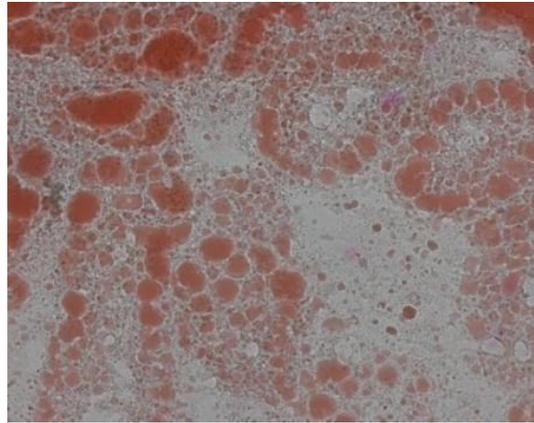


Fig. 1.5.3: Accumulo di lipidi neutri osservato in fettine di 10 μm di spessore di ghiandola digestiva di mitilo (fattore di ingrandimento 40x).

Rapporto lisosoma/citoplasma

All'interno della ghiandola digestiva è possibile valutare la funzionalità del sistema vacuolare, dopo esposizione ad agenti inquinanti, tramite l'analisi del rapporto lisosomi/citoplasma. Questo parametro viene evidenziato tramite una reazione colorimetrica in cui si mette in evidenza l'attività dell'enzima N-acetyl- β -esosaminidasi coinvolto nei processi di degradazione e digestione nei lisosomi (Franzellitti et al., 2013). Con questo biomarker è possibile stimare i processi di autofagia che avvengono nei lisosomi, fenomeno spesso presente nei molluschi bivalvi esposti ad inquinanti ambientali, in cui si osserva un aumento del volume dei lisosomi all'interno del citoplasma, come conseguenza di alterazioni dello stato redox degli organelli cellulari (Moore et al., 2008).

Attività degli enzimi antiossidanti

I contaminanti presenti in ambiente sono spesso in grado di aumentare i livelli cellulari dei ROS attraverso l'alterazione dell'attività di alcuni enzimi coinvolti nella risposta detossificante, diminuendo così le difese immunitarie dell'organismo. La valutazione dell'attività degli enzimi catalasi (CAT) e glutatione-S-transferasi (GST) tramite tecniche *low-cost*, è da sempre impiegata sia in studi in laboratorio che in programmi di biomonitoraggio sia su pesci che su mitili. La

risposta enzimatica ai contaminanti mostra un andamento a campana con un aumento iniziale dovuto alla sintesi dell'enzima seguito da una diminuzione nell'attività enzimatica (dovuta ad un tasso metabolico maggiore e/o un'azione inibitoria diretta dei contaminanti sull'enzima stesso). Per questo motivo, queste tecniche devono essere usate in concomitanza con altri biomarker come la stabilità delle membrane lisosomiali e l'accumulo di lipofuscine che aumentano o diminuiscono seguendo lo sviluppo della sindrome da stress indotta dagli inquinanti e quindi permettono di interpretare correttamente il "significato fisiologico" dei cambiamenti osservati nell'attività degli enzimi antiossidanti (Viarengo et al., 2007). L'attività dell'enzima CAT, seppure non risponda in maniera specifica ad un determinato gruppo di contaminanti, viene considerata come la prima difesa contro il danno ossidativo. CAT è un enzima antiossidante intracellulare coinvolto nei meccanismi di difesa contro i radicali liberi generati dai contaminanti ambientali. E' un'idroperossidasi perossisomiale in grado di degradare due molecole di H_2O_2 in H_2O e O_2 (Giarratano et al., 2010), e presentando un elevato turnover, è in grado di convertire 40 milioni di molecole di perossido di idrogeno in acqua ed ossigeno ogni secondo. Per queste caratteristiche è considerato un importante biomarker di stress ossidativo in grado di evidenziare gli effetti sullo stato redox degli organismi marini.

La GST è l'enzima che catalizza il processo di detossificazione che prevede la coniugazione di particolari composti xenobiotici altamente lipofili (ad es. pesticidi, farmaci, PCB) con il glutatione ridotto (GSH), il quale li trasforma in molecole più solubili, e dunque più facilmente eliminabili dalle cellule e dall'organismo. Dato il suo coinvolgimento nei processi di detossificazione degli xenobiotici, l'attività di questo enzima è stata proposta come biomarker per diverse specie acquatiche come pesci, crostacei e molluschi (Bebiano et al., 2007).

Formazione di malondialdeide (MDA)

La malondialdeide è un prodotto intermedio della perossidazione lipidica e della biosintesi delle prostaglandine. E' un metabolita mutageno dall'elevata reattività, caratteristica che lo rende facilmente degradabile a livello lisosomiale (Viarengo et al., 2007). Tuttavia la sua determinazione quantitativa all'interno di tessuti biologici di organismi sentinella trova ampia applicazione come biomarker di perossidazione lipidica. Viene spesso utilizzato come marcatore

citochimico dell'ossidazione dei fosfolipidi di membrana ed è considerato un indice importante nelle analisi di danni chimici indotti da agenti inquinanti nei mitili (Giarratano et al.,2010).

Attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE)

Le colinesterasi (ChEs) rappresentano una classe ben nota di idrolasi (Walker and Thompson, 1991). Sono enzimi ubiquitari la cui funzione fisiologica è rimuovere l'acetilcolina dalle fessure sinaptiche. L'acetilcolinesterasi (AChE) è un enzima che scinde il neurotrasmettitore delle giunzioni neuromuscolari, l'acetilcolina, in acetato e colina, mettendo fisiologicamente fine all'evento di contrazione muscolare. L'inibizione dell'attività dell'AChE è alla base della tossicità dei pesticidi organofosfati e carbamati largamente usati in agricoltura, in quanto essi si legano in modo reversibile o irreversibile al sito catalitico dell'enzima. Per questo motivo la valutazione dell'attività dell'AChE è largamente impiegata come indicatore specifico dell'esposizione a questi composti, anche in ambiente acquatico ed utilizzato come biomarker di esposizione in studi di biomonitoraggio sia su molluschi (Valbonesi et al., 2003; Galloway et al., 2002) che su pesci (Rodriguez-Fuentes and Gold-Bouchot, 2004; Valbonesi et al., 2011).

Livelli tissutali di metallotioneine (MT)

Le metallotioneine (MT) sono proteine citoplasmatiche a basso peso molecolare, ricche di cisteina, in grado di legare stabilmente non solo metalli essenziali come Cu e Zn, ma anche elevate quantità di metalli tossici come Cd e Hg, riducendone gli effetti tossici. Queste proteine sono inducibili dall'accumulo di cationi di metalli, quindi la loro neo sintesi rappresenta una risposta specifica dell'organismo all'inquinamento da metalli, molto presenti nelle aree costiere dei paesi industrializzati. Sono generalmente espresse nei tessuti degli animali e sono fortemente sovra regolate come conseguenza all'esposizione a metalli pesanti sia nei pesci che nei molluschi (Bremner, 1987; Webb, 1987; Viarengo et al., 1999).

Danno al DNA

Alcuni contaminanti presenti in ambiente sono in grado di indurre effetti genotossici, alterando l'integrità della struttura del DNA sia direttamente o attraverso i loro metaboliti. Le alterazioni indotte dagli inquinanti includono rotture a singolo e doppio filamento, modificazione di basi,

DNA-DNA crosslink, etc. Le rotture alla doppia elica possono essere causate indirettamente dai radicali liberi dell'ossigeno, o dall'azione di enzimi di restrizione, o come conseguenza di fenomeni di apoptosi o necrosi (Eastman and Barry, 1992; Speit and Hartmann, 1995). Vari saggi possono essere utilizzati per valutare le rotture al doppio filamento di DNA. Nel presente studio il danno al DNA è stato valutato tramite precipitazione alcalina e lettura in fluorescenza utilizzando un agente intercalante.

Rilascio di glucosio da epatociti isolati

L'utilizzo di epatociti intatti isolati dal fegato è stato descritto per la prima volta da Berry e Friend nel 1969. Nell'ambito della tossicologia dei mammiferi, le cellule epatiche si sono dimostrate uno strumento promettente per valutare gli effetti sub-letali dei composti chimici, poiché principalmente coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici (Rauckman and Padilla, 1987). Solamente da qualche decennio l'utilizzo di questo modello cellulare è entrato a far parte della tossicologia degli organismi acquatici (Baksi and Frazier, 1990), dopo il primo studio condotto su epatociti isolati di pesce rosso (Birnbaum, 1976). Gli approcci *in vitro* permettono di ottenere informazioni riguardanti cellule epatiche che conservano tutte le loro caratteristiche funzionali, senza la complessità dell'animale nel suo insieme. Inoltre permettono di condurre un grande numero di esperimenti limitando la quantità di animali da utilizzare.

Il fegato svolge un ruolo importantissimo nel mantenere l'omeostasi nei pesci; gli epatociti nello specifico svolgono diverse funzioni dal metabolismo dei nutrienti all'immagazzinamento delle riserve energetiche (glicogeno e lipidi), dal mantenimento dei livelli di glucosio nel sangue al metabolismo degli xenobiotici (Segner, 1998). Ricoprono un ruolo fondamentale anche nella risposta allo stress nel processo definito di "combattimento o fuga". L'aumento di energia metabolica che ne consegue è appagata grazie l'effetto delle catecolamine, adrenalina e noradrenalina, tramite il legame coi recettori adrenergici sul fegato. Queste inducono la demolizione delle scorte di glicogeno e la formazione di glucosio rilasciato nel sangue attraverso la stimolazione dei recettori adrenergici presenti sulla membrana degli epatociti.

La valutazione della quantità di glucosio rilasciata dagli epatociti può essere considerata un biomarker cellulare ottimale per valutare le alterazioni della via del metabolismo glucidico.

Questa via può essere alterata sia a causa di stimoli stressori naturali che in seguito l'esposizione a xenobiotici (Fabbri et al.,1998a; Caselli et al., 2002). Inoltre data la presenza di specifici recettori posti sulla membrana cellulare degli epatociti, è possibile valutare selettivamente gli effetti di una determinata classe di farmaci.

1.6 Riferimenti Bibliografici

- Aarestrup K, Økland F, Hansen M, Righton D, Gargan P, Castonguay M, Bernatchez L, Howey P, Sparholt H, Pedersen MI, McKinley RS. (2009) Oceanic Spawning Migration of the European Eel (*Anguilla anguilla*). *Science* 325, 1660.
- Aguirre-Martínez GV, Owuor MA, Garrido-Pérez C, Salamanca MJ, Del Valls TA, Martín-Díaz ML. (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.
- Al-Ansari AM, Saleem A, Kimpe LE, Sherry JP, McMaster ME, Trudeau VL, Blais JM. (2010) Bioaccumulation of the pharmaceutical 17alpha-ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, *Canada Environ Pollut*. 158:2566-2571.
- Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Hornung MW, Johnson RD, Mount DR, Nichols JW, Russom CL, Schnieder PK, Serrano JA, Tietge JE, Villeneuve DL. (2010) Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem*. 3:730-741.
- Baker ME, Ruggeri B, Sprague LJ, Eckhardt-Ludka C, Lapira J, Wick I, Soverchia L, Ubaldi M, Polzonetti-Magni AM, Vidal-Dorsch D, Bay S, Gully JR, Reyes JA, Kelley KM, Schlenk D, Breen EC, Sásik R, Hardiman G. (2009) Analysis of endocrine disruption in Southern California coastal fish using an aquatic multispecies microarray. *Environ Health Perspect*. 117:223-230.
- Baksi SM and Frazier JM. (1990) Isolated fish hepatocytes: model systems for toxicology research. *Aquat Toxicol*. 16:229-256.
- Bayen S, Zhang H, Desai MM, Ooi SK, Kelly BC. (2013) Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore's marine environment: influence of hydrodynamics and physical-chemical properties. *Environ Pollut*. 182:1-8.
- Bebianno MJ, Lopes B, Guerra L, Hoarau P, Ferreira AM. (2007) Glutathione S transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. *Environ Int*. 2007 33: 550-558.
- Benotti MJ, Trenholm RA, Vanderford BJ, Holady JC, Stanford BD, Snyder SA. (2009) Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ Sci Technol*. 43:597-603.
- Berry MN, and Friend DJ. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol*. 43:506-520.
- Birnbaum MJ, Schultz J, Fain JN. (1976) Hormone-stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes. *Am J Physiol*. 231:191-197.
- Bolognesi C, Cirillo S. (2014) Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Current Zoology* 60:273–284.
- Bossus MC, Guler YZ, Short SJ, Morrison ER, Ford AT. (2014) Behavioural and transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. *Aquat Toxicol*. 151:46-56.
- Boxall AB. (2004) The environmental side effects of medication. *EMBO Rep*. 5:1110-1116.
- Bremner I. (1987) Interactions between metallothionein and trace elements. *Prog Food Nutr Sci*. 11:1–37.
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ*. 247:295–311.
- Calamari D, Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R. (2003) Strategic survey of therapeutic drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environ Sci Technol*. 37:1241-1248.
- Caselli F, Capuzzo A, Piano A, Valbonesi P, Fabbri E. (2002) G proteins immunodetection and adrenergic transduction pathways in the liver of *Anguilla anguilla*. *Physiol Biochem Zool*. 75:609-616.
- Chen H, Liu S, Xu XR, Liu SS, Zhou GJ, Sun KF, Zhao JL, Ying GG. (2015) Antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: occurrence, bioaccumulation and human dietary exposure. *Mar Pollut Bull*. 90:181-187.
- Christen V, Hickmann S, Rechenberg B, Fent K. (2010) Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. *Aquat Toxicol*. 96:167-181.
- Christensen FM. (1998) Pharmaceuticals in the environment-a human risk? *Regul Toxicol Pharmacol*. 28:212-221.

- Commission Directive 92/18/EEC (1992) Modifying the Annex to Council Directive 81/852/EEC on the Approximation of the Laws of Member States Relating to Analytical, Pharmacotoxicological and Clinical Standards and Protocols in Respect of the Testing of Veterinary Medicinal Products.
- Crain CM, Halpern BS, Beck MW, Kappel CV. (2009) Understanding and managing human threats to the coastal marine environment. *Ann N Y Acad Sci.* 1162:39-62.
- Dagnino A, Allen JI, Moore MN, Broeg K, Canesi L, Viarengo A. 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* 12:155-172.
- Daughton CG, Ternes TA. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect.* 107 Suppl 6:907-938.
- Daughton CG. (2007) "Pharmaceuticals in the Environment: Sources and Their Management," Chapter 1, 1-58, In Analysis, Fate and Removal of Pharmaceuticals in the Water Cycle (M. Petrovic and D. Barcelo, Eds.), Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry series (D. Barcelo, Ed.), Vol 50 Science, 564pp.
- Dekker W. (2003) Eel stocks dangerously close to collapse. ICES newsletter 40, 10-11.
- Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.
- Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use.
- Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use
- Eastman A, Barry MA. (1992) The origin of DNA breaks: a consequence of DNA damage. DNA repair or apoptosis? *Cancer Investig.* 10: 229–240.
- EMEA (1998) Note for Guidance: Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicinal Products Other Than GMO-Containing and Immunological Products, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Veterinary Medicines Evaluation Unit, EMEA/CVMP/055/96-FINAL.
- EMEA (2006) Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). European Medicines Agency Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00.
- Ericson H, Thorsén G, Kumblad L. (2010) Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquat Toxicol.* 99:223-231.
- Evans DH. (1993) The Physiology of Fishes. CRC Press: Boca Raton, FL., 1993.
- Fabbri E, Barbin L, Capuzzo A, and Biondi C. (1998a) Adenylyl cyclase activity and glucose release from the liver of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Am J Physiol.* 257: 1563-1570.
- Fabbri E, Franzellitti S. (2015) Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environ Toxicol Chem.* doi: 10.1002/etc.3131
- Fair PA, Lee HB, Adams J, Darling C, Pacepavicius G, Alae M, Bossart GD, Henry N, Muir D. (2009) Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and in their environment. *Environ Pollut.* 157:2248-2254.
- FEAP (2015). European aquaculture production report 2005-2014.
- Fedorova G, Nebesky V, Randak T, Grabic R. (2014) Simultaneous determination of 32 antibiotics in aquaculture products using LC-MS/MS. *Chem Pap.* 68:29-36.
- Fenet H, Arpin-Pont L, Vanhoutte-Brunier A, Munaron D, Fiandrino A, Martínez Bueno MJ, Boillot C, Casellas C, Mathieu O, Gomez E. (2014) Reducing PEC uncertainty in coastal zones: a case study on carbamazepine, oxcarbazepine and their metabolites. *Environ Int.* 68:177-184.
- Fent K, Weston AA, Caminada D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 76:122-159.
- Fent K. (2003) Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol Lett.* 140-141: 353-65. Review.
- Ferreira A, Dolder H. (2003) Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata). *Acta Histochem.* 105:339-352.
- Feunteun EE. (2002) Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain. *Ecological Engineering.* 18:575–591.
- Franzellitti S, Buratti S, Capolupo M, Du B, Haddad SP, Chambliss CK, Brooks BW, Fabbri E. (2013) An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquat Toxicol.* 151:14-26.

- Fujioka J. (2002) Effects of hormone treatments and temperature on sex-reversal of *Nigrobuna Carassius* and *Carassius grandoculis*. *Fish Sci.* 68:889-893.
- Gagné F, Blaise C, Fournier M, Hansen PD. (2006) Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comp Biochem Physiol. C Toxicol Pharmacol.* 143: 179-86.
- Galloway TS, Millward N, Browne MA, Depledge MH. (2002) Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusk *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarker. *Aquat Toxicol.* 61:169–180.
- Gaw S, Thomas KV, Hutchinson TH. (2014) Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369(1656).
- Gelsleichter J, Szabo NJ. (2013) Uptake of human pharmaceuticals in bull sharks (*Carcharhinus leucas*) inhabiting a wastewater-impacted river. *Sci Total Environ.* 456-457:196-201.
- George SG, Viarengo A. (1985) A model for heavy metal homeostasis and detoxication in mussel. *Mar Pollut Physiol. Recent Advances* 125-143.
- Giarratano E, Duarte CA, Amin OA. (2010) Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. *Ecotoxicol Environ Saf.* 73: 270-279.
- Glassmeyer ST, Hinchey EK, Boehme SE, Daughton CG, Ruhoy IS, Conerly O, Daniels RL, Lauer L, McCarthy M, Nettesheim TG, Sykes K, Thompson VG. (2009) Disposal practices for unwanted residential medications in the United States. *Environ Int.* 35:566-572.
- Gomez E, Bachelot M, Boillot C, Munaron D, Chiron S, Casellas C, Fenet H. (2012) Bioconcentration of two pharmaceuticals (benzodiazepines) and two personal care products (UV filters) in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) under controlled laboratory conditions. *Environ Sci Pollut Res Int.* 19:2561-2569.
- Gómez MJ, Martínez Bueno MJ, Lacorte S, Fernández-Alba AR, Agüera A. (2007) Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere.* 66:993-1002.
- Grigorakis K, Rigos G. (2011) Aquaculture effects on environmental and public welfare - the case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere.* 85:899-919.
- Guler Y, Ford AT. (2010) Anti-depressants make amphipods see the light. *Aquat Toxicol.* 99:397-404.
- Hampel M, Alonso E, Aparicio I, Santos JL, Leaver M. (2015) Hepatic proteome analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to environmental concentrations of human pharmaceuticals. *Mol Cell Proteomics.* 14:371-381.
- Huggett DB, Cook JC, Ericson JF, Williams RT. (2003a) A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Hum Ecol Risk Assess.* 9:1789-1799.
- Hyne RV, Maher WA. (2003) Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol Environ Saf.* 54:366-374.
- IARC (2007) Combined Estrogen-Progestogen Contraceptives and Combined Estrogen-Progestogen Menopausal Therapy. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 91. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyone, France, 528.
- ICES, 2002. Report of the ICES/EIFAC working group on eels. ICES CM 2002\ACFM:03.
- ICES, 2010. Report of the Joint ICES/EIFAC working group on eels. ICES CM 2009\ACOM:15
- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner A P, Tyler C R, (2003). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol.* 65: 205-220.
- Kemper N. (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indicators* 8:1-13.
- Koehler A, Alpermann T, Lauritzen B, van Noorden CJF. (2004) Clonal xenobiotic resistance during pollution-induced toxic injury and hepatocellular carcinogenesis in liver of female flounder. *Acta Histochem.* 106:155-170.
- Kümmerer K. (2009a) Antibiotics in the aquatic environment: a review. I. *Chemosphere.* 75:417-434.
- Kümmerer K. (2009b) The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use-present knowledge and future challenges. *J Environ Manage.* 90:2354-2366.
- Le TX, Munekage Y. (2004) Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam. *Mar Pollut Bull.* 49:922-929.
- Lee RF, Singer SC, Page DS. (1981) Response of cytochrome p 450 systems in marine crab and polychaetes to organic pollutants. *Aquat Toxicol.* 1:355-365.

- Lowe DM, Pipe RK. (1994) Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat Toxicol.* 30:357-365.
- Lubet P. (1957) Cycle sexuel de *Mytilus edulis* L. et de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Année Biol.* 33:19-29.
- 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*. *Aquat Toxicol.* 94:177-185.
- Martínez M, Intralawan A, Vázquez G, Pérez-Maqueo O, Sutton P, Landgrave R. (2007) The coasts of our world: ecological, economic and social importance. *Ecol Econ.* 63:254-272.
- McEneff G, Barron L, Kelleher B, Paull B, Quinn B. (2014) A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves. *Sci Total Environ.* 476-477:317-326.
- Menningen JA, Stroud P, Zamora JM, Moon TW, Trudeau VL. (2011) Pharmaceuticals as neuroendocrine disruptors: Lessons learned from fish on prozac. *J Toxicol Environ Health, Part B* 14:387-412.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F. (2002) Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod.* 66:1881-1892.
- Moldovan Z. (2006) Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere.* 64:1808-1817.
- Moore MN, Allen JI, McVeigh A, Shaw J. (2006) Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals. *Autophagy.* 2:217-220.
- Moore MN, Kohler A, Lowe D, Viarengo A. (2008) Lysosomes and autophagy in aquatic animals. *Methods Enzymol.* 451:581-620.
- Moore MN, Viarengo A, Donkin P, Hawkins AJS. (2007) Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat Toxicol.* 84: 80-91.
- Moore MN. (1976) Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell Tissue Res.* 175:279-287.
- Moore MN. (1988) Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar Ecol Prog Ser.* 46:81-89.
- Moriarty C, Dekker W. (1997) Management of the European eel. *Fishery Bulletin* 15:1-110.
- National Research Council. (2007) Toxicity testing in the 21st century: A vision and a strategy. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- Navarro I, Leibush B, Moon TW, Plisetskaya EM, Banos N, Mendez E, Planas JV, Gutierrez J. (1999). Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: the evolution of their receptors. *Comp Biochem Physiol. B Biochem Mol Biol.* 122:137-153.
- Nickerson JG, Dugan SG, Drouin G, Moon TW. (2001) A putative beta2-adrenoceptor from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular characterization and pharmacology. *Eur J Biochem.* 268:6465-6472.
- Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJ, Arshad M, Mahmood S, Ali A, Khan AA. (2004) Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature.* 427:630-633.
- Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, Kobayashi T, Nagahama Y. (2000) Cloning, functional characterization, and expression of thyrotropin receptors in the thyroid of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem Biophys Res Commun.* 276:258-263.
- Organisation IM. (2003) International Convention for the Prevention of Pollution from Ships (MARPOL), Annex IV Prevention of Pollution by Sewage from Ships (entered into force 27 September 2003). [http://www.imo.org/en/About/Conventions/ListOfConventions/Pages/International-Convention-for-the-Prevention-of-Pollution-from-Ships-\(MARPOL\).aspx](http://www.imo.org/en/About/Conventions/ListOfConventions/Pages/International-Convention-for-the-Prevention-of-Pollution-from-Ships-(MARPOL).aspx)
- Peakall DB, Shugart LR. (1993) Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Rand-Weaver M, Margiotta-Casaluci L, Patel A, Panter GH, Owen SF, Sumpter JP. (2013) The read-across hypothesis and environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Environ Sci Technol.* 47:11384-11395.
- Rauckman EJ, Padilla GM. (1987). The isolated hepatocyte: use in toxicology and xenobiotic bio-transformations. Academic Press, New York, 292 pp.

- Rodriguez-Fuentes G, Gold-Bouchot G. (200) Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mar Environ Res.* 58:505–509.
- Sacher F, Lange FT, Brauch HJ, Blankenhorn I. (2001) Pharmaceuticals in groundwaters analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J Chromatogr A.* 938:199-210.
- Santos LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MC. (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater.* 175:45-95.
- Sapkota A, Sapkota AR, Kucharski M, Burke J, McKenzie S, Walker P, Lawrence R. (2008) Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environ Int.* 34:1215-1226.
- Schuetze A, Heberer T, Juergensen S. (2008) Occurrence of residues of the veterinary drug malachite green in eels caught downstream from municipal sewage treatment plants. *Chemosphere.* 72:1664-1670.
- Segner H. (1998) Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comp Biochem Physiol. Part A* 120:71-81.
- Solé M, Shaw JP, Frickers PE, Readman JW, Hutchinson TH. (2010) Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. *Anal Bioanal Chem.* 396:649-656.
- Speit G, Hartmann A. (1995) The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis.* 10:555-559.
- Stegeman JJ. (1978) Influence of Environmental Contamination on Cytochrome P-450 Mixed-Function Oxygenases in Fish: Implications for Recovery in the Wild Harbor Marsh. *J Fish Res Board Can.* 35:668-674.
- Sumanas S, Lin S. (2004) Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. *Drug Discovery Today: Targets* 3:89–96.
- Terman A, Brunk UT. (2004) Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:1400-1404.
- Tesch FW. (2003) The eel. (ed. J. E. Thorpe) pp. 1–416. Wiley-Blackwell, Oxford (UK).
- UNEP/RAMOG. (1999) Manual on the Biomarkers Recommended for the MED. POL. Biomonitoring Programme. UNEP, Athens.
- Valbonesi P, Brunelli F, Mattioli M, Rossi T, Fabbri E. (2011) Cholinesterase activities and sensitivity to pesticides in different tissues of silver European eel, *Anguilla Anguilla*. *Comp Biochem Physiol. Part C* 154:353-359.
- Valbonesi P, Sartor G, Fabbri E. (2003) Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Sci Total Environ.* 312:79–88.
- Verenitch SS, Lowe CJ, Mazumder A. (2006) Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1116:193-203.
- Viarengo A, Burlando B, Dondero F, Marrò A, Fabbri R. (1999) Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers.* 4:455–466.
- 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. *Comp Biochem Phys.* 146:281–300.
- Viarengo A, Nott JA. (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol. C Comp Pharmacol Toxicol.* 104:355-372.
- W.H.O (2012) Pharmaceuticals in Drinking-water. Technical report, ISBN 9789241502085 p.52. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/pharmaceuticals/en/.
- Walker CH, Thompson, HM. (1991) Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases. In: Mineau, P. (Ed.), Cholinesterase-inhibiting insecticides. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–17.
- Webb, M. (1987) Toxicological significance of metallothionein. *EXS* 52, 109–134.
- Weigel S, Kuhlmann J, Hühnerfuss H. (2002) Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Sci Total Environ.* 295:131-141.
- Winter MJ, Owen SF, Murray-Smith R, Panter GH, Hetheridge MJ, Kinter LB. (2010) Using data from drug discovery and development to aid the aquatic environmental risk assessment of human pharmaceuticals: Concepts, considerations, and challenges. *Integr Environ Assess Manag.* 6:38–51.

2. Regolazione adrenergica della glicogenolisi epatica nell'anguilla europea delle Valli di Comacchio



Glossario

ADR	adrenalina
AR	recettori adrenergici
CA	catecolamine
AMPc	adenosina monofosfato ciclico
CF	fattore di condizione
EC ₅₀	concentrazione effettiva
ED	diametro dell'occhio
EDh	diametro orizzontale dell'occhio
EDv	diametro verticale dell'occhio
EI	indice dell'occhio
FL	lunghezza pinna pettorale
L	lunghezza totale del corpo
PCA	acido perclorico
PKA	protein chinasi A
SE	silver eels (anguille argentine)
SEa	silver eels, autunno
SEi	silver eels, inverno
SI	indice di argentinizzazione
W	peso totale del corpo
YE	yellow eels (anguille gialle)
YEa	yellow eels, autunno
YEp	yellow eels, primavera

2.1 Introduzione

L'anguilla europea (*Anguilla anguilla*) è un pesce teleosteo catadromo che presenta un ciclo biologico molto complesso, riproducendosi nell'oceano e crescendo nelle acque continentali compiendo una migrazione di circa 6000 Km (Tesch, 2003). La posizione dell'areale di riproduzione è tutt'ora avvolta dal mistero ma, grazie al ritrovamento di piccole larve (Schmidt, 1923, 1925), è stata identificata nel Mar dei Sargassi. A seguito della deposizione delle uova da marzo a luglio, i leptocefali (stadio larvale) seguono la corrente del Golfo verso le acque continentali europee e nord africane. Durante questo lungo viaggio, in prossimità della terra ferma, le larve vanno incontro a metamorfosi: il corpo si accorcia e si trasformano in ceche. In questo stadio la ceca è in grado di muoversi attivamente e raggiunge le coste italiane ad un'età compresa tra i 24 e 30 mesi (Lecomte-Finiger, 1992). Raggiunte le acque costiere, gli estuari, le lagune, i fiumi ed i laghi, ed in presenza di condizioni ambientali ed alimentari adeguate, gli animali riacquistano progressivamente la pigmentazione, si assiste all'aumento di peso, di lunghezza ed all'accumulo delle riserve energetiche. È in questa fase trofica che le anguille subiscono una nuova metamorfosi verso lo stadio di "anguille gialle" (sessualmente immature), accrescendosi nelle acque continentali per diversi anni. Trascorso un periodo di tempo che può arrivare a 4-20 anni (Tesch, 2003), incomincia a completarsi lo sviluppo ed inizia la maturazione sessuale. L'animale va incontro a nuove modificazioni che sottolineano l'inizio della pubertà piuttosto che una semplice metamorfosi (Aroua et al., 2005; Durif et al., 2005). Questo processo definito di argentinizzazione, sottolinea la fine della fase di crescita (anguilla gialla) e l'inizio della fase migratoria (anguilla argentina; Rousseau et al., 2009). Le anguille argentine (sessualmente mature) migrano verso il mare per raggiungere l'areale di riproduzione dove si riproducono e muoiono (Tesch, 2003; Van den Thillart et al., 2009). Durante il passaggio allo stadio argentino, avvengono moltissimi cambiamenti fenotipici in cui il sistema endocrino gioca un ruolo fondamentale. La livrea diventa più scura sul dorso ed argentata sul ventre, gli occhi e le narici aumentano di diametro, le gonadi si sviluppano completamente, il fegato aumenta ed il tratto alimentare degenera sancendo la fine dell'alimentazione (Pankhurst e

Sorensen, 1984). Meccanismi di osmoregolazione, che permettono la vita nell'acqua salata, sono già attivi prima che l'animale lasci l'acqua dolce (Fontaine, 1975).

L'argentinizzazione è un processo graduale, influenzato da fattori biotici ed abiotici. Per questo è stata proposta una classificazione più dettagliata basata su una serie di parametri interni ed esterni (Durif et al., 2009): sviluppo delle gonadi, degenerazione del tratto digestivo, livelli gonadotropinici, diametro dell'occhio, lunghezza della pinna pettorale, fattore di condizione.

Sono state così definite 5 fasi di sviluppo per le femmine:

- FI e FII, fase di crescita in cui le anguille si nutrono e cominciano a differenziarsi sessualmente (anguille gialle).
- FIII, fase pre-migratoria caratterizzata da alti livelli di ormone della crescita (GH) e dallo sviluppo delle gonadi.
- FIV, contraddistinta dalla produzione di gonadotropina e dalla cessazione dell'alimentazione.
- FV, contrassegnata dalla degenerazione del tratto digestivo, da alti livelli di gonadotropina e dall'allungamento della pinna pettorale.

Nei maschi invece si è osservata una minor variabilità, e vari studi hanno suggerito che il processo di argentinizzazione e il differenziamento sessuale avvengono simultaneamente (Durif et al., 2009). Si sono evidenziate solamente due fasi di sviluppo:

- I, fase indifferenziata.
- MII, fase migratoria.

Poiché smettono di alimentarsi, le anguille argentine devono accumulare abbastanza riserve energetiche durante la fase di crescita per compiere la lunga migrazione riproduttiva. La riserva energetica primaria per le anguille gialle è rappresentata dal glicogeno, mentre i lipidi rappresentano la principale fonte per le anguille argentine. Le riserve di grasso costituiscono circa il 30% del peso corporeo, depositandosi nel fegato, sotto la pelle e nella cavità addominale, permettendo di accumulare energia sufficiente per la migrazione e lo sviluppo delle gonadi (Svedang and Wickstrom, 1997).

Il possibile coinvolgimento delle catecolamine (CA) adrenalina (ADR) e noradrenalina (NOR) nel processo di argentinizzazione non è stato ancora studiato. Tuttavia il loro ruolo nella mobilizzazione delle riserve energetiche (glicogeno e lipidi) le rende molecole chiave per capire i meccanismi fisiologici che intervengono nel processo di argentinizzazione. Si potrebbe quindi pensare che il metabolismo epatico sia regolato diversamente tra le anguille gialle e quelle argentine. Il controllo adrenergico del metabolismo glucidico epatico è stato precedentemente studiato nelle anguille europee (Fabbri et al., 1998a; Fabbri et al., 2001). Questi studi hanno mostrato che l'ADR stimola la glicogenolisi ed il rilascio di glucosio principalmente attraverso il legame con i recettori β -adrenergici (β -AR), stimolando l'attività dell'adenil ciclasi ed aumentando i livelli di AMP ciclico (AMPc), secondo messaggero nella cascata di trasduzione del segnale.

Il presente studio vuole indagare l'effetto dell'ADR sul metabolismo glucidico epatico di anguille in diversi stadi di argentinizzazione prelevate in periodi differenti nella laguna costiera delle Valli di Comacchio. Le anguille argentine sono state raramente studiate e le conoscenze riguardanti la regolazione adrenergica epatica sono quasi nulle. L'effetto dell'ADR è stato misurato attraverso la valutazione del glucosio rilasciato da epatociti isolati. I livelli di glicogeno sono stati misurati sia nel fegato che negli epatociti per permettere una correlazione con i livelli di glucosio. Sono state valutate le variazioni nei livelli di AMPc dopo esposizione all'ormone; questo secondo messaggero tende infatti ad aumentare dopo il legame tra le CA ed i β -AR. Infine, per la prima volta, sono stati quantificati (in termini di numero di copie geniche/ng RNA) i livelli di espressione dei geni codificanti per i recettori adrenergici β 2 ed α 1.

2.2 Materiali e Metodi

Animali e condizioni sperimentali

Esemplari di anguilla europea (*Anguilla anguilla*) sono stati catturati nella laguna costiera delle Valli di Comacchio (Mar Adriatico settentrionale, Italia). Le Valli di Comacchio sono una laguna costiera di circa 100 km² collegati al Mar Adriatico da due canali, e situate a circa 20 km a nord di Ravenna. Le Valli sono state storicamente sito di un allevamento intensivo dell'anguilla europea (Tesch, 2003) ma negli ultimi 30 anni lo stock ha sofferto di un rapido declino. Questo declino ha interessato tutta la popolazione (europea e mediterranea), ed ha abbassato lo stock ittico a circa l'1% dei suoi livelli storici (Dekker, 2003; ICES 2010). La pesca nelle Valli di Comacchio ha un grande valore dal punto di vista commerciale, soprattutto durante l'inverno quando le anguille argentine vengono pescate attraverso il lavoriero, una tradizionale trappola a forma di punta di freccia (Tesch, 2003) che intrappola le anguille mentre escono dalla laguna verso il mare aperto. La cattura delle anguille è avvenuta attraverso due metodi di pesca differenti. Gli animali catturati in Nov. 2013 (temperatura media dell'acqua 14°C) e in Dic. 2013-Gen. 2014 (temperatura media dell'acqua 12°C) sono stati collezionati attraverso il lavoriero. Le anguille campionate in Ott. 2013 (temperatura media dell'acqua 14°C) e in Apr. 2014 (temperatura media dell'acqua 15°C) sono state catturate attraverso reti poiché le anguille nella fase trofica non nuotano in direzione del mare e quindi è impossibile catturarle con il lavoriero. Per ogni periodo di campionamento sono stati collezionati 8 animali. Per ogni esperimento le anguille sono state sacrificate attraverso una rapida decapitazione. Tutte le procedure sperimentali sono state approvate dal comitato etico e scientifico dell'Università di Bologna e si sono svolte in accordo con la legislazione europea riguardante la protezione degli animali per fini scientifici (Council Directive 2010/63/EU).

Parametri morfometrici

Gli animali sono stati rapidamente misurati per i parametri morfometrici: lunghezza del corpo, L (± 5 mm); peso del corpo, W (± 10 g); diametri dell'occhio, ED (h , orizzontale e v , verticale, \pm

0,01 mm); lunghezza della pinna pettorale, FL ($\pm 0,01$ mm) permettendo il calcolo dei seguenti indici:

- a) Fattore di condizione, CF = $105 W/L^3$ (Fulton, 1994);
- b) Indice dell'occhio, EI = $100 [(EDh + EDv) / 4]2\pi/L$, (Pankhurst, 1982);
- c) Indice di argentinizzazione, SI, calcolato in accordo con Durif et al., (2005; 2009).

SI per le femmine (SF) ed i maschi (SM) si basa su parametri esterni del corpo, L, W, FL e la media di ED, (mED; basato sui diametri verticale ed orizzontale dell'occhio) e lo stadio di maturazione è assegnato come il più alto delle seguenti somme (vedere EELREP, 2005):

- SI = $- 61,276 + 0,242 L - 0,108 W + 5,546 mED + 0,614 FL$
- SFII = $- 87,995 + 0,286 L - 0,125 W + 6,627 mED + 0,838 FL$
- SFIII = $- 109,014 + 0,280 L - 0,127 W + 9,108 mED + 1,182 FL$
- SFIV = $- 113,556 + 0,218 L - 0,103 W + 12,187 mED + 1,230 FL$
- SFV = $- 128,204 + 0,242 L - 0,136 W + 12,504 mED + 1,821 FL$
- SMII = $- 84,672 + 0,176 L - 0,116 W + 12,218 mED + 1,295 FL$

Per esempio, se il valore massimo deriva da SFIV, l'anguilla è classificata come FIV, o femmina al quarto stadio di argentinizzazione.

Isolamento epatociti ed esposizione

Dopo eutanasia, l'addome dell'animale è stato aperto ed un pezzo di fegato è stato prelevato ed immediatamente congelato in azoto liquido per misurare il contenuto di glicogeno. Gli epatociti sono stati isolati attraverso digestione enzimatica con collagenasi (Sigma-Aldrich) seguendo il metodo descritto in Mommsen e Moon (1990). Brevemente, il fegato è stato perfuso per 10 min. alla velocità di 2 mL/min. con soluzione fisiologica di Hanks' contenente (in mM): 0,8 $MgSO_4$, 0,33 NaH_2PO_4 , 0,44 KH_2PO_4 , 136,9 NaCl, 5,4 KCl, 5,0 HEPES, 5,0 HEPES-Na e 5,0 $NaHCO_3$; pH 7,63 a temperatura ambiente. La perfusione si è protratta per altri 25 min. con la stessa soluzione arricchita di collagenasi (10 mg/50 mL). Il tessuto epatico è stato poi lavato con la soluzione di Hanks', tagliuzzato e filtrato attraverso filtri di nylon (mesh 73 e 153 μm). La sospensione cellulare è stata lavata due volte con soluzione di Hanks' e due volte con la

medesima soluzione arricchita con CaCl_2 1,5 mM; il mezzo è stato allontanato ogni volta mediante centrifugazione a $80 \times g$ a 4°C , fino alla risospensione finale. Nessuna differenza è stata riscontrata tra gli epatociti delle varie anguille, con l'eccezione di un evidente strato lipidico sempre presente nel sovranatante degli epatociti isolati dalle anguille argentine. Gli epatociti sono stati poi pesati e la concentrazione cellulare è stata aggiustata a $\sim 5 \times 10^6$ cell/mL. Gli esperimenti sono stati condotti in incubazione statica in provette di 1,5 mL a 22°C (Fabbri et al., 1998a) in assenza o presenza del ligando adrenergico adrenalina (ADR). Per le curve del tempo le cellule sono state incubate in presenza di ADR $1 \mu\text{M}$ per 60 min. La reazione è stata bloccata al tempo specifico con acido perclorico, PCA, (5% concentrazione finale, w/v). Per le curve dose-risposta le cellule sono state incubate per 30 min. in presenza di concentrazioni differenti di ADR e la reazione è stata bloccata usando PCA (5% concentrazione finale, w/v).

Produzione di glucosio

Il glucosio rilasciato dagli epatociti è stato misurato attraverso il metodo della ossidasi-perossidasi (Busby et al., 2002). Brevemente, $10 \mu\text{L}$ di campione sono stati incubati con $200 \mu\text{L}$ di mezzo di incubazione (in mM: 60 trizma-base, 40 trizma-HCl, 1 MgSO_4 , 2 NAD^+ , 1 ATP and 0,1 unità/mL di G6PD) in una piastra da 96 pozzetti agitata per 5 min. a temperatura ambiente, seguiti da $10 \mu\text{L}$ di esochinasi (0,3 unità/mL). La piastra è stata incubata per 30 min. a temperatura ambiente e l'assorbanza è stata misurata a 340 nm. I valori calcolati al tempo zero sono stati sottratti da quelli ai vari tempi per ottenere il glucosio netto rilasciato nel mezzo. I valori sono espressi come $\mu\text{mol/g cell}$.

Contenuto di glicogeno

Per misurare il contenuto di glicogeno presente nel fegato e negli epatociti è stato utilizzato il metodo di Wright et al., (1989) basato sulla scissione del glicogeno da parte dell'amiloglucosidasi. Brevemente, dopo omogeneizzazione dei campioni in acido perclorico al 6%, questi sono stati neutralizzati con K_2CO_3 3M ed il sovranatante usato nel saggio. A $100 \mu\text{L}$ di campione sono stati aggiunti $50 \mu\text{L}$ di NaHCO_3 1M e 1 mL di soluzione contenente amiloglucosidasi (120 mM sodio-acetato, 12 U/mL di amiloglucosidasi, 80 mM di acido acetico glaciale). Dopo 2 ore di incubazione a 37°C , la reazione è stata stoppata usando $25 \mu\text{L}$ di PCA al

70%. La concentrazione di glicogeno è stata calcolata attraverso una curva standard basata sul glucosio generato usando il saggio del glucosio come descritto in precedenza.

Contenuto di AMP ciclico (AMPc)

Per la determinazione del AMPc, gli epatociti sono stati lisati in etanolo al 65% per 1 ora a 4°C. I lisati sono stati centrifugati e il sovrantante è stato essiccato sotto un flusso di azoto. I campioni sono stati analizzati utilizzando il kit DetectX™ direct cyclic AMP (Arbor Assay, Ann Arbor, MI, USA). I livelli di AMPc sono espressi come nmol/g cell.

Espressione genica recettori adrenergici (AR)

L'RNA totale è stato estratto dagli epatociti isolati usando il ChargeSwitch total RNA cell kit (Life Technology, Milano, Italia), seguito dal trattamento con DNAsi I in accordo con le procedure del protocollo (Life Technology, Milano, Italia). La concentrazione e la qualità dell'RNA è stata verificata utilizzando il Qubit RNA assay (Life Technologies, Milano, Italia) ed elettroforesi utilizzando un gel d'agarosio all'1,2% in condizioni di denaturazione. Il cDNA è stato sintetizzato da 1 µg di RNA totale utilizzando iScript supermix (Biorad Laboratories, Milano, Italia). Il numero di copie geniche codificanti per α 1- and β 2-AR mRNAs sono state quantificate tramite real-time RT-PCR (QPCR). I primers sono stati disegnati usando il software Primer Express (Life Technologies, Milano, Italia) sulla base delle sequenze per α 1- and β 2-AR mRNA di anguilla europea recuperati da GenBank (Tab. 1). La curva standard è stata preparata tramite diluizioni in serie dei DNA plasmidici linearizzati contenente i trascritti specifici per ottenere una curva standard di valori soglia (Ct) vs il logaritmo della quantità di DNA. I valori di R2 per tutte le curve standard erano > 0,98. La quantità assoluta di mRNA è stata calcolata dalle curve standard e rappresentata come numero di copie/ng RNA (media \pm ES). Le reazioni sono avvenute in triplicato in un volume finale di 10 µL contenente 5 µL di iTaq™ Universal SYBR Green Supermix con ROX (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia), 2 µL di cDNA diluito o DNA plasmidico, e 0,2 µM di primers specifici (Tab. 1). Un controllo senza DNA (no template) ed un controllo senza trascrittasi inversa (no RT) sono stati inclusi nell'analisi per assicurare la specificità dell'amplificazione. L'amplificazione è stata rilevata tramite un protocollo di PCR real-time del tipo StepOne (Life Technologies, Milano, Italia) utilizzando un protocollo termico del tipo "fast

mode". Per ogni mRNA target sono state analizzate curve di melting, immagini di gel e sequenze, al fine di verificare la specificità dell'amplificato e l'assenza di artefatti. L'efficienza di amplificazione di ogni coppia di primer è stata calcolata usando una serie di diluizioni di cDNAs del DNA plasmidico linearizzato per gli standard di QPCR (Tab. 2.2.1).

Tabella 2.2.1: Lista di primer usati nella PCR real-time quantitativa

Target mRNA	Sequenza primer 5'-3'	Amplicone (bp)	Efficienza di amplificazione (%) (media ± DS)	Numero di accesso in GenBank
Eeel_ADRA1d	AGCATAACCGAAGAACCAGG	151	98,36 ± 5,68	KC608866
	TTCTTTCCCGTTTACTCCC			
Eeel_ADRB2	TTCGGCGCGTGCCACATCAT	137	101,2 ± 6,87	KC503765
	GCGAGGTAGCGGTCCAGTGC			

Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software SigmaStat 12.0. Differenze statisticamente significative tra i dati (rilascio di glucosio, contenuto di glicogeno, livelli di AMPc, variazione nei livelli di AR) sono state determinate utilizzando ANOVA ad 1 via seguita dal test di Bonferroni come test *post hoc*. I dati relativi all'effetto dose-risposta dell'ormone, sono stati interpolati utilizzando l'equazione sigmoide a cinque parametri dalla libreria delle funzioni. I valori di EC₅₀ sono stati ottenuti interpolando l'equazione usando i parametri estrapolati. La correlazione a coppie tra i livelli di glicogeno e glucosio è stata valutata usando la correlazione di Spearman. In tutti i casi, le differenze statisticamente significative sono state accettate quando $p < 0,05$.

2.3 Risultati

Parametri morfometrici

Le anguille catturate con il lavoriero in Nov '13 e Dic '13-Gen '14 sono state classificate rispettivamente allo stadio FIII (femmine argentine pre-migranti) ed allo stadio FIV (femmine argentine in fase di migrazione). Le anguille catturate attraverso le reti in Ott '13 erano prevalentemente allo stadio FII con un paio di individui allo stadio FIII; mentre le anguille catturate in Apr '14 sono state classificate allo stadio FII (femmine gialle in fase trofica). Per una più semplice distinzione degli stadi, questi gruppi verranno classificati come YEa (yellow eels autunnali, Ott '13); SEa (silver eels autunnali, Nov '13); SEi (silver eels invernali, Dic '13 – Gen '14) e YEp (yellow eels primaverili, Apr '14). Entrambi i gruppi di YEa e YEp possedevano un Indice dell'occhio (EI) < 6,5, mentre i gruppi di SEa e SEi presentavano un EI > 6,5 che è caratteristico dell'animale sessualmente maturo e pronto per la migrazione (Durif et al., 2005; 2009). Come previsto, è stata riscontrata una differenza significativa in termini di peso e lunghezza tra i gruppi, soprattutto per le SEi risultate molto più grandi degli altri tre gruppi (Tab. 2.3.1).

Tabella 2.3.1: parametri morfometrici di anguille gialle ed argentine campionate in stagioni differenti. I dati sono espressi come la media \pm ES (N=8)

	L (mm)	W (g)	CF	FL (mm)	EDh (mm)	EDv (mm)	EI	SI
YEa	617,5 \pm 10,6 (a)	462,0 \pm 27,7 (a,b)	0,2 \pm 0,01	26,5 \pm 0,7 (a)	6,7 \pm 0,2	6,1 \pm 0,2	5,1 \pm 0,2 (a)	FII/III (a)
SEa	647,5 \pm 12,2 (a)	593,9 \pm 26,8 (b)	0,2 \pm 0,01	29,1 \pm 0,6 (a)	8,5 \pm 0,2	8,1 \pm 0,1	8,4 \pm 0,2 (b)	FIII (b)
SEi	854,2 \pm 17,4 (b)	1486,3 \pm 82,2 (c)	0,2 \pm 0,01	39,8 \pm 1,5 (b)	9,8 \pm 0,3	9,27 \pm 0,4	9,9 \pm 0,5 (c)	FIV (c)
YEp	555,0 \pm 9,9 (c)	320,0 \pm 15,0 (a)	0,2 \pm 0,01	21,3 \pm 0,6 (c)	6,2 \pm 0,2	5,5 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2 (a)	FII (a)

CF: fattore di condizione

EDh: diametro orizzontale dell'occhio

EDv: diametro verticale dell'occhio

FL: lunghezza pinna pettorale

L: lunghezza del corpo

W: peso del corpo

SI: indice di argentinizzazione

YEp: Yellow eels primaverili (Apr '14)

EI: indice dell'occhio

SEi: Silver eels invernali (Dic '13-Gen '14)

YEa: Yellow eels autunnali (Ott '13)

SEa: Silver eels autunnali (Nov '13)

Produzione di glucosio

L'ADR induce rilascio di glucosio dagli epatociti con effetto tempo-dipendente (Fig. 2.3.1). Il glucosio rilasciato dalle YEp (FII) cresce linearmente durante i primi 30 min. raggiungendo una fase stazionaria che viene mantenuta fino a 60 min. (Fig. 2.3.1D). Un andamento diverso si è osservato nelle YEa (FII/III) e nelle SEa (FIII) e SEi (FIV) con un rilascio continuo e lineare nel tempo. (Fig. 2.3.1A, B, C). Il rilascio basale a 30 min. in assenza di ADR è più alto nelle YEp ($22,5 \pm 4,6 \mu\text{mol/g cell}$) rispetto agli altri gruppi i cui valori basali sono piuttosto simili ($7,9 \pm 2,3 \mu\text{mol/g cell}$; $2,7 \pm 1,0 \mu\text{mol/g cell}$ e $7,6 \pm 4,1 \mu\text{mol/g cell}$ per le YEa, SEa e SEi, rispettivamente). Valutando il glucosio totale rilasciato dopo stimolazione con ADR nei 60 min. di incubazione, i valori più elevati si sono riscontrati nelle YEp ($419,0 \pm 3,8 \mu\text{mol/g cell}$), poi nelle SEi ($186,6 \pm 5,8 \mu\text{mol/g cell}$), nelle YEa ($122,8 \pm 1,3 \mu\text{mol/g cell}$) ed infine nelle SEa ($46,4 \pm 1,5 \mu\text{mol/g cell}$) che hanno rilasciato il minor quantitativo di glucosio rispetto agli altri gruppi.

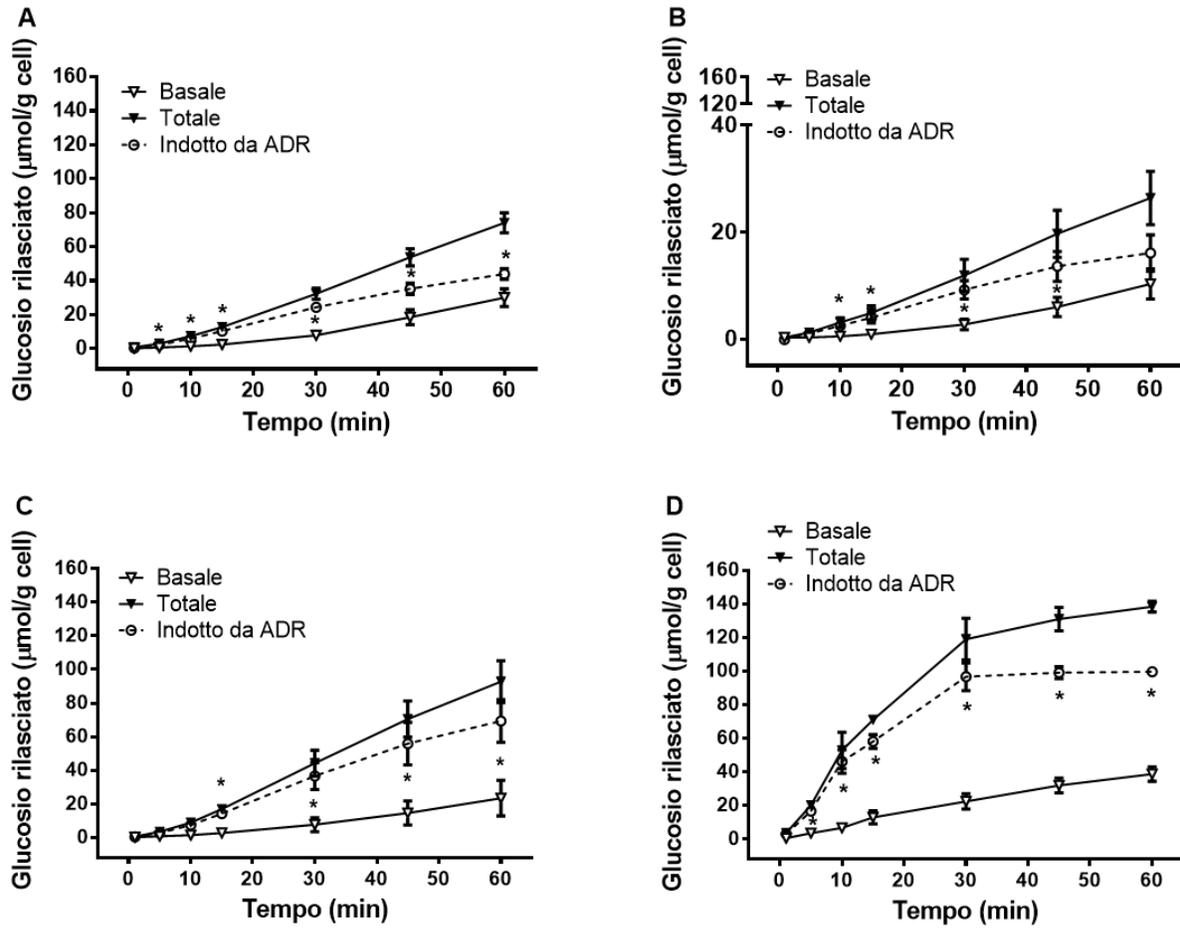


Fig. 2.3.1: Effetto tempo-dipendente di ADR $1 \mu\text{M}$ sul rilascio di glucosio da epatociti isolati di anguilla posti in incubazione statica. (A): YEa, anguille gialle autunnali; (B): SEa, anguille argentine autunnali; (C): SEi, anguille argentine invernali; (D): YEp, anguille gialle primaverili. I dati sono espressi come la media \pm ES. Asterischi indicano differenze significative tra il rilascio stimolato con ADR e quello basale allo stesso tempo di esposizione. * $p < 0,05$.

Il rilascio dose-dipendente indotto da ADR è mostrato in Fig. 2.3.2. Dopo 30 min. di trattamento si osserva un significativo rilascio di glucosio alla concentrazione di 10 nM per le YEp (FII), mentre il rilascio massimo è raggiunto alla concentrazione di 1 μ M (Fig. 2.3.2D). Un andamento simile si osserva nelle YEa (FII/III) (Fig. 2.3.2A) e nelle SEa (FIII) (Fig. 2.3.2B). Un trend leggermente diverso si è riscontrato nelle SEi (FIV), dove la risposta è risultata essere più variabile (Fig. 2.3.2C).

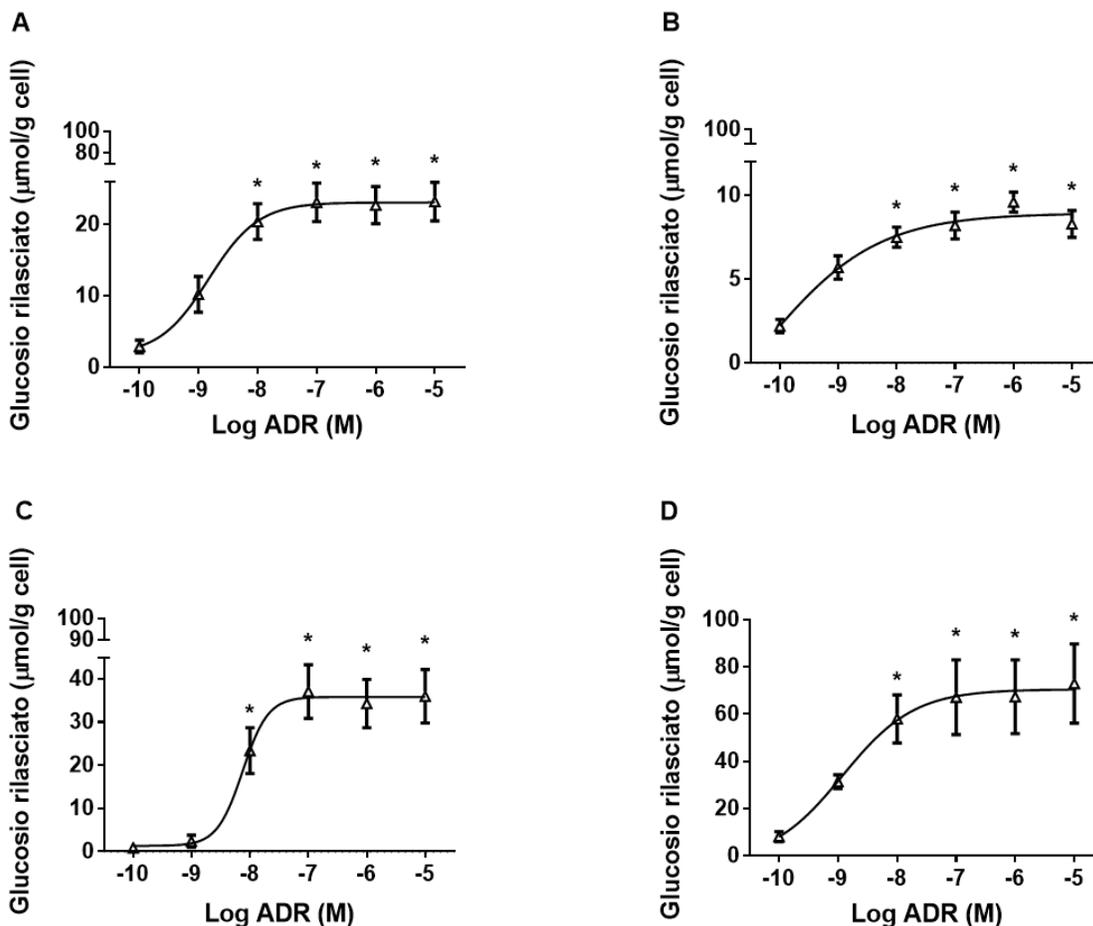


Fig. 2.3.2: Effetto dose-dipendente di ADR sul rilascio di glucosio da epatociti isolati dopo 30 min. di incubazione statica. (A): YEa, anguille gialle autunnali; (B): SEa, anguille argentine autunnali; (C): SEi, anguille argentine invernali; (D): YEp, anguille gialle primaverili. Valori basali a 30 min.: $21,2 \pm 3,9 \mu\text{mol/g cell}$ per YEa; $3,0 \pm 0,8 \mu\text{mol/g cell}$ per SEa; $7,7 \pm 2,8 \mu\text{mol/g cell}$ per SEi and $39,2 \pm 8,0 \mu\text{mol/g cell}$ per YEp. Il rilascio basale è stato sottratto per ottenere il rilascio netto illustrato nel grafico. I valori sono espressi come la media \pm ES. Asterischi indicano differenze significative rispetto al livello basale. * $p < 0,05$.

Valori medi di EC₅₀ sono riportati in Tabella 2.3.2. Valori di pD2 (- log EC₅₀) sono stati calcolati per favorire un confronto con studi precedenti (Van Heeswijk et al., 2006). Nessuna differenza significativa negli EC₅₀ è stata osservata tra YEa, SEa e YEp (circa 2nM). Contrariamente, l'EC₅₀ per le SEi è risultato essere significativamente diverso rispetto agli altri gruppi con valori da 4 ad 8 volte più alti (9 nM).

Tabella 2.3.2: Valori di EC₅₀ e pD2 di ADR sul rilascio di glucosio da epatociti isolati di anguilla gialla ed argentina campionate in stagioni differenti.

	EC ₅₀	pD2
	nM	-Log EC ₅₀
YEa (FII/III)	2,05 ± 0,97 ^a	8,69
SEa (FIII)	1,31 ± 0,41 ^a	8,88
SEi (FIV)	9,00 ± 0,27 ^b	8,05
YEp (FII)	1,79 ± 0,61 ^a	8,75

EC₅₀ rappresenta la concentrazione in cui l'ADR induce il 50% del massimo glucosio rilasciato. I dati sono espressi come la media ± ES. pD2 è calcolato come il log negativo di EC₅₀. Lettere diverse indicano differenze significative (p<0,05).

Contenuto di glicogeno

Il contenuto di glicogeno misurato negli epatociti è riportato in Fig. 2.3.3A. I valori non sono risultati statisticamente significativi tra i gruppi di YEa (FII) e YEa (FII/III) o tra i gruppi di SEa (FIII) e SEi (FIV); mentre entrambi i gruppi di anguille gialle (YE) hanno mostrato livelli di glicogeno significativamente più alti rispetto i gruppi delle anguille argentine (SE). Queste differenze nel contenuto di glicogeno negli epatociti nei diversi stadi di argentinizzazione si ritrovano anche nei livelli di glicogeno misurati nel fegato (Fig. 2.3.3B).

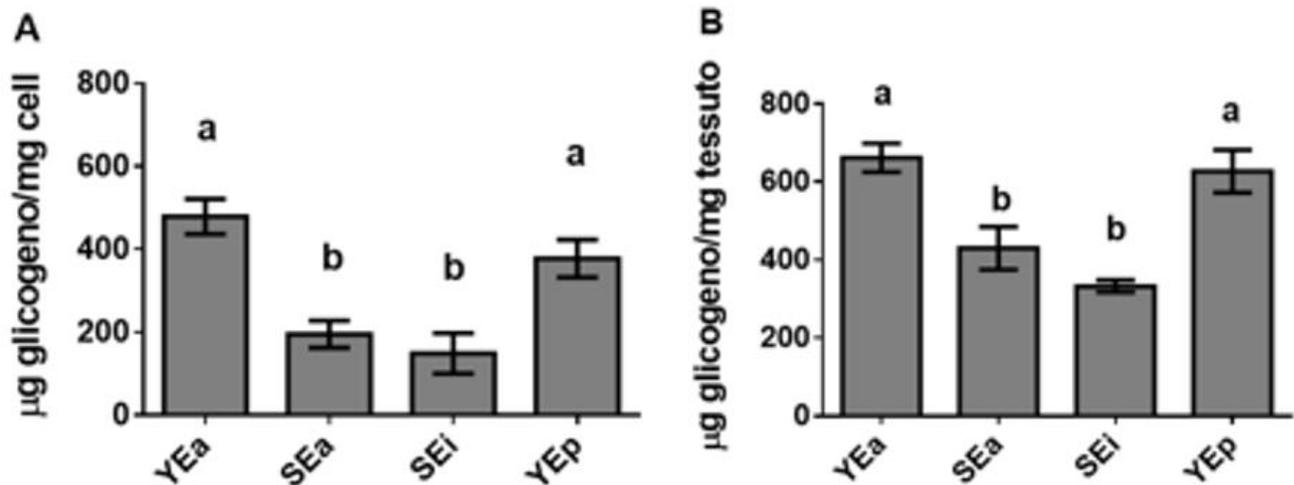


Fig. 2.3.3: Contenuto di glicogeno in epatociti isolati (A) e nel fegato (B) di anguille gialle ed argentine collezionate in periodi differenti. I valori sono espressi come la media \pm ES. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

I confronti diretti tra il contenuto di glicogeno ed il glucosio rilasciato dalle cellule dopo stimolazione ormonale è illustrato in Fig. 2.3.4 dove sono riportati i dati per i singoli individui. Esiste una significativa correlazione tra il contenuto di glicogeno ed il glucosio rilasciato dagli epatociti per le YEp (FII) e le SEi (FIV). Nessuna correlazione è stata osservata per le YEa (FII/III) e le SEa (FIII).

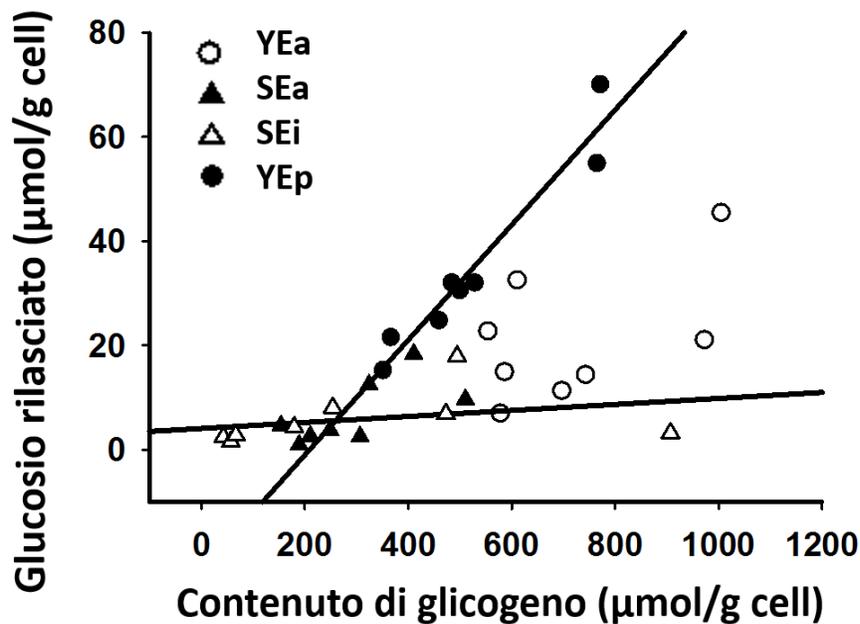


Fig. 2.3.4: rappresentazione grafica della relazione tra il contenuto di glicogeno ed il glucosio basale rilasciato (a 30 min.) in epatociti di anguilla gialla ed argentina collezionate in stagioni differenti. I dati per i singoli individui sono espressi come $\mu\text{mol/g cell}$. Coefficienti di correlazione di Spearman: YEa, $r = 0,31$ ($p > 0,05$; $N=8$); SEa, $r = 0,62$ ($p > 0,05$; $N=8$); SEi, $r = 0,71$ ($p < 0,05$; $N=8$) e YEp, $r = 0,97$ ($p < 0,01$; $N=8$).

Contenuto di AMP ciclico (AMPc)

Il contenuto di AMPc, valutato negli epatociti in condizioni basali e sotto stimolazione ormonale con ADR è mostrato in Fig. 2.3.5 e 2.3.6. I livelli basali sono abbastanza simili con $0,65 \pm 0,13$ e $0,98 \pm 0,11$ nmol/g cell per le YEp (FII) e le YEa (FII/III); e più bassi per le SEa (FIII) e le SEi (FIV) con $0,34 \pm 0,02$ e $0,33 \pm 0,05$ nmol/g cell rispettivamente (Fig. 2.3.5). L'aumento tempo-dipendente di AMPc (Fig. 5) in risposta ad ADR $1 \mu\text{M}$ è abbastanza simile tra i gruppi di anguille

gialle (YE) e quelli delle argentine (SE), ma differente tra gli stadi giallo ed argentino. In entrambi i gruppi di anguille gialle, il contenuto di AMPc aumenta rapidamente e raggiunge il livello massimo dopo 15 min., diminuendo subito dopo. I livelli di AMPc continuano ad aumentare linearmente negli epatociti dei gruppi di anguille argentine fino a 30 min., rimanendo costanti.

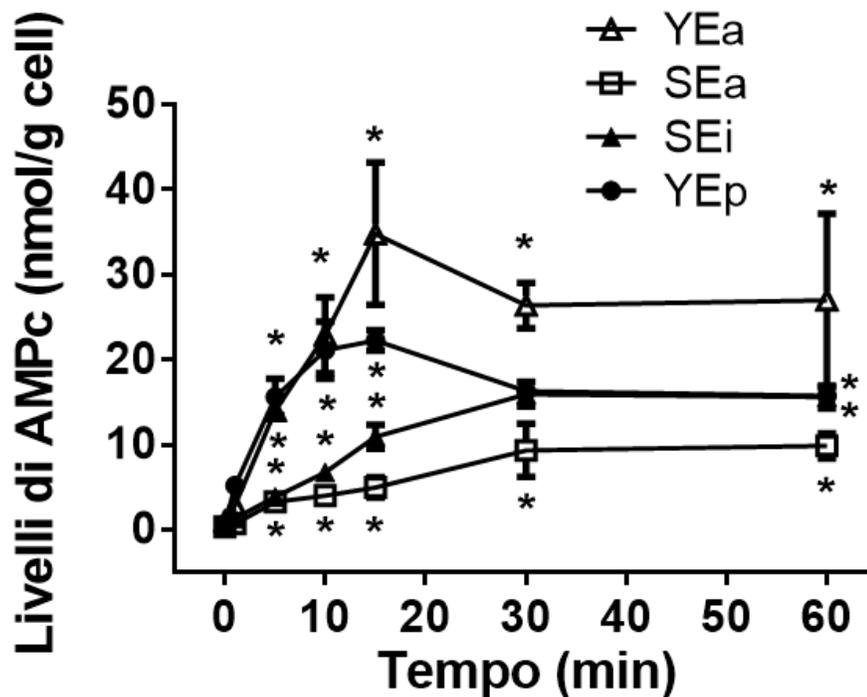


Fig. 2.3.5: Cambiamento tempo-dipendente nei livelli intracellulari di AMPc dopo stimolazione con ADR 1 μ M. I valori sono espressi come la media \pm ES. Asterischi indicano differenze significative rispetto al tempo zero. * $p < 0,05$.

I cambiamenti dose-dipendenti nei livelli intracellulari di AMPc dopo stimolazione con ADR sono mostrati in Fig. 2.3.6. Si osservano aumenti significativi rispetto ai valori basali e i livelli massimi sono abbastanza simili tra i diversi gruppi di anguille eccezion fatta per le YEa (FII/III) dove i massimi valori sono leggermente più alti. La produzione massima di AMPc in entrambi i gruppi

di anguille gialle è raggiunta dopo esposizione a ADR 1 μ M invece che a 10 μ M per gli altri gruppi.

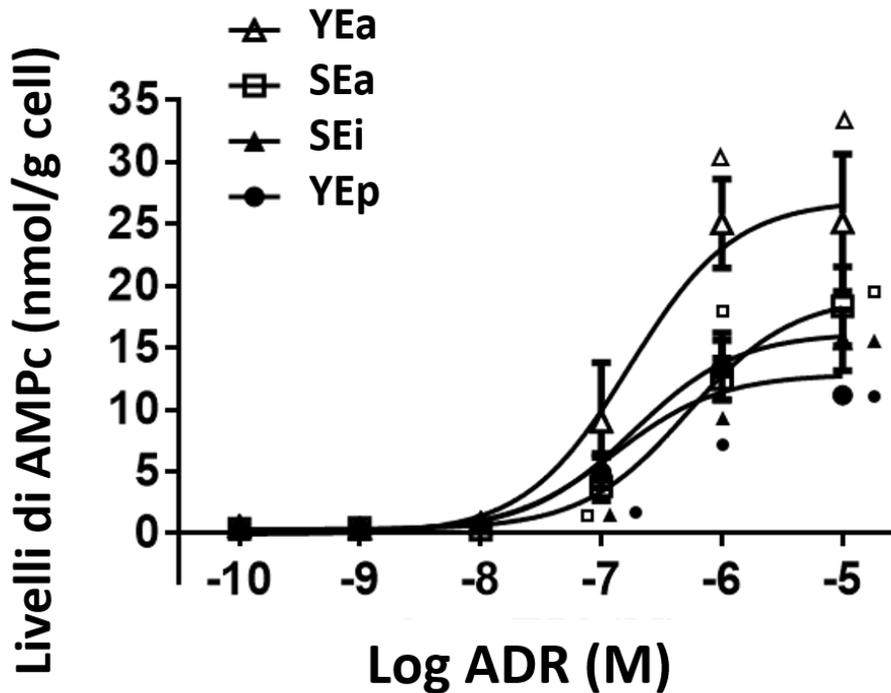


Fig. 2.3.6: Cambiamento dose-dipendente nei livelli intracellulari di AMPc dopo stimolazione con ADR per 30 min. I valori sono espressi come la media \pm ES. Simboli indicano differenze significative rispetto ai livelli basali ($p < 0,05$).

Espressione genica recettori adrenergici (AR)

I livelli di α 1- e β 2-AR mRNA negli epatociti di anguilla gialla ed argentina sono stati valutati tramite QPCR (Fig. 2.3.7). Entrambe le classi di recettori sono presenti in tutti e quattro i gruppi analizzati con differenze significative tra i due tipi di AR all'interno dello stesso gruppo. α 1- e β 2-AR mRNA tendono ad aumentare in relazione allo stadio di maturazione da YEp (FII), a YEa (FII/III), a SEa (FIII) fino a SEi (FIV). In particolare i β 2-AR triplicano nelle SEi rispetto alle YEp, mentre gli α 1-AR nelle SEi aumentano di 9 volte rispetto le YEp.

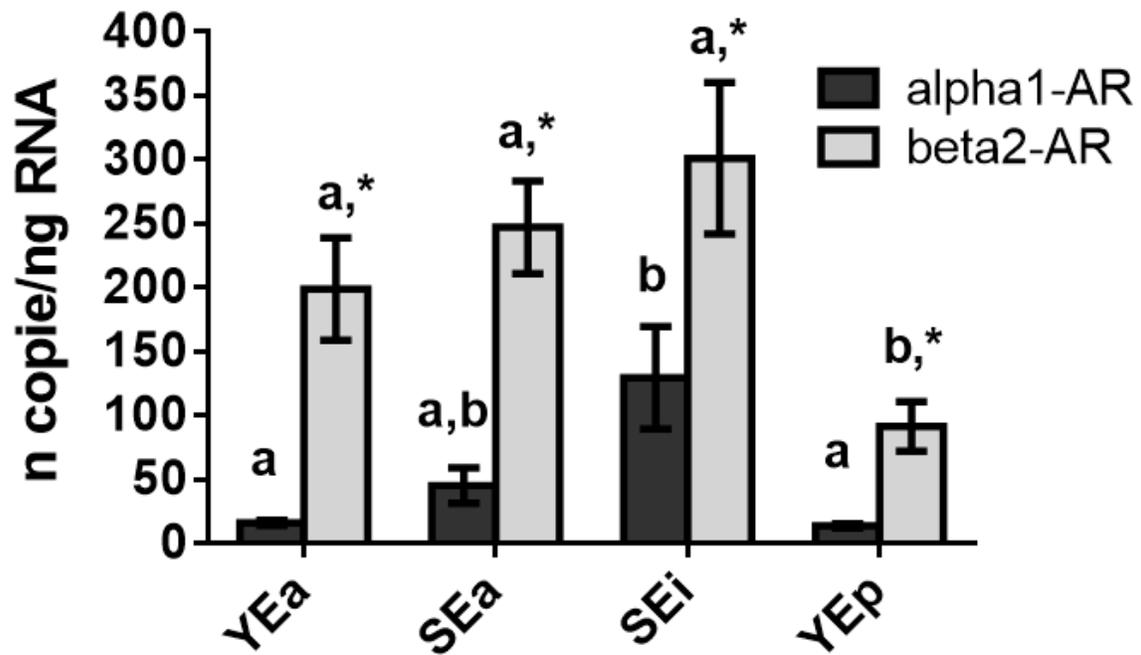


Fig. 2.3.7: Livelli di mRNA dei recettori adrenergici $\alpha 1$ e $\beta 2$ in epatociti isolati di anguilla gialla e argentina collezionate in stagioni differenti. I dati sono espressi come numero di copie geniche/ng di RNA (media \pm ES). Lettere indicano differenze significative nei livelli di $\alpha 1$ -/ $\beta 2$ -AR tra i gruppi. Asterischi indicano differenze significative tra $\alpha 1$ - e $\beta 2$ -AR all'interno dello stesso gruppo ($p < 0,05$).

2.4 Discussione e Conclusioni

I pesci rispondono alle modificazioni del proprio ambiente interno ed esterno alterando la concentrazione ematica di catecolamine (CA). Questa è considerata una risposta compensatoria per ottimizzare le funzioni cardiovascolari e respiratorie e mobilitare le risorse energetiche per far fronte all'aumentata richiesta metabolica. Le CA sono ormoni che svolgono un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo in tutti i vertebrati. In particolare nei pesci è stato dimostrato che il controllo adrenergico del metabolismo glucidico epatico costituisce una componente fondamentale nella risposta allo stress (Fabbri et al., 1998b; Massarsky et al., 2011; Mommsen et al., 1988) che può essere causata da numerosi agenti stressori naturali (competizione per il cibo ed il territorio) od antropici (inquinamento e sovrappesca). Numerosi studi condotti su epatociti di pesce hanno dimostrato la presenza di recettori adrenergici (AR) α - e β - sulla membrana cellulare e che il meccanismo di trasduzione del segnale che collega i AR alla mobilitazione di glucosio nel sangue è simile tra pesci e mammiferi (Fabbri and Moon, 1994a; Fabbri et al., 1998a, Fabbri et al., 1998b; Fabbri et al., 2001; Massarsky et al., 2011).

In questo studio è stato valutato il ruolo dell'adrenalina (ADR) nel controllo epatico del metabolismo glucidico dell'anguilla europea *A. anguilla* in diversi stadi di sviluppo, utilizzando gli epatociti isolati come modello sperimentale. Si è voluto inoltre esplorare un nuovo aspetto finora mai trattato riguardante l'espressione dei geni codificanti per i recettori adrenergici di tipo $\alpha 1$ e $\beta 2$ e la loro quantificazione assoluta nel fegato di *A. anguilla*. Infine, si sono fornite le prime evidenze concernenti il controllo adrenergico nel fegato delle anguille argentine. L'interesse è dovuto principalmente al fatto che il controllo adrenergico delle funzioni epatiche non è del tutto chiarito nei teleostei e soprattutto in pesci che hanno un ciclo biologico così complesso come l'anguilla. Questi animali offrono infatti la possibilità di studiare la funzione epatica in stadi del ciclo vitale molto diversi dal punto di vista energetico: le anguille gialle (fase trofica) e le anguille argentine (fase migratoria). Le prime sono animali in fase di accrescimento mentre le seconde, preparandosi alla lunga migrazione riproduttiva, subiscono profonde modificazioni (Rousseau et al., 2009). E' lecito pensare quindi, che il controllo adrenergico del metabolismo glucidico, così come quello lipidico, siano profondamente diversi tra i diversi stadi

di sviluppo. Le anguille argentine vengono raramente studiate soprattutto a causa della difficoltà nel catturarle all'inizio della migrazione. Per questo motivo si hanno delle lacune in merito al meccanismo endocrino che sottolinea il processo di argentinizzazione.

Dai parametri morfometrici è stato possibile classificare gli animali per sesso e stadio di maturazione. Sebbene gli animali non siano stati selezionati in base al sesso, tutte le 32 anguille utilizzate nello studio erano femmine. Le Valli di Comacchio sono caratterizzate infatti da un'elevata percentuale di anguille femmine facilmente distinguibili poiché i maschi non superano generalmente i 45 cm di lunghezza (Carrieri et al., 1992; Durif et al., 2009). Le anguille catturate con le reti (YEa e YEp) erano anguille gialle in accordo col colore giallo dell'addome e possedevano un Indice di Argentinizzazione (SI) di FII (Durif et al., 2009; Van Ginneken et al., 2007). Le anguille catturate nel lavoriero erano anguille argentine in accordo con il colore argentato dell'addome e possedevano un SI rispettivamente di FIII (SEa) ed FIV (SEi). Questi due ultimi gruppi presentavano gonadi sviluppate in accordo con l'indice dell'occhio (EI) > 6,5, valore che identifica l'anguilla sessualmente matura (Pankurst, 1982). Mentre i gruppi di gialle autunnali (YEa) e argentine autunnali (SEa) erano abbastanza simili in peso e lunghezza; le gialle primaverili (YEp) e le argentine invernali (SEi) differivano notevolmente in peso e lunghezza, portando ad ipotizzare delle differenze in termini energetici od un trend correlato alle fasi di sviluppo.

L'ADR è in grado di indurre il rilascio di glucosio dagli epatociti in maniera tempo- e dose-dipendente, come precedentemente dimostrato in vari studi condotti sull'anguilla europea (Fabbri et al., 2003), sul pesce gatto e sulla trota iridea (Brighenti et al., 1991; Ings et al., 2012; Van Heeswijk et al., 2006). Questi effetti sono determinati dall'interazione dell'ADR con i recettori di tipo α e/o β presenti sulla membrana cellulare (Fabbri et al., 1995), il cui meccanismo di trasduzione del segnale AMPc dipendente, induce la glicogenolisi epatica ed il conseguente rilascio di glucosio nel sangue (Fabbri et al., 1998b).

Il rilascio basale tempo-dipendente a 30 min. in assenza di ADR è risultato essere più alto nelle YEp (FII) rispetto agli altri gruppi i cui valori basali sono abbastanza simili. Il glucosio rilasciato dopo stimolazione con ADR raggiunge la fase stazionaria dopo 30 min. nel gruppo delle YEp. Diversamente, il plateau non è raggiunto negli altri tre gruppi in cui il glucosio rilasciato segue

ancora la fase esponenziale come visto nello studio di Danulat e Mommsen (1990) in epatociti di scorfano, lasciando ipotizzare un andamento simile a quello riscontrato negli epatociti di pesce gatto in cui il plateau è raggiunto ben oltre i 60 min. di incubazione con l'ormone (Brighenti et al., 1987).

Il rilascio basale dose-dipendente a 30 min. in assenza di ADR è risultato essere ancora una volta più alto nelle YEp (FII) seguito dalle YEa (FII/III), SEa (FIII) ed infine dalle SEi (FIV). L'effetto indotto dall'ADR segue un andamento dose-dipendente come precedentemente riportato da Fabbri et al. (1998a). L'effetto è risultato più modesto alle concentrazioni fisiologiche (0,1 – 1 nM) e maggiore ai valori coincidenti con quelli di animali esposti a stress (0,1 – 10 µM). Differenze significative per tutti i gruppi si sono riscontrate a partire dalla concentrazione 0,01 µM con rilasci più elevati nel gruppo delle YEp. La sensibilità all'ormone, misurata in termini di EC₅₀ è risultata essere molto più elevata nell'anguilla europea (nM) rispetto allo scorfano (*Sebastes caurinus*) ed al pesce gatto (*Ameiurus melas* e *Ictalurus melas*) i cui valori di EC₅₀ sono di 2-3 ordini di grandezza superiori (Danulat e Mommsen, 1990; Dugan et al., 2008; Fabbri et al., 1992). Valori più simili di EC₅₀, espressi come valori pD₂, sono invece stati riscontrati nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) nello studio di Van Heeswijk et al. (2006). I valori di EC₅₀ sono simili per i due gruppi di anguille gialle (YEa e YEp) e di argentine autunnali (SEa). Le argentine invernali (SEi) presentano invece un valore di EC₅₀ significativamente diverso e leggermente superiore rispetto agli altri tre gruppi seppur dello stesso ordine di grandezza. Questi risultati avvalorerebbero l'ipotesi che, in questo stadio di sviluppo, in cui gli animali cessano di alimentarsi, le CA giochino un ruolo fondamentale nella mobilizzazione di altre riserve energetiche come quelle lipidiche. Infatti è stato dimostrato che in condizioni di digiuno i tassi di mobilizzazione degli acidi grassi liberi siano maggiori rispetto ai tassi glicogenolitici (Van Heeswijk et al., 2006).

Il rapido rilascio di glucosio osservato in particolare per le YEp potrebbe riflettere il maggior contenuto di glicogeno riscontrato sia negli epatociti che nel fegato di questi animali rispetto ai gruppi delle anguille argentine. Questa relazione tra contenuto di glicogeno e glucosio rilasciato è stata dimostrata da Mommsen nel 1986 in epatociti isolati da tre specie di salmonidi. Questa correlazione è stata dimostrata anche nella perca (Foster e Moon, 1991) e

nella trota iridea (Van Heeswijk et al., 2006). In particolare nella trota si è visto che, in condizioni di digiuno, viene preferita la via del metabolismo lipidico come evidenziato dall'aumento delle lipasi nel fegato (Van Heeswijk et al., 2006). Dal punto di vista fisiologico, le anguille in fase migratoria, come le SEi, che smettono di alimentarsi, tendono ad investire maggiormente nell'accumulo di lipidi a fini riproduttivi, a discapito delle riserve di glicogeno (Van Ginneken and Van den Thillart, 2000). Di conseguenza i bassi livelli di glicogeno nel fegato delle anguille argentine ed il minor rilascio di glucosio dagli epatociti, potrebbe riflettere questo differente trend per quanto riguarda l'accumulo e l'utilizzo delle risorse energetiche. Si nota infatti che esiste una differenza significativa nei livelli di glicogeno tra i gruppi delle gialle (fase di accrescimento in cui si alimentano) ed i gruppi delle argentine, i cui livelli si abbassano notevolmente nel gruppo delle SEi. Questa ipotesi è supportata dalla correlazione significativa tra il contenuto di glicogeno nel fegato ed il glucosio rilasciato dagli epatociti per le YEp (FII) e le SEi (FIV). La correlazione non è risultata significativa per gli altri due gruppi probabilmente data la fase di transizione in cui si trovano tra lo stadio giallo e quello argentino.

L'ADR ha indotto un aumento nei livelli intracellulari di AMPc con effetto tempo- e dose-dipendente. Il AMPc è un metabolita delle cellule prodotto dall'enzima adenil ciclasi a partire da ATP. E' un importante secondo messaggero coinvolto nei meccanismi di trasduzione del segnale nelle cellule in risposta a vari stimoli come quelli indotti dalle CA. La sua principale funzione è quella di attivare la protein chinasi A (PKA) che porta ad un aumento di glucosio come conseguenza della glicogenolisi. I livelli basali di AMPc erano abbastanza simili tra i vari gruppi (circa 1 nmol/g cell), in linea con dati riportati sia per l'anguilla americana che per il pesce gatto (Fabbri et al., 1995). I livelli massimi raggiunti dopo 30 min. di incubazione con ADR 1 μ M erano tuttavia differenti tra gli stadi giallo ed argentino, con valori minimi di circa 10 nmol/g cell nel gruppo delle SEa (FIII). Curiosamente, le SEa hanno mostrato i valori più bassi in termini di glucosio rilasciato dalle cellule.

Come precedentemente dimostrato nell'anguilla e in altri pesci (Dugan et al., 2008; Fabbri et al., 1992; Nickerson et al., 2001) la risposta AMPc dipendente è anche dose – dipendente. Pur essendo le risposte abbastanza uguali, è stato notato che i livelli di AMPc nelle SEa (FIII) non raggiungono il plateau nemmeno alla concentrazione di ADR più alta testata (100 μ M).

Studi di binding recettoriale hanno dimostrato che i β 2-AR sono la classe predominante a livello epatico nei pesci (Dugan et al 2008, Fabbri et al 1992, Nickerson et al 2001) così come nei mammiferi (Garcia-Sainz et al., 1996). E' con lo studio di Fabbri *et al.* (1994b) che si dimostra per la prima volta la presenza degli α -AR nei pesci. Utilizzando le sequenze parziali ottenute per α 1- e β 2-AR, è stato possibile valutare la loro abbondanza negli epatociti isolati di anguille in tre diversi stadi del ciclo biologico, mostrando una differente espressione tra gli stadi. Questo è il primo studio per quanto riguarda la quantificazione assoluta degli AR nell'anguilla e l'unico che confronta gli α 1- ed i β 2-AR nei pesci.

La quantificazione in termini di numero di copie geniche dei sottotipi recettoriali β 1, β 2 e β 3, ha dimostrato che i β 2-AR sono i più abbondanti nel fegato dei pesci (Giltrow et al., 2011).

Il presente studio ha dimostrato la predominanza dei β 2-AR rispetto agli α 1-AR negli epatociti in tutti gli stadi di sviluppo analizzati. Questo si correla con il ruolo dominante della via β - AR/AMPC sul metabolismo glucidico epatico, ampiamente documentato nella letteratura (Fabbri et al., 1998b). La quantità di AR è significativamente maggiore nelle argentine invernali (SEi) rispetto alle gialle primaverili (YEp) e segue le fasi dello sviluppo come visto anche per i geni che codificano per la vitellogenina (*vgt*) ed i recettori tiroidei di tipo β (*THR β*), coinvolti nel processo di argentinizzazione (Franzellitti et al., 2015).

Gli α 1-AR aumentano di 9 volte ed i β 2-AR triplicano nel fegato delle anguille argentine, rispetto alle anguille gialle. Questo aumento potrebbe essere implicato ad un aumento nei livelli di cortisolo come precedentemente dimostrato nelle anguille in fase migratoria (Van Ginneken et al., 2009).

Il grande numero di copie geniche e i differenti livelli di glicogeno sono le maggiori differenze riscontrate nella regolazione del metabolismo glucidico epatico in anguille campionate in periodi differenti del loro ciclo biologico nelle Valli di Comacchio. Tuttavia, diversamente da quanto aspettato, non si sono riscontrate differenze sostanziali in termini di glucosio rilasciato dopo somministrazione di ADR o nei livelli di AMPC.

L'elevata presenza di β 2-AR ed il basso contenuto di glicogeno nel fegato delle anguille argentine, si potrebbe correlare all'induzione della lipolisi piuttosto che alla glicogenolisi come visto da Van Heeswijk *et al.* (2006). L'enorme aumento di α 1-AR nelle argentine potrebbe

imputarsi ad un maggior coinvolgimento della via che attiva la fosfolipasi C e che porta ad un induzione dei livelli di calcio intracellulare ed all'attivazione della protein chinasi C che indurrebbe altri processi cellulari. I dati ottenuti non ascrivono alle CA una modulazione differente del metabolismo glucidico epatico in anguille gialle ed argentine. Tuttavia, data l'elevata variazione nei AR, la sensibilità diversa verso le CA può avere un ruolo importante nella modulazione del metabolismo lipidico che non è stato però oggetto di questo studio. L'elevato numero di copie geniche degli AR potrebbe avere un peso importante per altri adattamenti funzionali che intercorrono nelle anguille argentine nel processo di argentinizzazione.

Questo studio ha voluto fornire un contributo riguardo la fisiologia dei pesci, in particolare per quanto riguarda il controllo adrenergico del metabolismo glucidico a livello epatico. Inoltre, ha permesso di selezionare il parametro che più facilmente identifichi le alterazioni a carico del metabolismo glucidico: il glucosio rilasciato dalle cellule. La variazione di questo parametro può essere considerato un biomarker utile per valutare gli effetti di xenobiotici ed in particolare di farmaci a livello del metabolismo glucidico epatico.

2.5 Riferimenti Bibliografici

- Aroua S, Schmitz M, Baloché S, Vidal B, Rousseau K, Dufour S. (2005) Endocrine evidence that silvering, a second metamorphosis in the eel, is a pubertal rather than a metamorphic event. *Neuroendocrinol.* 82:221-232.
- Bonhommeau S, Chassot E & Rivot E. (2008) Fluctuations in European eel (*Anguilla anguilla*) recruitment resulting from environmental changes in the Sargasso Sea. *Fish Oceanogr.* 17, 32–44
- Brighenti L, Puviani C, Gavioli ME, Ottolenghi C. (1987) Mechanisms involved in catecholamine effect on glycogenolysis in catfish isolated hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol.* 66:306-313.
- Brighenti L, Puviani AC, Gavioli ME, Fabbri E, Ottolenghi C. (1991) Interaction of salmon glucagon, glucagon-like peptide, and epinephrine in the stimulation of phosphorylase activity in fish isolated hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol.* 82(1):131-9.
- Busby ER, Cooper GA and Mommsen TP. (2002) Novel role for prostaglandin E2 in fish hepatocytes: regulation of glucose metabolism. *J Endocrinol.* 174, 137-146.
- Carrieri A, Cavallini G, Plazzi M, Rossi R. (1992) Struttura della popolazione di anguille gialle ed argentine (*Anguilla anguilla* L.) nelle Valli di Comacchio (biennio 1989-90), Sezione: Biologia e Medicina, vol. 2, N. 1.
- Danulat E, Mommsen TP. (1990) Norepinephrine: a potent activator of glycogenolysis and gluconeogenesis in rockfish hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol.* 78:12-22.
- Dekker W. (2003) Eel stocks dangerously close to collapse. ICES newsletter 40, 10-11.
- Dugan SG, Chen X, Nickerson JG, Montpetit CJ, Moon TW. (2008) Regulation of the black bullhead hepatic beta-adrenoceptors. *Comp Biochem Physiol. B Biochem Mol Biol.* 149:265-274.
- Durif C, Dufour S and Elie P. (2005) The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *J Fish Biol.* 66, 1025-1043.
- Durif C, Guibert A and Elie P. (2009) Morphological discrimination of the silvering stages of the european eel. *American fisheries society symposium* 58, 103-111.
- EELREP (2005) Estimation of the reproduction capacity of European eel. Final report 2005.
- Fabbri E and Moon TW. (1994a) Adrenergic receptors and second messenger systems in liver of vertebrates. *In Perspectives in Comparative Endocrinology* (ed. K.G. Davey, R.E. Peter and S.S. Tobe), pp. 499-506. NRC Canada, Ottawa.
- Fabbri E, Puviani AC, Ottolenghi C, Capuzzo A. (1994b) Identification of alpha-adrenergic receptors in catfish liver and their involvement in glucose release. *Gen Comp Endocrinol.* 95:457-63.
- Fabbri E, Barbin L, Capuzzo A, and Biondi C. (1998a) Adenylyl cyclase activity and glucose release from the liver of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Am J Physiol.* 257, 1563-1570.
- Fabbri E, Capuzzo A and Moon TW. (1998b) The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comp Biochem Physiol.* 120C, 177-192.
- Fabbri E, Caselli F, Piano A, Sartor G, Capuzzo A. (2003) Cd²⁺ and Hg²⁺ affect glucose release and cAMP-dependent transduction pathway in isolated eel hepatocytes. *Aquat Toxicol.* 62(1):55-65.
- Fabbri E, Gambarotta A, Moon TW. (1995) Adrenergic signaling and second messenger production in hepatocytes of two fish species. *Gen Comp Endocrinol.* 99:114-124.
- Fabbri E, Selva C, Moon TW and Capuzzo A. (2001) Characterization of [3H]CGP 12177 binding to β-adrenergic receptors in intact eel hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol.* 121, 223-231.
- Fabbri E, Brighenti L, Ottolenghi C, Puviani AC, Capuzzo A. (1992) Beta-adrenergic receptors in catfish liver membranes: characterization and coupling to adenylate cyclase. *Gen Comp Endocrinol.* 85(2):254-60.
- Fontaine M. (1975) Physiological mechanisms in the migration of marine and amphihaline fish. *Adv mar Biol.*, 13, 241-355.
- Foster GD, Moon TW (1991). Hypometabolism with fasting in the yellow perch (*Perca flavescens*): A study of enzymes, hepatocyte metabolism and tissue size. *Physiol Zool.* 64:259-275.
- Franzellitti S, Kiwan A, Valbonesi P, Fabbri E. (2015) Selection of best-performing reference gene products for investigating transcriptional regulation across silvering in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Sci Rep.* 5:16966.
- Fulton TW. (1904) The rate of growth of fishes. 22nd Annual Report of the Fishery Board of Scotland Part III, 141-241.
- García-Sáinz JA, Romero-Avila MT, González-Espinosa C. (1996) Coexpression of alpha 1A- and alpha 1B-adrenoceptors in the liver of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Eur J Pharmacol.* 311:277-283

- Giltrow E, Eccles PD, Hutchinson TH, Sumpter JP, Rand-Weaver M. (2011) Characterisation and expression of β 1-, β 2- and β 3-adrenergic receptors in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Gen Comp Endocrinol.* 173:483-490.
- ICES (2010). Report of the ICES Advisory Committee. ICESAdvice 2010.
- Ings JS, George N, Peter MC, Servos MR, Vijayan MM. (2012) Venlafaxine and atenolol disrupt epinephrine-stimulated glucose production in rainbow trout hepatocytes. *Aquat Toxicol.* 15;106-107:48-55.
- Jacoby D, & Gollock M. (2014) *Anguilla anguilla*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2 (2014). Available at: www.iucnredlist.org (Accessed: 6th July 2015).
- Knights B. (2003) A review of the possible impacts of long-term oceanic and climatic changes and fishing mortality on recruitment of anguillid eels of the Northern hemisphere. *Sci Total Environ.* 310, 237–244
- Lecomte-Finiger R. (1992) Growth history and age at recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure. *Mar Biol.* 114, 205-210.
- Massarsky A, Trudeau VL, and Moon TW. (2011) β -blockers as endocrine disruptors: the potential effects of human β -blockers on aquatic organisms. *J Exp Zool. A Ecol Genet Physiol.* 315, 251-265.
- Mommsen TP and Moon TW. (1990) Metabolic response of teleost hepatocytes to glucagon-like peptide and glucagon. *J Endocrinol.* 126:109-118.
- Mommsen TP, Walsh PJ, Perry SF and Moon TW. (1988) Interactive effects of catecholamines and hypercapnia on glucose production in isolated trout hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol.* 70, 63-73.
- Mommsen TP. (1986) Comparative gluconeogenesis in hepatocytes from salmonid fishes. *Can J Zool.* 64:1110-1115.
- Nickerson JG, Dugan SG, Drouin G, Moon TW. (2001) A putative β 2-adrenoceptor from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular characterization and pharmacology. *Biochemistry* 268:6465-6472.
- Pankhurst NW, Sorensen PW. (1984) Degeneration of the alimentary tract in sexually maturing European *Anguilla anguilla* (L.) and American eels *Anguilla rostrata* (LeSueur), *Can J Zool.* 62, 1143-1149.
- Pankhurst NW. (1982) Relation of visual changes to the onset of sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of Fish Biology* 21, 127–140.
- Rousseau K, Arouna S, Schmitz M, Elie P & Dufour S. (2009) Silvering: Metamorphosis or puberty? In: *Spawning migration of the european eel* (ed. G. Van den Thillart, S. Dufour & J. C. Rankin) pp. 39–63. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Svedang H, and Wickstrom H. (1997) Low fat contents in female silver eels: indications of insufficient energetic stores for migration and gonadal development. *J Fish Biol.* 50, 475-486.
- Tesch FW. (2003) The eel. (ed. J. E. Thorpe) pp. 1–416. Wiley-Blackwell, Oxford (UK).
- Van den Thillart GEEJM, Rankin J C & Dufour S. (2009) Spawning migration of the European eel: reproduction index, a useful tool for conservation management. Dordrecht, The Netherlands: Springe.
- Van Ginneken V, Bruijs M, Murk T, Palstra A, van den Thillart G. (2009) The effect of PCBs on the spawning migration of European eel (*Anguilla anguilla* L.). In: *Spawning migration of the european eel* (ed. G. Van den Thillart, S. Dufour and J.C. Rankin) pp. 39-63. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Van Ginneken V, Durif C, Balm SP, Boot R, Verstegen MWA, Antonissen E and van den Thillart G. (2007) Silvering of European eel (*Anguilla anguilla* L.): seasonal changes of morphological and metabolic parameters. *Animal Biol.* 57, 63-77.
- Van Ginneken VJ, van den Thillart GE. (2000) Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature* 403:156-157.
- Van Heeswijk JCF, Vianen GJ, Van den Thillart GE. (2006) The adrenergic control of hepatic glucose and FFA metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Increased sensitivity of adrenergic stimulation with fasting. *Gen Comp Endocrinol.* 145, 51-61.
- Wright PA, Perry SF, Moon TW. (1989) Regulation of hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis by catecholamines in rainbow trout during environmental hypoxia. *J Exp Biol.* 147:169-88.

3. Alterazioni di farmaci β -bloccanti sul metabolismo glucidico dell'anguilla attraverso perfusione cellulare



Glossario

ADR	adrenalina
AR	recettori adrenergici
β -AR	recettori β adrenergici
CF	fattore di condizione
ED	diametro dell'occhio
EDh	diametro orizzontale dell'occhio
EDv	diametro verticale dell'occhio
EI	indice dell'occhio
FL	lunghezza pinna pettorale
L	lunghezza totale del corpo
SI	indice di argentinizzazione
W	peso totale del corpo
PRO	propranololo
ATE	atenololo
Log Kow	coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua
ER	rapporto di effetto
FPM	fish plasma model
FPC _{ss}	concentrazione plasmatica nei pesci all'equilibrio
HPC _t	dose terapeutica umana

3.1 Introduzione

La presenza di farmaci nell'ambiente è nota sin dagli anni '90, anche se la consapevolezza del rischio per gli animali acquatici è emersa solo recentemente (Santos et al., 2010). Il perfezionamento delle tecniche analitiche ha mostrato che sono tantissimi i farmaci presenti nei fiumi e nelle acque superficiali a concentrazioni nell'ordine di ng- μ g/L (Ternes, 1998; Fent et al., 2006). Il problema del rischio ambientale dovuto ai farmaci in ambiente, è ora il centro di un'intensa ricerca volta a quantificare il rischio potenziale posto da questi composti sia per l'uomo che per la salvaguardia dell'ambiente stesso. Poiché i farmaci sono composti disegnati per avere un effetto specifico a basse concentrazioni, diversi approcci, che rientrano nel modello concettuale della "Read – Across Hypothesis", (Rand-Weaver et al., 2013) sono stati recentemente proposti per identificare i farmaci di maggiore preoccupazione: il "Mode of Action" (MoA; Christen et al., 2010), l' "Adverse Outcome Pathway" (AOP; Ankley et al., 2010) ed il "Fish Plasma Model" (FPM; Huggett et al., 2003a). Maggiori dettagli sono stati forniti nel Paragrafo 1.3.

Tra i vari composti farmaceutici presenti in ambiente, si riscontrano i bloccanti dei recettori beta adrenergici (β -bloccanti) (Fent et al., 2006; Ternes et al., 2001). Questa classe di farmaci viene utilizzata per la cura delle malattie cardiovascolari come l'insufficienza cardiaca, l'aritmia, l'ipertensione e l'angina (Owen et al., 2007; Massarsky et al., 2011). Sono farmaci altamente prescritti (Frayssé and Garric, 2005; Fent et al., 2006) che costituiscono circa l'8% dei farmaci presenti in ambiente (Santos et al., 2010) e per questo, sono stati ritrovati negli effluenti degli impianti di depurazione e nelle acque superficiali di tutto il mondo. I β -bloccanti agiscono sui recettori β adrenergici (β -ARs) presenti sia nei mammiferi che nei pesci. Tre sono i tipi di recettori β (β 1-, β 2-, e β 3-ARs) distribuiti nei vari tessuti dei pesci tra cui cuore (Nickerson et al., 2001), branchie (Haywood et al., 1977), fegato (Fabbri et al., 2008), cervello (Zikopoulos and Dermon, 2005), reni e milza (Nickerson et al., 2001), in grado di regolare diverse vie fisiologiche. L'omologia tra i β -ARs dei mammiferi e quelli dei pesci permette che l'azione dei β -bloccanti sia simile anche su organismi non target come i pesci stessi. In commercio esistono vari tipi di farmaci β -bloccanti, i più utilizzati sono il propranololo ed il nadololo (antagonisti non selettivi

dei β_1 - e β_2 -ARs), ed il metoprololo e l'atenololo (antagonisti selettivi dei recettori β_1) (Frayse and Garric, 2005; Huggett et al., 2003b). Nonostante questi composti condividano la stessa farmaco dinamica, essi presentano target recettoriali diversi, una diversa potenza e specificità d'azione, e differenti proprietà fisico-chimiche e farmaco cinetiche (Maurer et al., 2007; Owen et al., 2007). Di conseguenza, il destino ambientale e gli effetti indotti sugli organismi possono essere differenti. E' il caso di due β -bloccanti altamente prescritti, il propranololo (PRO) e l'atenololo (ATE), che presentano coefficienti di ripartizione ottanolo – acqua molto diversi (rispettivamente > 3 e < 1 ; Maurer et al., 2007), un differente tasso di metabolizzazione (rispettivamente di circa 90% e 10%; Maurer et al., 2007), ed una diversa specificità recettoriale (β_1 e β_2 per PRO e solo β_1 per ATE; Rang et al., 2003). Sono presenti nell'ambiente acquatico a concentrazioni massime di 590 ng/L (PRO; Ternes et al., 1998) e 800 ng/L (ATE; Santos et al., 2010).

I farmaci β -bloccanti sono stati studiati sui pesci principalmente per il loro effetto a livello cardiovascolare (Finn et al., 2012; Petersen et al., 2013) e riproduttivo (Huggett et al., 2002). Tuttavia i β -ARs svolgono un ruolo cruciale nella risposta allo stress (Wendelaar Bonga, 1977) e nella regolazione del metabolismo lipidico e glucidico. In particolare le catecolamine (CA), interagendo con i recettori β_1/β_2 del fegato, stimolano la glicogenolisi ed il rilascio di glucosio nel sangue per il fabbisogno energetico del cervello e degli altri organi.

Il presente studio ha voluto valutare l'effetto di due farmaci β -bloccanti (PRO ed ATE) sul metabolismo glucidico epatico dell'anguilla europea (*Anguilla anguilla*) e la conseguente interferenza sull'adrenalina (ADR) fisiologica. E' stato pertanto sviluppato un indicatore biologico attraverso la messa a punto di un metodo *in vitro* dinamico utilizzando epatociti primari isolati dal fegato e sospesi all'interno di colonnine di resina. I sistemi *in vitro* con epatociti primari sono ampiamente utilizzati per predire il metabolismo delle sostanze *in vivo*, identificare sostanze genotossiche ed identificare sostanze che inibiscono determinati enzimi (Hengstler et al., 1999, 2003; Osterod et al., 2002; Ringel et al., 2002). I test *in vitro* con epatociti primari possono essere di vari tipi: epatociti in sospensione, colture cellulari, fettine di fegato, bioreattori e sistemi di perfusione (Gebhardt et al., 2003). Sebbene quest'ultimo sia riconosciuto ed utilizzato come sistema sperimentale per studi *in vitro* su mammiferi per capire

il metabolismo dei farmaci, l'induzione enzimatica, il trapianto e la rigenerazione (Gebhardt et al., 2003), non è mai stato impiegato per valutare gli effetti sub-letali dei farmaci sui pesci. È stato usato per studi prettamente fisiologici (Ottolenghi et al., 1994) ed utilizzato in un solo studio per testare gli effetti di metalli pesanti (Fabbri et al., 2003). La scelta di utilizzare questo sistema dinamico al posto delle classiche incubazioni statiche in provetta, ricade sul fatto che la sensibilità delle cellule agli ormoni sia molto più elevata in questa condizione (Mine et al., 1990; Ottolenghi et al., 1994).

Le concentrazioni dei farmaci testate sono state scelte sulla base delle concentrazioni misurate nel sangue dei pesci dopo esposizione cronica di 21 giorni a PRO e ATE negli studi di Giltrow *et al.* (2009) e Winter *et al.* (2008). Nel nostro studio è stato fatto riferimento al FPM (Huggett et al., 2003a, dettagli più approfonditi riguardo al modello nel Paragrafo 1.3), al fine di verificare se è probabile che le concentrazioni ambientali o sperimentali di un farmaco siano in grado di produrre un effetto terapeutico nei pesci così come si verifica nell'uomo. Infine abbiamo voluto verificare se concentrazioni inferiori rispetto la dose terapeutica umana fossero comunque in grado di indurre un effetto avverso in organismi non target come i pesci. Se il FPM si dimostrasse efficace quando applicato ai β -bloccanti, potrebbe essere applicabile anche ad altri gruppi di composti farmaceutici in un'ottica di valutazione del rischio ambientale.

3.2 Materiali e Metodi

Animali e condizioni sperimentali

Esemplari di anguilla europea (*Anguilla anguilla*) del peso di circa 500 g sono stati acquistati dall'allevamento DE.A.MAR s.r.l. (Rovigo, Italia). Dopo averli trasportati in laboratorio, i pesci sono stati mantenuti in un acquario della capacità di 400 litri contenente acqua dechlorinata alla temperatura di 16-18°C, continuamente areata e osservando il naturale fotoperiodo. Gli animali sono stati scelti in maniera random dall'acquario dopo almeno tre giorni di acclimatazione prima di iniziare gli esperimenti. Per ogni esperimento le anguille sono state sacrificate attraverso una rapida decapitazione. Tutte le procedure sperimentali sono state approvate dal comitato etico e scientifico dell'Università di Bologna e si sono svolte in accordo con la legislazione europea riguardante la protezione degli animali per fini scientifici (Council Directive 2010/63/EU).

Parametri morfometrici

Gli animali sono stati misurati per i parametri morfometrici: lunghezza del corpo, L (± 5 mm); peso del corpo, W (± 10 g); diametri dell'occhio, ED (*h*, orizzontale e *v*, verticale, $\pm 0,01$ mm); lunghezza della pinna pettorale, FL ($\pm 0,01$ mm) permettendo il calcolo dei seguenti indici:

- d) Fattore di condizione, CF = $105 W/L^3$ (Fulton, 1994);
- e) Indice dell'occhio, EI = $100 [(ED_h + ED_v)/4]2\pi/L$, (Pankhurst, 1982);
- f) Indice di argentinizzazione, SI, calcolato in accordo con Durif et al., (2005; 2009).

SI per le femmine (SF) ed i maschi (SM) si basa su parametri esterni del corpo, L, W, FL e la media di ED, (mED; basato sui diametri verticale ed orizzontale dell'occhio) e lo stadio di maturazione è assegnato come il più alto delle seguenti somme (vedere EELREP, 2005):

$$SI = -61,276 + 0,242 L - 0,108 W + 5,546 mED + 0,614 FL$$

$$SFII = -87,995 + 0,286 L - 0,125 W + 6,627 mED + 0,838 FL$$

$$SFIII = -109,014 + 0,280 L - 0,127 W + 9,108 mED + 1,182 FL$$

$$SFIV = -113,556 + 0,218 L - 0,103 W + 12,187 mED + 1,230 FL$$

$$SFV = -128,204 + 0,242 L - 0,136 W + 12,504 mED + 1,821 FL$$

$$\text{SMII} = -84,672 + 0,176 L - 0,116 W + 12,218 \text{ mED} + 1,295 \text{ FL}$$

Se il valore massimo deriva da SFIV, l'anguilla è classificata come FIV, o femmina al quarto stadio di argentinizzazione.

Preparazione degli epatociti

Gli epatociti di anguilla sono stati isolati attraverso digestione enzimatica con collagenasi seguendo il metodo di Mommsen e Moon (1990). Dopo incannulazione della vena epatica, il fegato è stato perfuso per 10 min. alla velocità di 2 mL/min. con soluzione fisiologica di Hanks' contenente (in mM): 0,8 MgSO₄, 0,33 NaH₂PO₄, 0,44 KH₂PO₄, 136,9 NaCl, 5,4 KCl, 5,0 HEPES, 5,0 HEPES-Na e 5,0 NaHCO₃; pH 7,63 a temperatura ambiente. La perfusione si è protratta per altri 25 min. con la stessa soluzione arricchita di collagenasi (10 mg/50 mL) (Sigma-Aldrich). Il fegato è stato rimosso, sminuzzato con una lametta manicata, e filtrato attraverso due filtri in nylon (73 e 153 µm). La sospensione cellulare è stata lavata due volte con soluzione di Hanks' e due volte con la medesima soluzione arricchita con CaCl₂ 1,5 mM; il mezzo è stato allontanato di volta in volta mediante centrifugazione a 80 *xg* a 4°C, fino alla risospensione finale in Hanks' con CaCl₂ 1,5 mM.

Perifusione degli epatociti su colonnine di resina

Gli epatociti sono stati perfusi seguendo il metodo descritto in Ottolenghi *et al.* (1994) con leggere modifiche. Circa 100 mg di epatociti (~ 5 x 10⁶ cellule) sono stati posti in cima ad una siringa di plastica da 2,5 mL accuratamente riempita con 3 mL di resina fine BioGel P4 (BIO-RAD Laboratories) precedentemente idratata a 4°C con soluzione di Hanks' (Fig. 1). Le siringhe erano connesse ad una pompa peristaltica multicanale (modello Gilson MINIPLUS 3) e perfuse alla velocità di 0,2 mL/min. Le cellule sono state lavate con soluzione di Hanks' arricchita di CaCl₂ (1,5 mM) per 40 min. prima di iniziare l'esposizione. Gli epatociti sono stati esposti per 15 min. ad adrenalina (ADR) (Sigma-Aldrich) a differenti concentrazioni (0,01 – 0,1 – 1 µM). Per gli esperimenti con i farmaci, le cellule sono state esposte ad ADR alla concentrazione fisiologica per i pesci (0,01 µM = 2,2 µg/L) in presenza o assenza di PRO ed ATE (Sigma-Aldrich) alle concentrazioni misurate nel sangue dei pesci dopo esposizione a tali contaminanti (Giltrow *et al.*, 2009; Winter *et al.*, 2008).

Le concentrazioni di PRO testate erano:

- 0,7 $\mu\text{g/L}$, raggiunta dopo esposizione a 1 $\mu\text{g/L}$
- 8 $\mu\text{g/L}$, raggiunta dopo esposizione a 10 $\mu\text{g/L}$
- 93 $\mu\text{g/L}$, concentrazione intermedia aggiunta
- 340 $\mu\text{g/L}$, raggiunta dopo esposizione a 100 $\mu\text{g/L}$

Le concentrazioni di ATE testate erano:

- 4,2 $\mu\text{g/L}$, raggiunta dopo esposizione a 100 $\mu\text{g/L}$
- 30 $\mu\text{g/L}$, raggiunta dopo esposizione a 320 $\mu\text{g/L}$
- 109 $\mu\text{g/L}$, raggiunta dopo esposizione a 3200 $\mu\text{g/L}$
- 291 $\mu\text{g/L}$, raggiunta dopo esposizione a 10000 $\mu\text{g/L}$

L'ormone è stato somministrato per 15 min. (dal min. 35 al min. 50) mentre i farmaci sono stati somministrati 15 min. prima dell'aggiunta dell'ormone per un tempo complessivo di 40 min. (dal min. 20 al min. 60). Frazioni di eluato (1 mL) sono state raccolte ogni 5 min. per un totale di 120 min. e congelate a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per l'analisi del glucosio rilasciato dalle cellule.

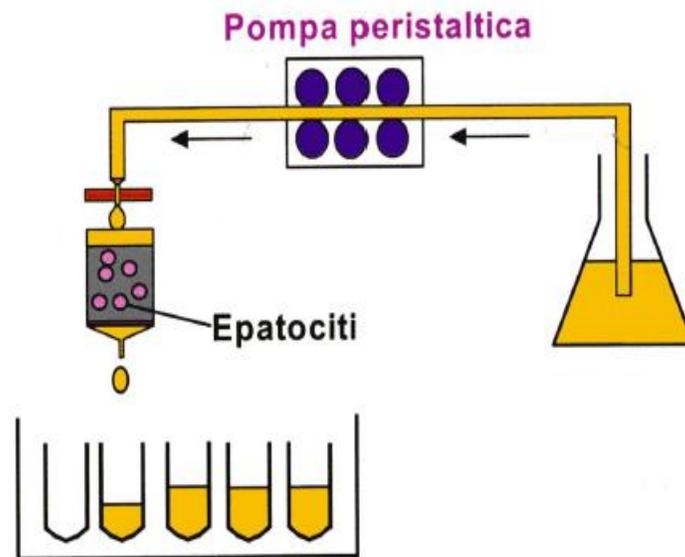


Fig. 3.2.1: Schema di perfusione di epatociti isolati su colonnine di resina attraverso una pompa peristaltica multicannale.

Produzione di glucosio

Il glucosio rilasciato dagli epatociti è stato misurato attraverso il metodo della ossidasi-perossidasi (Busby et al., 2002) con leggere modifiche. Brevemente, 50 μ L di campione vengono incubati con 160 μ L di mezzo di incubazione (in mM: 60 trizma-base, 40 trizma-HCl, 1 MgSO₄, 2 NAD⁺, 1 ATP e 0,1 unità/mL di G6PD) in una piastra da 96 pozzetti agitata per 5 min. a temperatura ambiente, seguiti da 10 μ L di esochinasi (0,3 unità/mL). La piastra è stata incubata per 30 min. a temperatura ambiente e l'assorbanza misurata a 340 nm. Il glucosio rilasciato è stato calcolato come μ g di glucosio per frazione, utilizzando tutte le frazioni corrispondenti al picco di stimolazione dell'ormone (dal min. 45 al min. 95). In accordo con studi precedenti di Fabbri *et al.* (1999), la percentuale di effetto è stata determinata confrontando la quantità di glucosio rilasciato durante il picco di stimolazione ormonale con i livelli basali rilasciati nelle medesime frazioni. Nello stesso modo, l'effetto inibitorio dei farmaci sul rilascio di glucosio indotto dall'ormone è stato determinato confrontando la quantità di glucosio rilasciato dopo esposizione alla sola ADR.

Analisi statistica

I dati sono stati interpolati usando il software SigmaPlot 12.0 e l'analisi della varianza è stata effettuata usando il pacchetto SigmaStat 12.0 tramite ANOVA ad una via seguita dal test di Bonferroni come test *post hoc*. Le differenze statisticamente significative sono state accettate quando $p < 0,05$.

3.3 Risultati

Parametri morfometrici

I parametri morfometrici relativi alle anguille utilizzate negli esperimenti sono mostrati in Tabella 3.3.1. In accordo con il colore argentato dell'addome, questi animali sono stati classificati come anguille argentine allo stadio FIII/FIV di argentinizzazione e presentavano un EI > 6,5, valore soglia che identifica l'anguilla sessualmente matura.

Tabella 3.3.1: parametri morfometrici di anguilla europea (*Anguilla anguilla*). I dati sono espressi come la media \pm ES.

	L (mm)	W (mm)	FL (mm)	EDh (mm)	Edv (mm)	CF	EI	SI
MEDIA	618,0	481,2	26,0	8,6	8,3	0,2	9,2	FIII/FIV
ES	9,3	21,6	0,3	0,2	0,2	0,01	0,4	0,2

L: lunghezza del corpo

W: peso del corpo

FL: lunghezza pinna pettorale

EDh: diametro orizzontale dell'occhio

EDv: diametro verticale dell'occhio

CF: fattore di condizione

EI: indice dell'occhio

SI: indice di argentinizzazione

Effetto di adrenalina sul rilascio di glucosio

Gli epatociti isolati e risospesi su colonnine di resina, sono stati perfusi con concentrazioni crescenti di ADR (0,01 – 0,1 – 1 μM) per 15 min. Come mostrato in Fig.3.3.1, l'ADR induce il rilascio di glucosio dalle cellule nel tempo seguendo un andamento dose-dipendente. Il rilascio è più basso alla concentrazione fisiologica (0,01 μM) ed aumenta enormemente alle concentrazioni tipiche di una condizione di stress (0,1 e 1 μM).

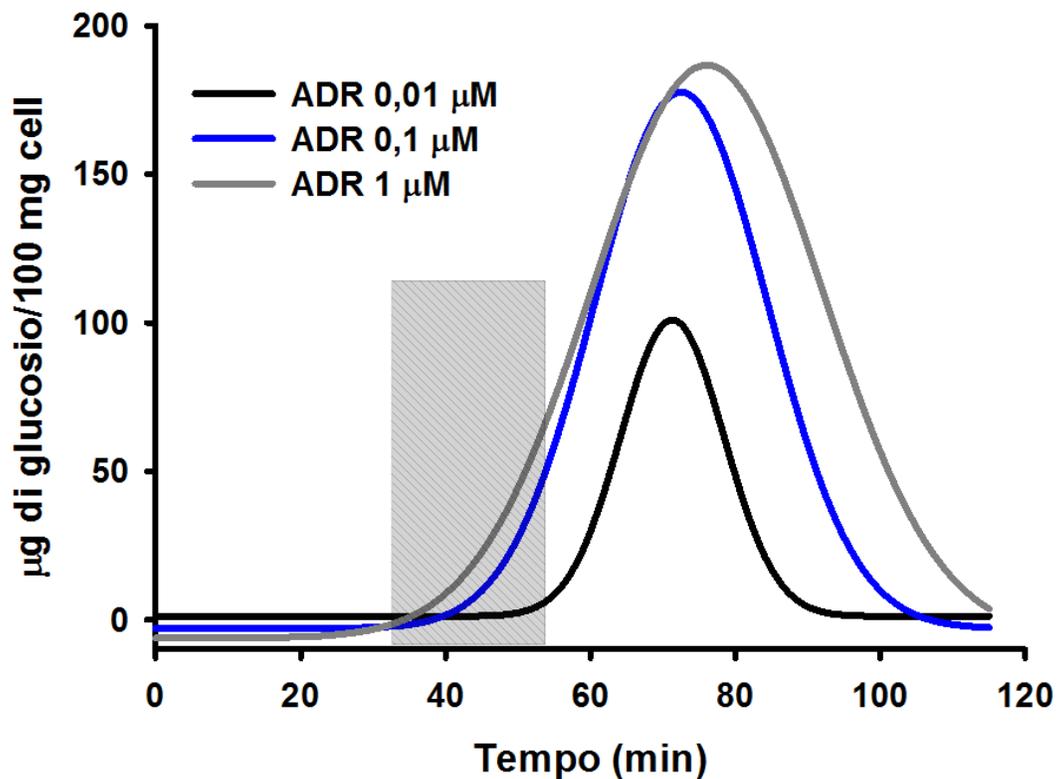


Fig.3.3.1: Rilascio di glucosio da epatociti di anguilla dopo stimolazione con concentrazioni differenti di ADR. Le linee rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. La durata del trattamento ormonale è mostrata dalla barra grigia. Il rilascio basale nelle frazioni corrispondenti al picco di stimolazione è stato calcolato tramite regressione lineare considerando i valori prima e dopo il picco.

Il glucosio totale rilasciato dalle cellule nel picco di stimolazione è mostrato in Fig. 3.3.2. Differenze significative rispetto al valore basale si osservano già alla concentrazione fisiologica (0,01 μM) per diventare altamente significative a 0,1 e 1 μM con una percentuale di stimolazione pari a 189%, 354% e 415% per ADR 0,01, 0,1 e 1 μM .

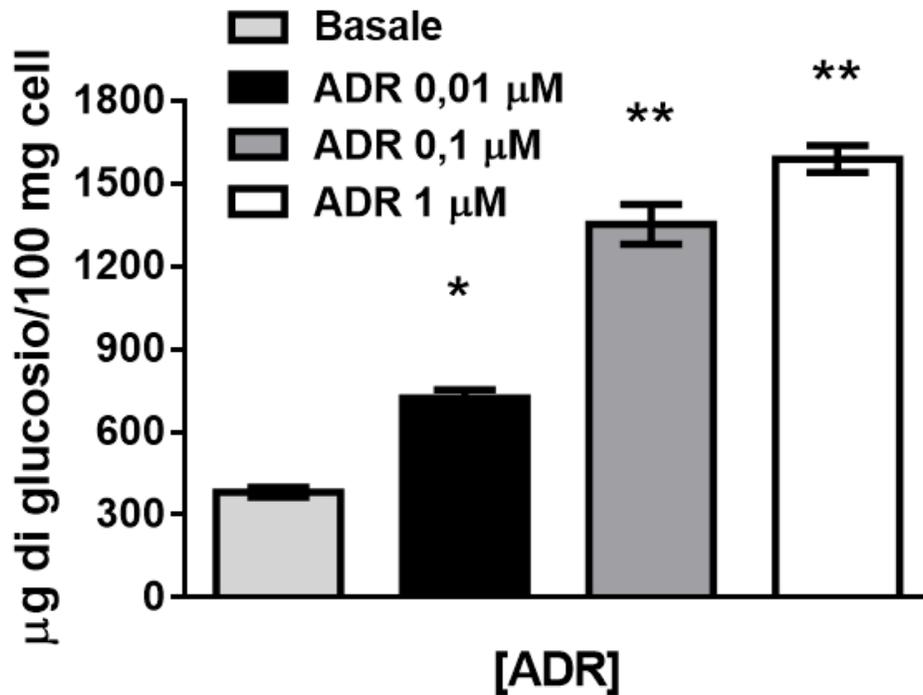


Fig. 3.3.2: Glucosio totale rilasciato da epatociti di anguilla nel picco di stimolazione con ADR a differenti concentrazioni. I valori sono espressi in μg di glucosio/100 mg cell, media \pm ES di 3 esperimenti indipendenti. Il rilascio netto è rispettivamente di 340 ± 33 , $970,8 \pm 38$ e $1206,6 \pm 42$ per ADR 0,01 – 0,1 – 1 μM . Asterischi indicano differenze significative rispetto ai valori basali. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Effetto di propranololo (PRO) sul rilascio di glucosio

Gli epatociti di anguilla sono stati perfusi con concentrazioni differenti di PRO (0,7 – 340 $\mu\text{g/L}$) in presenza di ADR a concentrazione fisiologica (0,01 μM). Il rilascio di glucosio nelle due ore di incubazione è mostrato in Fig. 3.3.3. Il farmaco è stato somministrato per una durata totale di 40 min., prima della somministrazione di ADR (per un totale di 15 min.). Nel grafico sono mostrati una serie di picchi rappresentanti il glucosio rilasciato dalle cellule dopo esposizione della sola ADR od in concomitanza a concentrazioni crescenti del farmaco. L'altezza dei picchi diminuisce enormemente già alla concentrazione di 8 $\mu\text{g/L}$ per appiattirsi quasi del tutto alla concentrazione più alta testata (340 $\mu\text{g/L}$).

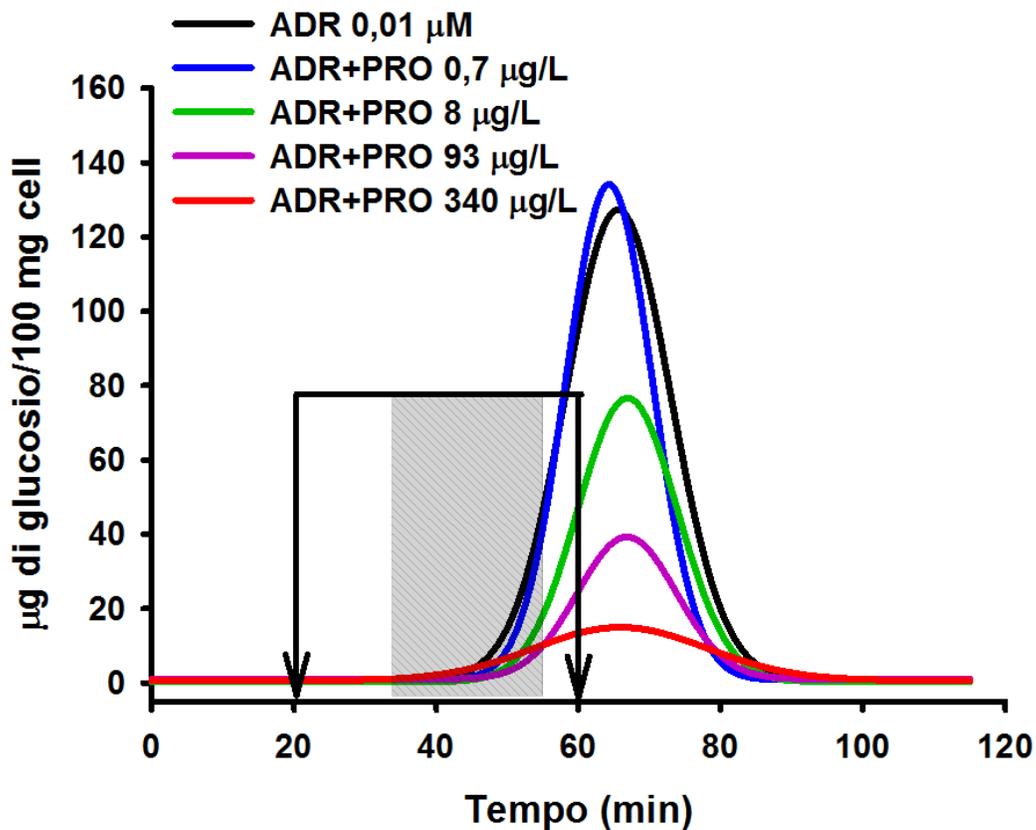


Fig. 3.3.3: Glucosio rilasciato da epatociti isolati di anguilla perfusi su colonnine di resina e stimolati con ADR 0,01 μM (2,2 $\mu\text{g/L}$) in assenza o presenza di PRO a differenti concentrazioni. La durata dei trattamenti è indicata dalla barra grigia (ADR) e dalle frecce (PRO). Le linee rappresentano la media di sei esperimenti indipendenti.

La quantità netta di glucosio rilasciato dalle cellule nel picco di stimolazione nei vari trattamenti è mostrato in Fig. 3.3.4. Si osserva un'inibizione significativa rispetto ad ADR 0,01 μ M alla concentrazione di 8 μ g/L (- 45% dell'effetto) ed altamente significativa alle due concentrazioni più alte testate (- 70% per PRO 93 μ g/L), raggiungendo la percentuale massima di inibizione (- 80%) alla concentrazione di 340 μ g/L.

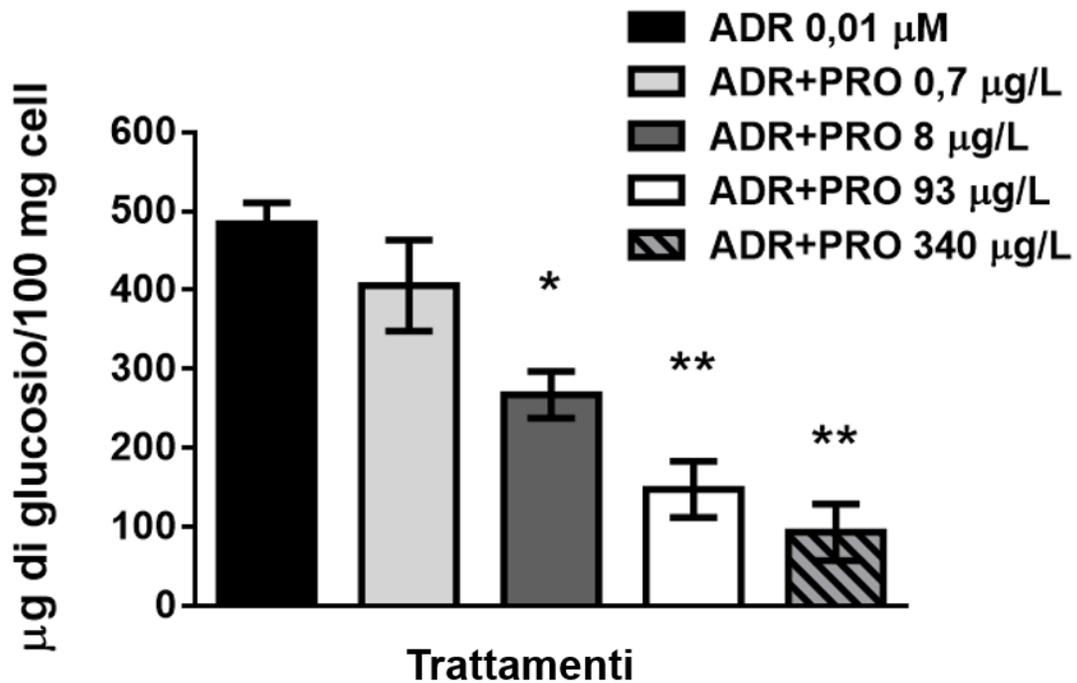


Fig. 3.3.4: Quantità netta di glucosio rilasciato da epatociti di anguilla nel picco di stimolazione con ADR e differenti trattamenti di PRO. I valori sono espressi in μ g di glucosio/100 mg cell (media \pm ES) di 6 esperimenti indipendenti. Asterischi indicano differenze significative rispetto ad ADR 0,01 μ M (2,2 μ g/L). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Effetto di atenololo (ATE) sul rilascio di glucosio

Gli epatociti di anguilla sono stati perfusi con concentrazioni crescenti di ATE (4,2 – 291 $\mu\text{g/L}$) in presenza di ADR a concentrazione fisiologica (0,01 μM). Il rilascio di glucosio nelle due ore di incubazione è mostrato in Fig. 3.3.5. Il farmaco è stato somministrato per una durata totale di 40 min., prima della somministrazione di ADR (per un totale di 15 min.). Nel grafico sono mostrati una serie di picchi rappresentanti il glucosio rilasciato dalle cellule dopo esposizione della sola ADR od in concomitanza con concentrazioni differenti del farmaco. In questo caso la diminuzione è apprezzabile solamente alle due concentrazioni più alte testate (109 e 291 $\mu\text{g/L}$).

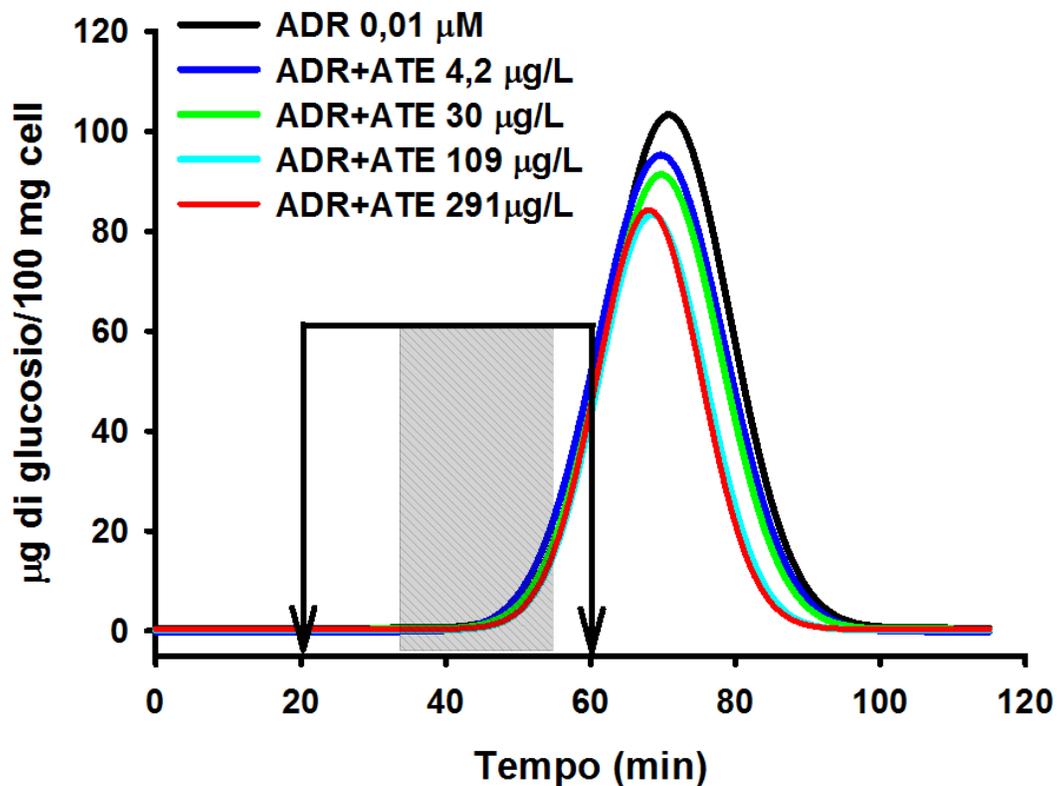


Fig. 3.3.5: Glucosio rilasciato da epatociti isolati di anguilla perfusi su colonnine di resina e stimolati con ADR 0,01 μM (2,2 $\mu\text{g/L}$) in assenza o presenza di ATE a differenti concentrazioni. La durata dei trattamenti è indicata dalla barra grigia (ADR) e dalle frecce (ATE). Le linee rappresentano la media di sei esperimenti indipendenti.

La quantità netta di glucosio rilasciato dalle cellule nel picco di stimolazione nei vari trattamenti è mostrato in Fig. 3.3.6. Si osserva un'inibizione significativa rispetto ad ADR 0,01 μ M alle concentrazioni più alte testate (109 – 291 μ g/L) in cui la percentuale di inibizione è di circa il 30%.

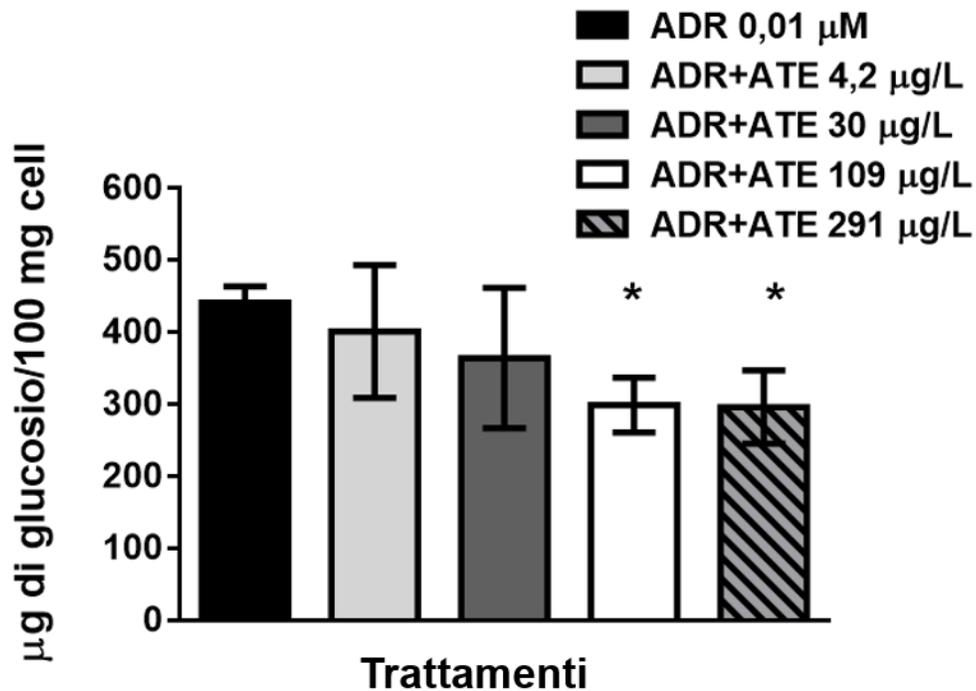


Fig. 3.3.6: Quantità netta di glucosio rilasciato da epatociti di anguilla nel picco di stimolazione con ADR e differenti trattamenti di ATE. I valori sono espressi in μ g di glucosio/100 mg cell (media \pm ES) di sei esperimenti indipendenti. Asterischi indicano differenze significative rispetto ad ADR 0,01 μ M (2,2 μ g/L), * p <0,05.

3.4 Discussione e Conclusioni

Grazie alla peculiarità del ciclo biologico, l'anguilla europea è in grado di colonizzare una grande varietà di habitat (acque oceaniche, costiere, lagune salmastre e corpi di acqua dolce). La dieta diversificata e l'elevata percentuale di grasso, la rende inoltre più soggetta rispetto ad altri pesci ad accumulare notevoli quantità di inquinanti ambientali e composti lipofili come certe classi di farmaci (de Boer et al., 1994; Versonnen et al., 2004). Per questi motivi, è stata utilizzata in studi ecotossicologici in acque dolci e salate, per determinare il rischio biologico associato principalmente ai contaminanti organici ed ai metalli pesanti (Pacheco et al., 1997; Bodin et al., 2014). Trascorrendo gran parte della fase giovanile negli estuari e nelle acque interne, può essere impiegata come organismo sentinella di ambienti sia di acqua dolce che di transizione.

Attraverso la misura dei livelli di glucosio rilasciato dalle cellule, il presente studio ha voluto valutare le alterazioni a carico della glicogenolisi epatica nell'anguilla europea di due farmaci β -bloccanti, propranololo ed atenololo, tipicamente ritrovati nelle acque interne e costiere. Gli effetti sono stati valutati tramite lo sviluppo di un indicatore biologico cellulare, mediante la messa a punto di un metodo *in vitro* dinamico, più sensibile delle classiche incubazioni statiche in provetta (Ottolenghi et al., 1994).

La maggior parte degli studi condotti su questi due farmaci, si è occupata di valutare gli effetti avversi su parametri classici dell'ecotossicologia quali mortalità, riproduzione ed accrescimento (Huggett et al., 2002; Owen et al., 2009; Winter et al., 2008). Col presente studio si intendono ampliare le conoscenze relative gli effetti avversi dei β -bloccanti sul metabolismo glucidico epatico e le possibili conseguenze sulle risposte fisiologiche mediate dalle catecolamine.

Gli animali utilizzati nello studio erano tutte anguille femmine allo stadio FIII/FIV di argentinizzazione, come dimostrato dal calcolo dell'indice di argentinizzazione (SI; Durif et al., 2005, 2009).

In una prima serie di esperimenti, il glucosio rilasciato dagli epatociti sospesi in colonnine di resina è stato stimolato da tre diverse concentrazioni di ADR (0,01, 0,1 e 1 μ M). Tutte le concentrazioni testate hanno indotto un rilascio significativo di glucosio rispetto ai valori basali,

con una percentuale massima di stimolazione del 400% alla concentrazione più alta testata in accordo con lo studio di Fabbri e collaboratori (2003). L'ADR è l'ormone principale nei pesci che interviene nella risposta allo stress a breve termine definita di combattimento o fuga. L'azione dell'ADR è quello di mobilitare le riserve energetiche (in particolare il glicogeno) attraverso il legame coi recettori adrenergici, al fine di rifornire il cervello e gli altri organi di energia (glucosio), per far fronte alle situazioni di stress (Wendelaar Bonga, 1997). Poiché è stato dimostrato che la concentrazione fisiologica di ADR nei pesci è di 0,01 μM (Wendelaar Bonga, 1997), questa è stata scelta per valutare l'effetto dei due farmaci β -bloccanti sull'azione dell'ormone.

Questi due composti vengono utilizzati per la cura dei disturbi cardiovascolari attraverso l'interazione coi recettori β -adrenergici (β -AR) (Owen et al., 2007; Massarsky et al., 2011). Sono inoltre in grado di indurre l'ipoglicemia (diminuzione dei livelli di glucosio nel sangue) come effetto secondario, antagonizzando l'effetto dell'adrenalina. Gli effetti dei farmaci sono stati testati facendo riferimento al "Fish Plasma Model" (FPM, Huggett et al., 2003a). Questo modello confronta la concentrazione terapeutica umana (HPC_t) con quella misurata/predetta nei pesci (FPC_{ss}), per estrapolare gli effetti indesiderati avversi nei pesci per un dato farmaco, tramite il calcolo di un rapporto di effetto (ER). Secondo il modello, quando la FPC_{ss} è uguale o superiore alla HPC_t ($\text{ER} < 1$), avviene una risposta mediata da un recettore e quindi vi è la possibilità di potenziali effetti a lungo termine.

Sebbene questi due farmaci condividano la stessa farmaco dinamica, presentano notevoli differenze nelle proprietà fisico-chimiche e nella specificità d'azione.

Il PRO è presente nelle acque superficiali alla concentrazione massima di 590 ng/L (Ternes et al., 1998). E' un antagonista non selettivo, in grado di bloccare entrambi i tipi di recettori β (Rang et al., 2003) e presenta un'elevata affinità recettoriale (K_i 0,01 nM) nei pesci così come nei mammiferi (Fabbri et al., 1992). Diversi studi hanno dimostrato gli effetti avversi del PRO sui pesci. Una riduzione significativa si è riscontrata nel numero di uova prodotte da *O. latipes* dopo 4 settimane di esposizione alla concentrazione più alta ambientale (Huggett et al., 2002). Altri effetti si sono osservati sullo sviluppo larvale, la mortalità, il battito cardiaco, il

comportamento e l'alterazione dei processi mediati dalle catecolamine (Huggett et al. 2002, Fraysse et al., 2006; Mitchell e Moon, 2015).

Le concentrazioni di PRO testate (0,7 – 340 µg/L) sono state scelte poiché realmente misurate nel sangue dei pesci dopo esposizione al farmaco a concentrazioni nel range di 1 – 1000 µg/L (Giltrow et al., 2009). Le concentrazioni ematiche rientrano nel range terapeutico umano che per il PRO è di 20 – 300 µg/L (Regenthal 1999). Il confronto con la dose terapeutica sta alla base della “Read – Across Hypothesis” che afferma che un farmaco avrà un effetto farmacologico su un organismo non target, solo se la concentrazione plasmatica del pesce sarà simile a quella che produce un effetto nell'uomo (Huggett et al., 2003a,2003b; Rand-Weaver et al., 2013).

Il rilascio di glucosio indotto da ADR negli epatociti sospesi in colonnine di resina nelle due ore di perfusione, è risultato essere altamente influenzato dal trattamento con PRO a diverse concentrazioni. In particolare, l'inibizione di PRO sull'ADR fisiologica risulta significativa già alla concentrazione di 8 µg/L, in cui si osserva una percentuale di inibizione del 45%. L'inibizione aumenta in maniera altamente significativa alle due concentrazioni più alte testate (- 70% a 93 µg/L e - 80% a 340 µg/L). E' interessante notare come siano state riscontrate alterazioni significative sulla glicogenolisi epatica ad una concentrazione (8 µg/L) che è inferiore rispetto la dose terapeutica umana (20 - 300 µg/L). Questo dato conferma l'elevata sensibilità dei pesci, ed avvalorare il concetto che un farmaco specifico per l'uomo sia in grado di indurre degli effetti su organismi non target che presentino gli stessi bersagli molecolari anche a concentrazioni più basse di quelle efficaci per l'uomo, ponendo quindi un rischio maggiore per i pesci.

L'ATE è presente nelle acque superficiali alla concentrazione massima di 800 ng/L (Santos et al., 2010). E' un antagonista selettivo dei recettori β 1-AR (Huggett et al., 2003b) e nei pesci, presenta un'affinità recettoriale molto più bassa rispetto al PRO (Ki 1 µM; Fabbri et al.2001). Effetti avversi della sostanza si sono riscontrati su parametri quali sopravvivenza ed accrescimento nel ciprinide *P. promelas* alle concentrazioni di 1 e 3,2 mg/L (Winter et al., 2008) e sullo stress ossidativo in *D. rerio* alla concentrazione di 1 mg/L (Diniz et al., 2015). Analogamente, le concentrazioni di ATE (4,2 – 291 µg/L) sono state scelte dallo studio di Winter et al. (2008) in cui queste concentrazioni sono state misurate nel sangue dei pesci dopo

esposizione di 21 giorni a concentrazioni del farmaco nel range di 100 – 10000 µg/L. Anche in questo caso le concentrazioni ricadono all'interno del range terapeutico umano dell'ATE (100 – 1000 µg/L; Regenthal 1999).

Il rilascio di glucosio indotto da ADR negli epatociti sospesi in colonnine di resina nelle due ore di perfusione, è risultato essere leggermente influenzato dal trattamento con ATE a diverse concentrazioni. L'inibizione di ATE sull'ADR fisiologica risulta significativo solamente alle due concentrazioni più alte testate di 109 e 291 µg/L, in cui si osserva una percentuale massima di inibizione del 30%. Da questi esperimenti è emerso che l'ATE è in grado di indurre un effetto sulla glicogenolisi epatica dei pesci solamente alle concentrazioni simili a quelle del range terapeutico umano avvalorando la "Read – Across Hypothesis" (Rand-Weaver et al., 2013).

Confrontando i risultati ottenuti per i due farmaci (Tab. 3.4.1), è emerso che il PRO è risultato essere più efficace rispetto l'ATE nell'alterare la glicogenolisi epatica e nell'inibire l'effetto dell'ormone in condizioni fisiologiche per l'anguilla. Le concentrazioni in grado di indurre alterazioni significative a carico della glicogenolisi sono risultate essere di un ordine di grandezza inferiori per il PRO (8 µg/L) rispetto a quelle dell'ATE (109 µg/L). Questo minor effetto dell'ATE è coerente con lo studio di Küster *et al.* (2010), in cui si conclude che l'ATE pone un rischio accettabile per l'ambiente dopo le analisi effettuate nella fase II prevista dalle linee guida EMEA.

Tabella 3.4.1: Confronto tra propranololo ed atenololo delle proprietà fisico-chimiche, target molecolari, concentrazioni ambientali, umane ed effettive sulla glicogenolisi.

	Propranololo (µg/L)	Atenololo (µg/L)
Acque superficiali	0,01 – 0,6	0,01 – 800
Esposizione 21 giorni (Giltrow et al., 2009; Winter et al., 2008)	1 – 1000	100 – 10000
Plasma pesci (FPC_{ss})	0,7 – 340	4,2 – 291
Concentrazioni attive su glicogenolisi	8, 93, 340	109, 291
Dose terapeutica (HPC_t)	20 – 300	100 – 1000
Rapporto di Effetto (ER)	<1	>1
Log Kow	>3	<1
Target molecolare	β1- β2 – AR	β1 – AR

FPC_{ss}: concentrazione plasmatica nei pesci

ER: rapporto di effetto

HPC_t: dose terapeutica umana

Log Kow: coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua

Nonostante questi composti condividano la stessa farmaco dinamica, presentano target recettoriali diversi ed una diversa affinità recettoriale. Studi di binding recettoriale hanno dimostrato che i β 2-AR sono la classe predominante a livello epatico nei pesci (Dugan et al 2008; Fabbri et al 1992; Nickerson et al 2001) e sono i principali coinvolti nella via del metabolismo glucidico epatico (Fabbri et al., 1998b). Il PRO, bloccando sia i β 1 che i β 2-AR e presentando un'affinità recettoriale maggiore (0,01 nM), ha un effetto più efficace sulla glicogenolisi rispetto all'ATE (selettivo per β 1-AR con un'affinità pari a 1 μ M; Fabbri et al., 2001).

Gli effetti osservati nel nostro studio sono coerenti con i rapporti di effetto (ER) calcolati per questi due farmaci attraverso il modello del FPM. L'ER è risultato essere < 1 per il PRO (Giltrow et al., 2009; Schreiber et al., 2011) e > 1 per l'ATE (Winter et al., 2008), indicando che il primo farmaco ha il potenziale di indurre effetti a lungo termine per i pesci. L'ER è fortemente influenzato dal coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ($\log K_{ow}$, una misura di lipofilia). Tanto più questo è elevato, maggiore sarà la tendenza del composto ad accumularsi nei tessuti. Il PRO ha un $\log K_{ow} > 3$ (Maurer et al., 2007) e tende ad aumentare all'aumentare del pH (Owen et al., 2009), quindi a pH 8.0 tipico degli ambienti marini, la lipofilia aumenta ed il farmaco sarà più soggetto ad essere accumulato nei tessuti (Fabbri e Franzellitti, 2015).

Il grande risultato dello studio è emerso dai dati del PRO, in grado di alterare la glicogenolisi ad una concentrazione inferiore la dose terapeutica umana, ponendo un limite al FPM che afferma che un farmaco indurrà un effetto farmacologico sul pesce solo a concentrazioni uguali o superiori la dose terapeutica umana. E' da sottolineare tuttavia, che le concentrazioni testate sono state riscontrate nel plasma dei pesci dopo esposizione a concentrazioni molto più alte rispetto a quelle ambientali. Ciononostante, nulla vieta che questi effetti possano manifestarsi nel lungo periodo su organismi come i pesci che sono esposti per tutta la durata della loro vita a questo tipo di contaminanti.

In conclusione, il nostro studio sostiene la "Read – Across Hypothesis" ed in parte il FPM come strumenti per la valutazione del rischio ambientale posto dall'inquinamento di farmaci. Tuttavia, per una valutazione ottimale, il FPM andrebbe implementato tenendo in considerazione:

- Il grado di affinità dei farmaci. Più sono affini a specifici target molecolari, maggiore sarà il loro effetto.
- Il grado di lipofilia delle sostanze. Più un farmaco è lipofilo, maggiore sarà la sua tendenza ad accumularsi nei tessuti.
- Le caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente. pH, salinità e temperatura influenzano il destino ed il potenziale di accumulo dei farmaci.
- Il parametro che viene alterato. Un farmaco può non indurre effetti ai livelli alti dell'organizzazione biologica (organismo, popolazione) ma è in grado di alterare i livelli più bassi (attività enzimatiche, vie fisiologiche) che nel lungo periodo potrebbero compromettere l'intero organismo.
- Il tempo di esposizione. I pesci sono esposti ai farmaci continuamente e per tutta la durata della loro vita.
- Le caratteristiche fisiologiche ed ecologiche della specie presa in esame. Un'anguilla è più soggetta ad accumulare contaminanti nel tempo a causa del lungo ciclo biologico e della percentuale di grasso rispetto ai tradizionali pesci utilizzati in laboratorio (es: ciprinidi).

Da queste osservazioni scaturisce l'importanza di cercare di riprodurre studi in laboratorio il più simili a quello che avviene in ambiente, tenendo conto dei punti descritti in precedenza, al fine di ottenere una valutazione del rischio il più veritiera possibile per salvaguardare l'ambiente acquatico e le specie che vi abitano.

3.5 Riferimenti Bibliografici

- Ankley GT, Brooks BW, Huggett DB, Sumpter JP. (2007) Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environ Sci Technol.* 41:8211–8217.
- Bodin N, Tapie N, Le Ménach K, Chassot E, Elie P, Rochard E, Budzinski H. (2014) PCB contamination in fish community from the Gironde Estuary (France): blast from the past. *Chemosphere* 98:66-72.
- Busby ER, Cooper GA and Mommsen TP. (2002) Novel role for prostaglandin E2 in fish hepatocytes: regulation of glucose metabolism. *J Endocrinol.* 174, 137-146.
- Caselli F, Capuzzo A, Piano A, Valbonesi P, Fabbri, E. (2002) G proteins immunodetection and adrenergic transduction pathways in the liver of *Anguilla anguilla*. *Physiol Biochem Zool.* 75:609–616.
- Christen V, Hickmann S, Rechenberg B, Fent K. (2010) Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. *Aquat Toxicol.* 96:167-181.
- de Boer J, van der Valk F, Kerkhoff MA, Hagel P, Brinkman UA. (1994) An 8-Year Study on the Elimination of PCBs and Other Organochlorine Compounds from Eel (*Anguilla anguilla*) under Natural Conditions. *Environ Sci Technol.* 28:2242-2248.
- Diniz MS, Salgado R, Pereira VJ, Carvalho G, Oehmen A, Reis MA, Noronha JP. (2015) Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Total Environ.* 505:282-289.
- Dugan SG, Chen X, Nickerson JG, Montpetit CJ, Moon TW. (2008) Regulation of the black bullhead hepatic beta-adrenoceptors. *Comp Biochem Physiol. B Biochem Mol Biol.* 149:265-274.
- Durif C, Dufour S and Elie P. (2005) The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *J Fish Biol.* 66, 1025-1043.
- Durif C, Guibert A and Elie P. (2009) Morphological discrimination of the silvering stages of the european eel. *American fisheries society symposium* 58, 103-111.
- EELREP (2005) Estimation of the reproduction capacity of European eel. Final report 2005.
- Fabbri E, Brighenti L, Ottolenghi C, Puviani AC, Capuzzo A. (1992) Beta-adrenergic receptors in catfish liver membranes: characterization and coupling to adenylate cyclase. *Gen Comp Endocrinol.* 85:254-260.
- Fabbri E, Buzzi M, Biondi C, Capuzzo A. (1999) Alpha-adrenoceptor-mediated glucose release from perfused catfish hepatocytes. *Life Sci.* 65:27-35.
- Fabbri E, Capuzzo A and Moon TW. (1998b) The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comp Biochem Physiol.* 120C:177-192.
- Fabbri E, Caselli F, Piano A, Sartor G, Capuzzo A. (2003) Cd²⁺ and Hg²⁺ affect glucose release and cAMP-dependent transduction pathway in isolated eel hepatocytes. *Aquat Toxicol.* 62:55–65.
- Fabbri E, Franzellitti S. (2015) Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environ Toxicol Chem.* doi: 10.1002/etc.3131
- Fabbri E, Selva C, Moon TW, Capuzzo A. (2001) Characterization of [3H]CGP 12177 binding to beta-adrenergic receptors in intact eel hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol.* 121:223-231.
- Fabbri E, Chen X, Capuzzo A, Moon TW. (2008) Binding kinetics and sequencing of hepatic alpha1-adrenergic receptors in two marine teleosts, mackerel (*Scomber scombrus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 309:157-165.
- Fent K, Weston AA, Caminada D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 76:122-159.
- Finn J, Hui M, Li V, Lorenzi V, de la Paz N, Cheng SH, Lai-Chan L, Schlenk D. (2012) Effects of propranolol on heart rate and development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 122-123:214-221.
- Fraysse B and Garric J. (2005) Prediction and experimental validation of acute toxicity of beta-blockers in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ Toxicol Chem.* 24:2470-2476.
- Fraysse B, Mons R, Garric J. (2006) Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf.* 63:253-267.
- Fulton TW. (1904) The rate of growth of fishes. 22nd Annual Report of the Fishery Board of Scotland Part III, 141-241.
- Gebhardt R, Hengstler JG, Müller D, Glöckner R, Buenning P, Laube B, Schmelzer E, Ullrich M, Utesch D, Hewitt N, Ringel M, Hilz BR, Bader A, Langsch A, Koose T, Burger HJ, Maas J, Oesch F. (2003) New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev.* 35:145-213.

- Giltrow E, Eccles PD, Winter MJ, McCormack PJ, Rand-Weaver M, Hutchinson TH, Sumpter JP. (2009) Chronic effects assessment and plasma concentrations of the beta-blocker propranolol in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol.* 95:195-202.
- Haywood GP, Isaia J, Maetz J. (1977) Epinephrine effects on branchial water and urea flux in rainbow trout. *Am J Physiol.* 232:R110-115.
- Hengstle JG, Bogdanffy MS, Bolt H M, Oesch F. (2003) Challenging dogma: thresholds for genotoxic carcinogens? The case of vinyl acetate. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43:485–520.
- Hengstler JG, Van der Burg B, Steinber, P, Oesch F. (1999) Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity. *Drug Metab Rev.* 31:917–970.
- Huggett DB, Cook JC, Ericson JF, Williams RT. (2003a) A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Hum Ecol Risk Assess.* 9:1789-1799.
- Huggett DB, Khan IA, Foran CM, Schlenk D. (2003b) Determination of b-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in united states wastewater effluent. *Environ Pollut* 121:199–205.
- Huggett DB, Brooks BW, Peterson B, Foran CM, Schlenk D. (2002) Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Arch Environ Contam Toxicol.* 43:229-235.
- Küster A, Alder AC, Escher BI, Duis K, Fenner K, Garric J, Hutchinson TH, Lapen DR, Péry A, Römbke J, Snape J, Ternes T, Topp E, Wehrhan A, Knacker T. (2010) Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in the European Union: A case study with the β -blocker atenolol. *Integr Environ Assess Manag.* 6:514-523.
- Massarsky A, Trudeau VL, Moon TW. (2011) β -blockers as endocrine disruptors: the potential effects of human β -blockers on aquatic organisms. *J Exp Zool.* A 315:251-265.
- Maurer M, Escher BI, Richle P, Schaffner C, Alder AC. (2007) Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants. *Water Res.* 41:1614-1622.
- Mine T, Kojima I, Ogata E. (1990) Difference in sensitivity to glucagon action in three different rat liver systems. *Metabolism.* 39:321-326.
- Mitchell KM, Moon TW. (2015) Behavioral and biochemical adjustments of the zebrafish *Danio rerio* exposed to the β -blocker propranolol. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* doi:10.1016/j.cbpb.2015.10.009.
- Mommsen TP and Moon TW. (1990) Metabolic response of teleost hepatocytes to glucagon-like peptide and glucagon. *J Endocrinol.* 126:109-118.
- Nickerson JG, Dugan SG, Drouin G, Moon TW. (2001) A putative beta2-adrenoceptor from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular characterization and pharmacology. *Eur J Biochem.* 268:6465-6472.
- Osterod M, Larsen E, Le Page F, Hengstler JG, Van der Horst GT, Boiteux S, Klungland A, Epe B. (2002) A global DNA repair mechanism involving the Cockayne syndrome B (CSB) gene product can prevent the in vivo accumulation of endogenous oxidative DNA base damage. *Oncogene* 28:8232–8239.
- Ottolenghi C, Puviani AC, Fabbri E, Capuzzo A, Brighenti L, Plisetskaya EM. (1994) Hormone responsiveness of isolated catfish hepatocytes in perfusion system is higher than in flasks incubation. *Gen Comp Endocrinol.* 95:52-9.
- Owen SF, Giltrow E, Huggett DB, Hutchinson TH, Saye J, Winter MJ, Sumpter JP. (2007) Comparative physiology, pharmacology and toxicology of beta-blockers: mammals versus fish. *Aquat Toxicol.* 82:145-162.
- Owen SF, Huggett DB, Hutchinson TH, Hetheridge MJ, Kinter LB, Ericson JF, Sumpter JP. (2009) Uptake of propranolol, a cardiovascular pharmaceutical, from water into fish plasma and its effects on growth and organ biometry. *Aquat Toxicol.* 93:217-224.
- Pacheco M, Santos MA. (1997) Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol Environ Saf.* 38: 252–259.
- Pankhurst NW. (1982) Relation of visual changes to the onset of sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of Fish Biology* 21, 127–140.
- Petersen LH, Needham SL, Burlison ML, Overturf MD, Huggett DB. (2013) Involvement of $\beta(3)$ -adrenergic receptors in in vivo cardiovascular regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 164:291-300.
- Rand-Weaver M, Margiotta-Casaluci L, Patel A, Panter GH, Owen SF, Sumpter JP. (2013) The read-across hypothesis and environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Environ Sci Technol.* 47:11384-11395.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. (2003) Pharmacology. (fifth ed.) Elsevier, Churchill Livingstone p.797

- Regenthal R, Krueger M, Koeppel C, Preiss R. (1999) Drug levels: therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs. *J Clin Monit Comput.* 15:529-244.
- Ringel M, Oesch F, Bader A, Gerl M, Klebach M, Quint M, Tanner B, Dillenburg W, Bo'ttger T, Hengstler JG (2002). Permissive and suppressive effects of dexamethasone on enzyme induction in hepatocyte cultures. *Xenobiotica* 32:653–666.
- Santos LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MC. (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater.* 175:45-95.
- Schreiber R, Gündel U, Franz S, Küster A, Rechenberg B, Altenburger R. (2011) Using the fish plasma model for comparative hazard identification for pharmaceuticals in the environment by extrapolation from human therapeutic data. *Regul Toxicol Pharmacol.* 61:261-275.
- Ternes TA, Bonerz M, Schmidt T. (2001) Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journ of Chrom.* 938:175-185.
- Ternes TA. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32:3245-3260.
- Versonnen BJ, Goemans G, Belpaire C, Janssen CR. (2004) Vitellogenin content in European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium. *Environ Pollut.* 128:363-371.
- Wendelaar Bonga SE. (1977) The stress response in fish. *Physiol Rev.* 77:591-625.
- Winter MJ, Lillicrap AD, Caunter JE, Schaffner C, Alder AC, Ramil M, Ternes TA, Giltrow E, Sumpter JP, Hutchinson TH. (2008) Defining the chronic impacts of atenolol on embryo-larval development and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol.* 86:361-369.
- Zikopoulos B, Dermon CR. (2005) Comparative anatomy of alpha(2) and beta adrenoceptors in the adult and developing brain of the marine teleost the red porgy (*Pagrus pagrus*, Sparidae): [(3)H]clonidine and [(3)H]dihydroalprenolol quantitative autoradiography and receptor subtypes immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 489:217-240.

4. Valutazione degli effetti della caffeina sul mitilo mediterraneo attraverso una batteria di biomarker



Glossario

AChE	acetilcolinesterasi
CAF	caffeina
CAT	catalasi
GST	glutathione-s-transferasi
LIF	lipofuscine
LIS/CIT	rapporto lisosoma/citoplasma
LMS	stabilità membrane lisosomiali
LN	lipidi neutri
MDA	malondialdeide
NRRA	neutral red retention assay
NRRT	neutral red retention time

4.1 Introduzione

La caffeina (CAF) è da sempre lo stimolante più conosciuto ed utilizzato dall'uomo (Lawrence et al., 2005) con un consumo medio globale pari a 70 mg/persona/di' pari a 460.000 kg di caffeina al giorno (Buerge et al., 2003). Questa molecola è un alcaloide naturale presente in una sessantina di erbe e piante (guaranà, mate e cola), nei semi di caffè e cacao, nelle foglie di tè e nel cioccolato (Barone and Roberts, 1996). La maggior parte della caffeina presente in ambiente è consumata attraverso il caffè, il tè ed altre bevande (Frary et al., 2005), mentre una parte minore viene utilizzata in ambito medico come ingrediente principale di una grande varietà di farmaci per curare problemi cardiaci, cerebrali, respiratori ed urinari (Buerge et al., 2003).

Solo il 3% del consumo totale di caffeina viene escreto immodificato attraverso le urine (Tang-Liu et al., 1982) raggiungendo così i depuratori in cui si è visto possa accumularvisi fino a 147 µg/L (Ternes et al., 2001). Rispetto ad altri farmaci è considerato un composto altamente degradabile, con un tasso di rimozione pari a più del 95% negli impianti di trattamento delle acque reflue (WWTPs) (Deblonde et al., 2011; Jacobs et al., 2012; Kosma et al., 2014), presentando in ambiente acquatico un'emivita di circa 1,5 giorni (Lam et al., 2004).

Tuttavia, essendo continuamente rilasciata da diverse fonti antropogeniche, è considerata uno dei composti più presenti e pseudo-persistenti dei corpi idrici (Fernandez et al., 2010; Silva et al., 2014) tanto da essere considerata un tracciante molecolare ideale di contaminazione degli ecosistemi acquatici (Buerge et al., 2003; Metcalfe et al., 2003). Come riportato in tabella 4.1.1, le concentrazioni ambientali di caffeina sono comprese nel range da 2 – 1600 ng/L, con valori più alti misurati negli estuari e nelle acque costiere.

La caffeina induce i suoi effetti stimolanti nell'uomo attraverso un meccanismo di trasduzione del segnale AMPc dipendente (principale secondo messaggero che regola molteplici risposte cellulari e fisiologiche), antagonizzando i recettori adenosinici. Sebbene finora nessuno studio ha mostrato la presenza di questi recettori nei molluschi, la sostanza potrebbe essere in grado di indurre comunque effetti tossici od avversi inattesi su specie non target come i mitili.

La maggior parte dei dati ecotossicologici disponibili sugli effetti della caffeina si riferiscono a studi condotti su organismi di acqua dolce (Moore et al., 2008; Chen et al., 2008; Park et al., 2005), mentre gli effetti sugli organismi marini sono stati raramente investigati (Calleja et al., 1994; Sawyer e Muscatine 2001). Alcuni studi hanno visto che concentrazioni ambientali di caffeina hanno indotto modifiche nel comportamento dei girini della rana leopardo (*Rana pipiens*) (Fraker and Smith 2004) e perossidazione lipidica negli epatociti di trota (*Oncorhynchus mykiss*) dopo 48 ore di esposizione (Gagne' et al., 2006). Nel complesso, gli studi condotti hanno concluso che la caffeina pone un rischio minore per le specie acquatiche poiché le concentrazioni in grado di alterare la sopravvivenza, la crescita e/o la riproduzione degli organismi risultano essere molto più elevate rispetto a quelle ambientali (Moore et al., 2008). Tuttavia questo contaminante, come tanti altri, può indurre dei cambiamenti nei vari livelli dell'organizzazione biologica e tali cambiamenti possono svilupparsi soprattutto in seguito ad un'esposizione cronica (Hyne and Maher 2003).

E' noto infatti che gli effetti indotti dai contaminanti ambientali nei livelli alti dell'organizzazione sono preceduti da alterazioni che avvengono a livelli più bassi dell'organizzazione biologica (cellula, tessuto, organo), predisponendo gli animali ad essere più vulnerabili verso altri fattori di stress (Sedeño-Diaz and Lopez-Lopez, 2013). Per tale motivo, data la notevole persistenza in ambiente acquatico, è assolutamente necessario estendere gli studi al conoscenza degli effetti cronici o sub-cronici su organismi non target come quelli acquatici, al fine di delineare i rischi ecologici ad essi connessi e definire una gestione sostenibile delle risorse tramite interventi normativi adeguati (Wennmalm et al., 2010).

L'utilizzo di biomarker di stress ambientale, al fine di prevedere effetti ecologici rilevanti da parte di farmaci ambientali, è stato proposto da diversi autori (Franzellitti et al., 2011; Gonzalez-Rey and Bebianno 2014). I biomarker sono tutte quelle variazioni (molecolari, cellulari o fisiologiche) misurabili in organismi modello in risposta a contaminanti ambientali o a fattori di stress (Moore et al., 2006). La misurazione di questi parametri è molto importante nella valutazione dell'inquinamento acquatico in quanto costituiscono delle risposte sensibili e precoci riguardo gli effetti sub-letali dei contaminanti prima che si presentino delle alterazioni irreversibili (ICES 2011; UNEP MED-POL 2006; Viarengo et al., 2007).

L'obiettivo dello studio è stato quello di esaminare gli effetti sub-letali indotti da un'esposizione sub-cronica a concentrazioni ambientali di caffeina sul mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) attraverso una batteria di biomarker.

Sono stati valutati gli effetti sullo stato di salute generale della specie tramite: stabilità delle membrane lisosomiali (LMS) negli emociti, contenuto di lipofuscine (LIF), contenuto di lipidi neutri (LN) e rapporto volume lisosoma/citoplasma (LIS/CIT). Lo stress ossidativo e la risposta detossificante sono stati valutati attraverso l'analisi dell'attività degli enzimi catalasi (CAT) e glutatione-S-transferasi (GST) e tramite la formazione nei tessuti di malondialdeide (MDA). Infine le alterazioni neuro e genotossiche sono state valutate tramite l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE) e danno primario al DNA.

I risultati ottenuti sono stati confrontati con studi precedenti svolti nel nostro laboratorio (Martin-Diaz et al, 2009; Franzellitti et al., 2011; Franzellitti et al., 2014) testando altri composti farmaceutici nelle stesse condizioni sperimentali, al fine di fornire informazioni utili per una valutazione più approfondita riguardo la tossicità della caffeina negli ambienti marino-costieri.

Tab. 4.1.1: Concentrazioni di caffeina in diversi compartimenti acquatici

Comparto acquatico	[CAF] (ng/L)	Referenza
WWTPs effluenti	30 - 95000	Poiger et al., 2003
	1771	Deblonde et al., 2011
Acque dolci	28 – 9480	Buerge et al., 2003
	<2 – 250	Buerge et al., 2003
	<10 – 373	Choi et al., 2008
	8 – 440	Pereira et al., 1995
Estuari	11 – 152	Rodriguez Del Rey et al., 2012
	37 – 738	Fernandez-Gomez et al., 2013
	22 – 41	Gardinali and Zhao 2002
Porti	1600	Siegner and Chen 2002
	44 – 87	Weigel et al., 2004
Acque costiere	5,7 – 52	Sing et al., 2010
	120 – 1400	Comeau et al., 2008
	9 – 45	Rodriguez Del Rey et al., 2012
	17 – 87	Weigel et al., 2004
Mare aperto	2 – 16	Weigel et al., 2001 , 2002
	ND – 29	Singh et al., 2010

4.2 Materiali e Metodi

Animali e Condizioni sperimentali

Mitili della specie *Mytilus galloprovincialis* sono stati raccolti lungo la costa adriatica dalla Cooperativa Copr.al.mo (Cesenatico, Italia) e trasferiti in laboratorio in vasche contenenti acqua di mare areata. Gli animali sono stati selezionati in base alla taglia (5-6 cm) e fatti acclimatare per 3 giorni negli acquari (30 individui per acquario) contenenti 60 L di acqua marina a 16°C, con fotoperiodo naturale e alimentati una volta al giorno con un mangime per organismi filtratori (Coral Diet Filtrator, Xaqua, Italia) dopo il cambio d'acqua. Quindici animali sono stati campionati per valutare i parametri all'inizio dell'esperimento (tempo zero).

Disegno sperimentale

I mitili sono stati suddivisi in gruppi di 20 individui e trasferiti in vasche (644 x 37,5 x 19 cm) contenenti 20 L di acqua. Ogni condizione sperimentale è stata replicata 3 volte. Gli animali sono stati esposti per 7 giorni a 5, 50 e 500 ng/L di caffeina (1,3,7-Trimethylxanthine), ottenuta da Sigma-Aldrich. Le concentrazioni nominali sono state scelte sulla base del range ambientale della sostanza. Il farmaco è stato somministrato ogni giorno dopo il cambio d'acqua. Non sono stati usati solventi organici in quanto la CAF ha una solubilità in acqua di 15 mg/mL. In parallelo ai trattamenti, è stato eseguito anche un gruppo di controllo non esposto alla sostanza. Alla fine del periodo di esposizione, l'emolinfa è stata campionata dal muscolo adduttore di ogni mitilo. Le branchie e le ghiandole digestive sono state sezionate e congelate immediatamente in azoto liquido e conservate a -80°C per le successive analisi. Non è stata registrata mortalità durante il periodo di esposizione. I mitili al tempo zero (T0) sono stati immediatamente analizzati per i biomarker per valutare il loro stato iniziale di salute, i risultati non hanno mostrato differenze significative dai mitili esposti alla condizione di controllo (dati non mostrati). I replicati sono stati stabiliti considerando i tre acquari come livello di replicazione. Per la valutazione delle attività enzimatiche catalasi (CAT), glutatione-s-transferasi (GST), acetilcolinesterasi (AChE) ed il contenuto di malondialdeide (MDA), ogni replicato era costituito da un pool di tessuti (branchie e/o ghiandola digestiva) di 2 mitili per acquario (N = 3). La valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali (LMS) negli emociti è stata effettuata su 4 individui per acquario per ogni

condizione sperimentale. Il danno al DNA è stato valutato su un pool di 3 individui per vasca mentre i parametri lisosomiali sono stati misurati su un chuck per acquario (3 chucks per ogni trattamento sperimentale), ognuno di essi contenente 4 ghiandole digestive da 4 individui scelti in maniera random.

Stabilità delle membrane lisosomiali (LMS)

LMS è stata valutata negli emociti di mitilo utilizzando il metodo del neutral red retention assay (NRRRA) come riportato in dettaglio da Martinez-Gomes *et al.* (2008). LMS è stata valutata come il tempo di destabilizzazione che rappresenta il tempo in cui più del 50% dei lisosomi rilasciano il colorante nel citosol. Per ogni trattamento, i dati sono espressi come la percentuale di variazione \pm ES rispetto al controllo.

Parametri lisosomiali misurati nella ghiandola digestiva

Per valutare il rapporto volume lisosomi/citoplasma (LIS/CIT) ed il contenuto lisosomiale di lipidi neutri (LN) e lipofuscine (LIF), le ghiandole digestive sono state sezionate da 4 individui per acquario. Dopo la dissezione, le ghiandole sono state poste su un supporto in alluminio (chuck), congelate in esano a -70 °C e rapidamente trasportate a -80 °C. Per le analisi, le procedure sono state effettuate in accordo con gli standard UNEP/RAMOGGE (1999). Brevemente, sono state effettuate sezioni di ghiandola digestiva dello spessore di $10 \mu\text{m}$ utilizzando un criostato (MICROM HM 505 N) alla temperatura di -30 °C e trasferite su vetrini per microscopia.

Per l'analisi quantitativa dei LN è stato utilizzato un metodo citochimico che prevede la loro colorazione selettiva all'interno dei tubuli digestivi. Le sezioni di ghiandola sono state fissate in Ca-formolo per 15 min. a 4 °C, risciacquati con acqua distillata e trasferite in trietilfosfato al 60% per 3 min. Successivamente sono state colorate con Oil red all' 1% per 15 min. al buio a temperatura ambiente. Il colorante è stato fissato con trietilfosfato al 60% a 4 °C per 30 s, al termine dei quali i vetrini sono stati risciacquati con acqua distillata e fissati con glicerina.

L'accumulo di LIF è stato analizzato con un metodo citochimico grazie alla colorazione di sezioni trasversali mediante reattivo di Schmorl (Pearse, 1972). Le sezioni sono state fissate in Ca-formolo per 15 min. a 4 °C, risciacquate ed immerse nel mezzo di reazione contenente una soluzione acquosa di cloruro di ferro all'1% e potassio ferrocianato all'1% a temperatura

ambiente per 5 min., sciacquate in acido acetico all'1% e risciacquate con acqua prima di essere fissate con gel di glicerina. Per il rapporto LIS/CIT, le sezioni sono state colorate con N-acetil- β -esosaminidasi, un'idrolasi acida lisosomiale coinvolta nel processo di degradazione e digestione a cui i lisosomi sono deputati (Franzellitti et al., 2014). Le sezioni di ghiandola digestiva sono state trasferite in una soluzione di incubazione contenente naftolo (AS-BI N-acetyl- β -D-glucosaminide) 0,04% e Polysep 7% in tampone citrato 0,1 M (pH 4,5) tenuta in agitazione per 20 min. a 37°C. Le sezioni sono state fissate con NaCl 3% a temperatura ambiente e lasciate immerse in una soluzione satura di Fast Violet B in tampone fosfato 0,1M (pH 7.4) per 10 min. in condizioni di scarsa o assente illuminazione. Infine i vetrini sono stati lavati per 5 min. sotto acqua corrente e fissati con gel di glicerina. Le sezioni di tessuto sono state quantitativamente valutate per ogni biomarker citochimico attraverso un microscopio (Axioskop 40, Carl Zeiss, Milano, Italia) all'ingrandimento 40X equipaggiato con una fotocamera digitale (AxioCam MRc, Carl Zeiss, Milano, Italia). Per ognuna delle 4 sezioni di ghiandola digestiva appartenenti allo stesso vetrino sono state analizzate 4 diverse immagini attraverso il software per analisi di immagine Scion Image 4.0.2 (Scion Corporation Frederick, MD, USA) e i risultati sono stati espressi come variazione percentuale rispetto al controllo.

Attività degli enzimi antiossidanti glutatione-s-transferasi (GST) e catalasi (CAT)

I tessuti di branchia o ghiandola digestiva (circa 100 mg) sono stati omogenati in tampone potassio-fosfato 50mM (KPB), pH 7.0, contenente Na₂EDTA 0,5mM seguendo il protocollo di Mimeault *et al.* (2006). Il contenuto di proteine totali è stato valutato attraverso il metodo messo a punto da Lowry (1951). L'attività enzimatica è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro modello DU800 (Beckman) a 25°C. L'attività della glutatione-s-transferasi (GST) è stata determinata misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm data dalla coniugazione dell'1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) con il glutatione ridotto (GSH). L'attività finale è espressa come nmol/min/mg di proteina. L'attività della catalasi (CAT) è stata determinata misurando la diminuzione di assorbanza a 240 nm dovuta al consumo di perossido di idrogeno (55 mM H₂O₂ in 50 mM KPB a pH 7,0). L'attività finale è espressa come μ mol/min/mg di proteina.

Attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE)

L'attività di AChE è stata determinata nelle branchie seguendo il metodo di Ellman *et al.* (1961). Circa 100 mg di tessuto sono stati omogenati in tampone fosfato 0,1 M a pH 7.4 ed incubati a 25°C in presenza di tampone fosfato 100 mM, acetiltiocolina 0,5 mM e acido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB). L'attività enzimatica è stata quantificata spettrofotometricamente a 405 nm seguendo la reazione per 10 min. I risultati sono stati espressi come nmol/min/mg proteina.

Formazione di malondialdeide (MDA)

Il contenuto di MDA è stato analizzato secondo il protocollo introdotto da Banni *et al.* (2007) con lievi modifiche. Circa 1 g di ghiandola digestiva è stata omogenata con Tris-HCl 20 mM a pH 7.4 contenente β -mercaptoetanololo allo 0.1%. Il campione è stato poi incubato per 40 min. a 45°C in una soluzione contenente metanolo/1-metil-2-fenilindole in acetonitrile 5 mM e HCl al 6%. L'assorbanza è stata letta spettrofotometricamente a 586 nm utilizzando una curva di calibrazione di standard di TMOP (1,1,3,3,tetrametossipropano). Il risultato finale è stato espresso in nmol/mg proteine (Martin-Diaz *et al.*, 2009).

Danno al DNA

I livelli primari di danno al DNA sono stati valutati seguendo il protocollo descritto da Olive (1988). Il metodo si basa sulla precipitazione alcalina delle proteine in presenza del detergente SDS, lasciando il DNA danneggiato nel sovrantante. La determinazione della quantità di DNA danneggiato è stata effettuata usando una curva standard con campioni di DNA a concentrazioni note. Il DNA è rilevato mediante l'utilizzo dell'agente intercalante Hoechst (substrato) e lettura in fluorescenza (fluorimetro Jasco FP-6200) alla lunghezza d'onda di eccitazione di 360 nm e di emissione di 450 nm. I risultati sono espressi in μ g DNA/mg di proteine.

Analisi statistica

Per tutti i parametri testati, i dati sono stati analizzati utilizzando il software statistico SigmaStat 12.0. Le differenze significative tra i trattamenti e il controllo sono state determinate usando ANOVA ad una via seguita dal test di Bonferroni usato come test *post hoc*. Le differenze

significative si sono riscontrate con $p < 0,05$. La correlazione tra coppie dei differenti biomarker è stata effettuata mediante il test di Pearson includendo le concentrazioni di CAF. Le differenze significative si sono riscontrate con $p < 0,05$.

4.3 Risultati

Stabilità delle membrane lisosomiali (LMS)

L'effetto della CAF sulle membrane lisosomiali degli emociti di mitilo dopo una settimana di esposizione è mostrata in Fig. 4.3.1. Il tempo di ritenzione del colorante Neutral Red (NRRT) è di circa 140 min. negli animali di controllo. Diminuisce a circa 75 min. (- 47%) alla concentrazione di 5 e 50 ng/L e si riduce in maniera significativa a 40 min. (- 70%) alla concentrazione più alta testata di 500 ng/L.

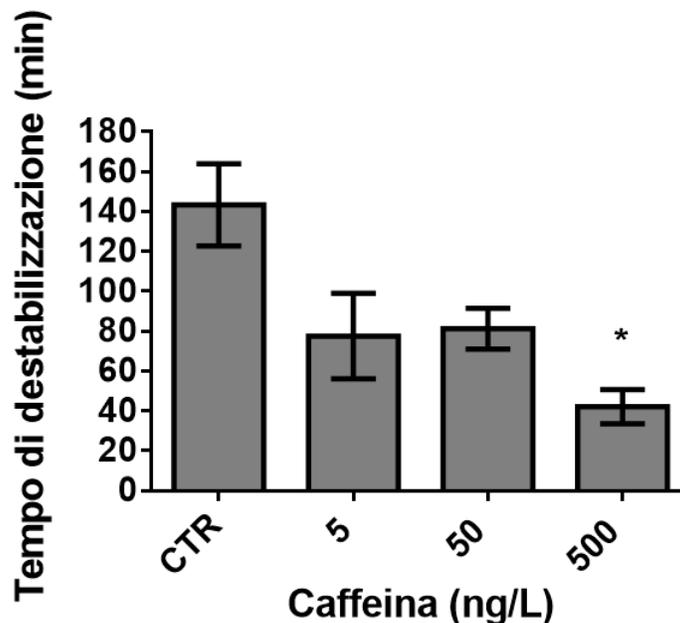


FIG.4.3.1: LMS valutata tramite NRRA in emociti di mitilo dopo 7 giorni di esposizione a concentrazioni ambientali di CAF. Asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo: *p < 0,05.

Parametri lisosomiali misurati nella ghiandola digestiva

Il contenuto di lipidi neutri (LN), lipofuscine (LIF) ed il rapporto volume lisosomi/citoplasma (LIS/CIT) è mostrato in Fig.4.3.2. Dopo 7 giorni di esposizione si osserva un aumento significativo del 20% rispetto al controllo nel contenuto di LN (Fig. 4.3.2A) alla concentrazione più alta di 500 ng/L. Il contenuto di LIF (Fig. 4.3.2B) tende a diminuire leggermente alle concentrazioni di 5 e 500 ng/L e ad aumentare lievemente alla concentrazione di 50 ng/L anche

se non in modo significativo. Il rapporto volume LIS/CIT (Fig. 4.3.2C) non ha mostrato differenze significative rispetto al controllo.

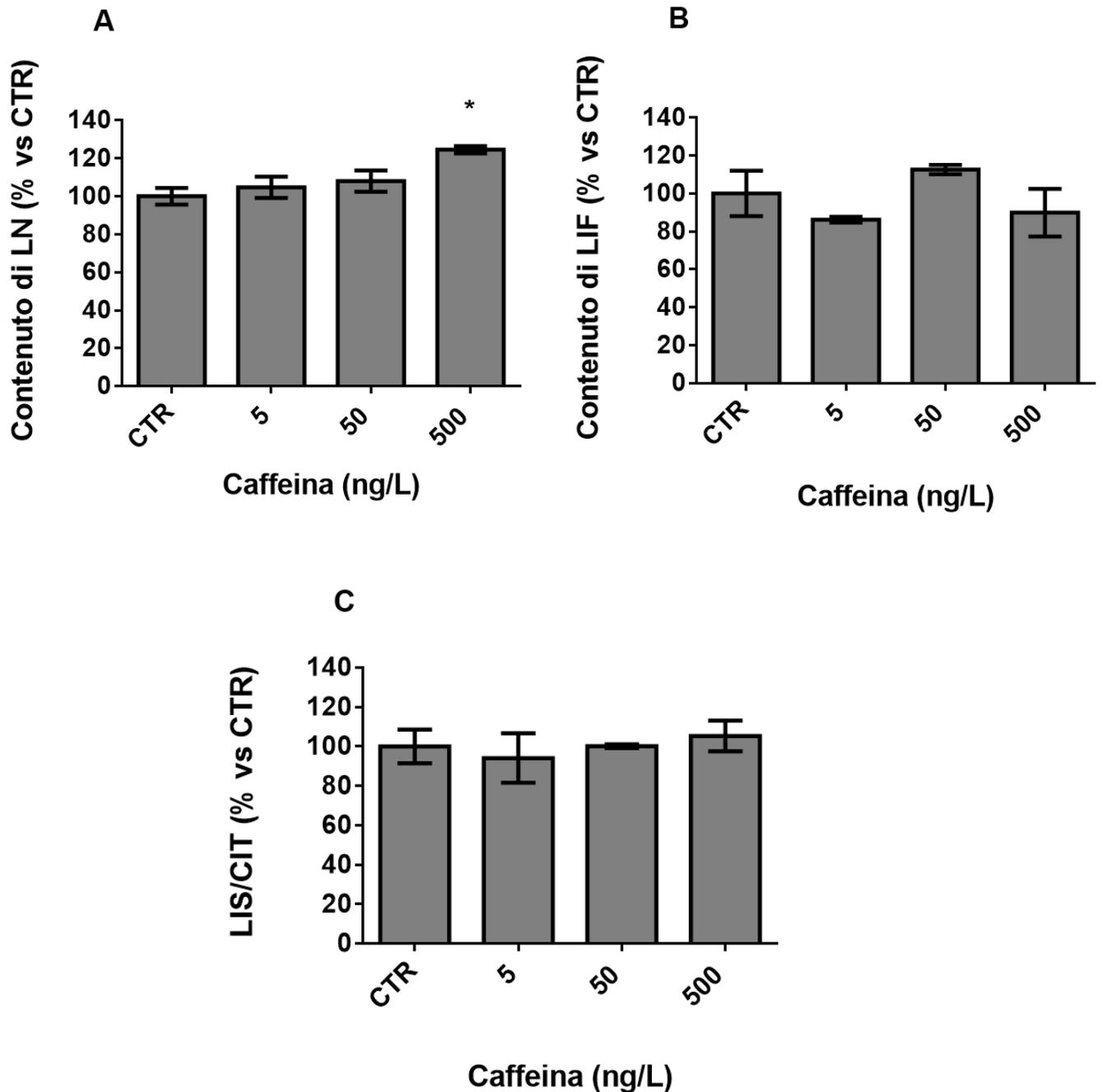


FIG.4.3.2: Accumulo di LN (A), LIF (B) e rapporto volume LIS/CIT (C) valutati nella ghiandola digestiva di mitilo dopo 7 giorni di esposizione a concentrazioni ambientali di CAF. I risultati sono espressi come la media \pm ES della percentuale di variazione rispetto al controllo. Asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo: * $p < 0,05$.

Attività degli enzimi antiossidanti glutatione-S-transferasi (GST) e catalasi (CAT)

L'attività degli enzimi antiossidanti GST e CAT, misurata sia nella ghiandola digestiva che nelle branchie, è mostrata in Fig. 4.3.3. L'attività basale di GST (Fig. 4.3.3A) è risultata molto più alta (circa 3,5 volte) nelle branchie rispetto alla ghiandola digestiva. L'esposizione a CAF non ha mostrato differenze significative rispetto al controllo nell'attività di GST nelle branchie. Differenze significative si sono riscontrate nella ghiandola digestiva alle concentrazioni di 5 e 500 ng/L in cui si è osservato un incremento dell'attività dell'enzima. Nessuna differenza significativa è stata osservata alla concentrazione intermedia di 50 ng/L. L'attività di CAT (Fig. 4.3.3B) non ha mostrato differenze significative né nelle branchie né nella ghiandola digestiva. Si osserva una differenza nei livelli basali tra i due tessuti in cui l'attività di CAT nella ghiandola digestiva è leggermente più alta (1,5 volte) rispetto a quella nelle branchie.

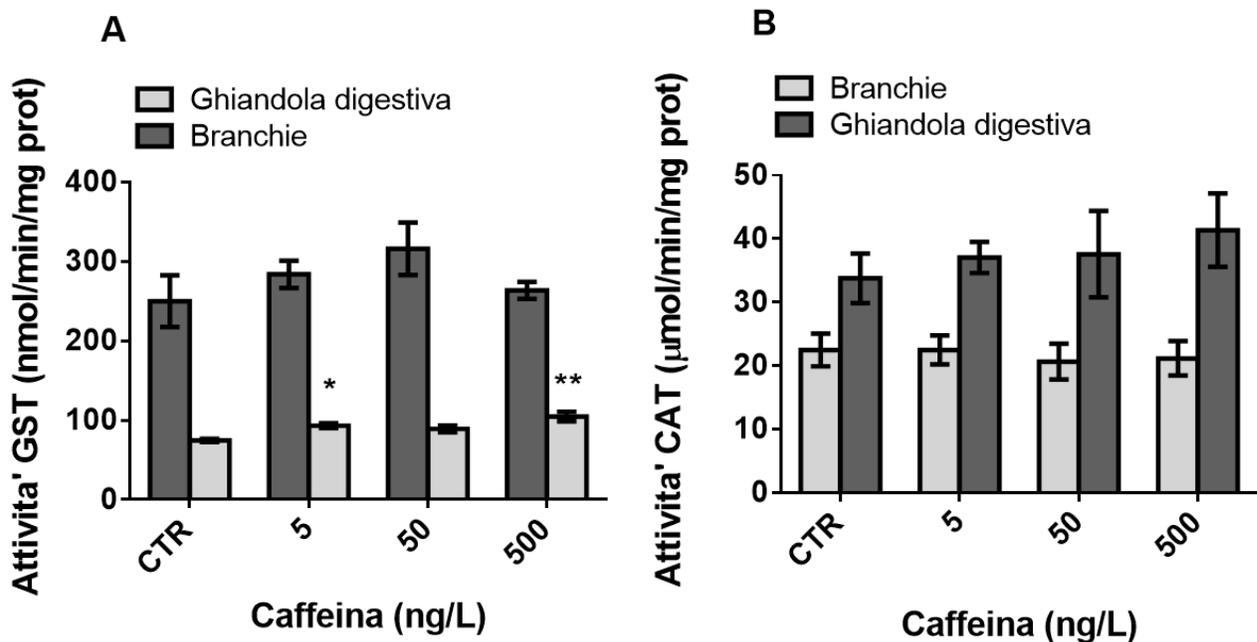


FIG.4.3.3: Attività di GST (A) e CAT (B) in ghiandola digestiva e branchie di mitilo dopo 7 giorni di esposizione a concentrazioni ambientali di CAF. I dati sono espressi come la media \pm ES. Asterischi indicano differenze significative rispetto al controllo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE)

L'attività dell'enzima AChE è mostrata in Fig. 4.3.4. L'attività espressa come % rispetto al controllo, non ha mostrato differenze significative alle concentrazioni di CAF testate. Tuttavia si osserva un leggero aumento dell'attività all'aumentare della concentrazione.

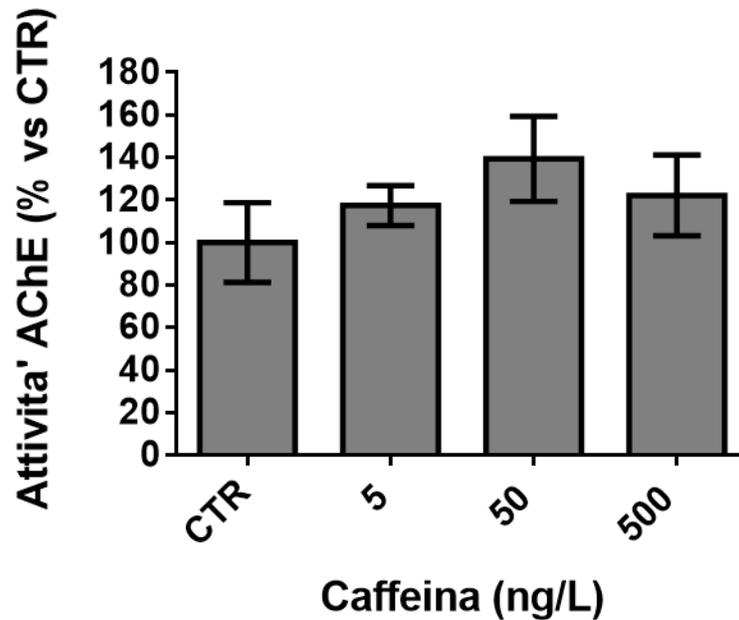


FIG.4.3.4: Attività di AChE in branchie di mitilo dopo 7 giorni di esposizione a concentrazioni ambientali di CAF. I risultati sono espressi come la media \pm ES della percentuale di variazione rispetto al controllo.

Formazione di malondialdeide (MDA)

La perossidazione lipidica valutata nella ghiandola digestiva come contenuto di MDA (Fig. 4.3.5), segue un andamento a campana, non mostrando effetti significativi rispetto al controllo a nessuna delle concentrazioni di CAF testate.

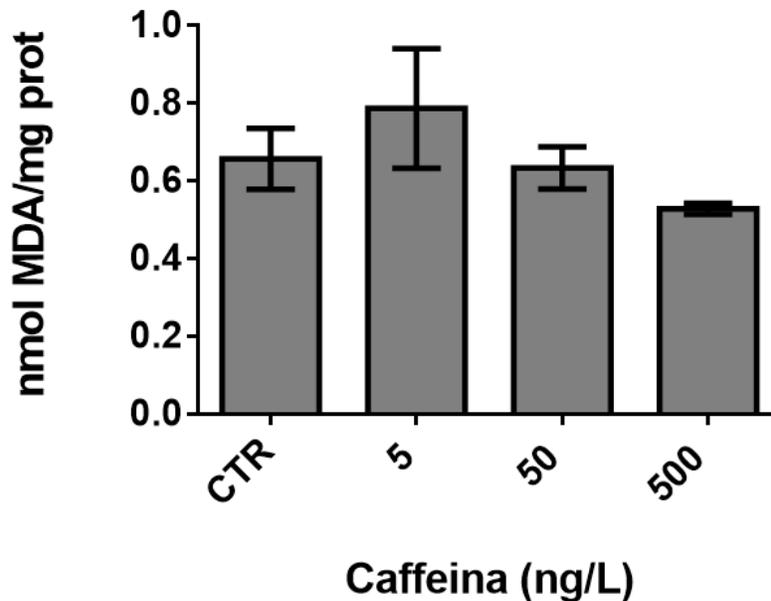


FIG.4.3.5: Livelli di perossidazione lipidica misurati tramite contenuto di MDA nella ghiandola digestiva di mitilo dopo 7 giorni di esposizione a concentrazioni ambientali di CAF. I risultati sono espressi come nmol di MDA/mg di proteine (media ± ES).

Danno al DNA

La determinazione della quantità di DNA danneggiato è presentata in Fig.4.3.6. La quantità di DNA danneggiato, rilevato tramite il colorante di Hoechst, non ha mostrato differenze significative rispetto al controllo a nessuna delle concentrazioni di CAF testate. Tuttavia si osserva una leggera anche se non significativa diminuzione dopo il trattamento di 5 e 50 ng/L, seguito da un debole aumento a 500 ng/L.

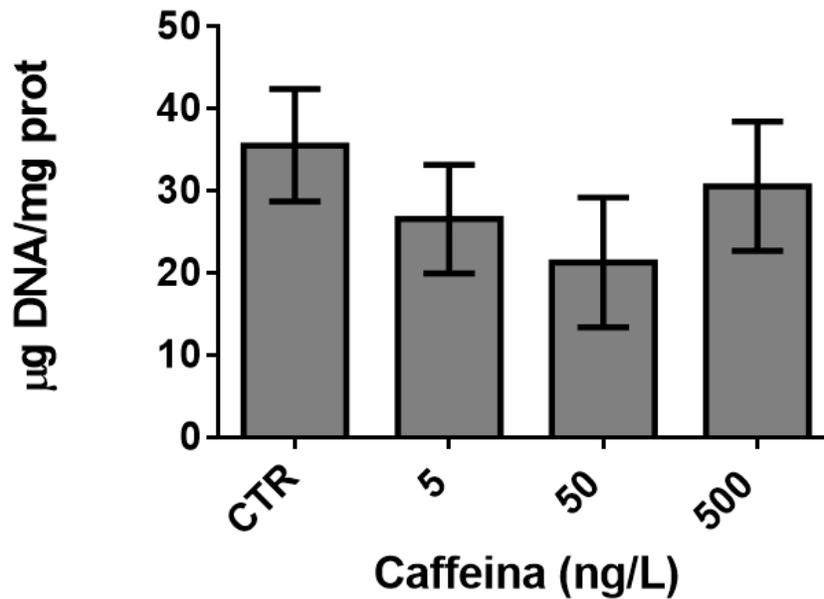


FIG.4.3.6: Livelli di danno al DNA valutati nella ghiandola digestiva di mitilo dopo 7 giorni di esposizione a concentrazioni ambientali di CAF. I risultati sono espressi come μg di DNA danneggiato/mg di proteina (media \pm ES).

Correlazione dei dati

La correlazione a coppie di dati è stata effettuata tramite la correlazione di Pearson utilizzando le concentrazioni di CAF e i dati dei biomarker nella ghiandola digestiva e/o nelle branchie. I risultati relativi al NRRR negli emociti sono stati inclusi poiché è dimostrato che questo parametro è fortemente correlato allo stato di salute generale dell'animale. Nella ghiandola digestiva (Tab. 4.3.1A), i livelli di LN mostrano una correlazione positiva con l'aumentare della concentrazione di CAF e con l'attività di CAT ($p < 0,05$). Altamente significativa ($p < 0,01$) è risultata essere la correlazione negativa tra LIS/CIT e il contenuto di MDA. Nello stesso tessuto è stata osservata una correlazione positiva ($p < 0,05$) tra l'attività di CAT e GST, quest'ultima correlata negativamente ($p < 0,01$) con LMS misurata negli emociti (NRRR). Nelle branchie (Tab. 4.3.1B) non sono state riscontrate correlazioni significative tra i parametri analizzati.

TAB. 4.3.1: Coefficiente di correlazione di Pearson tra i biomarker misurati in ghiandola digestiva (A) e branchie (B) di mitilo dopo 7 giorni di esposizione a concentrazioni ambientali di CAF.

A) Ghiandola digestiva

	NRRA	LN	LIF	LIS-CYT	MDA	GST	CAT	DNA dan.
[CAF]	-0,731	0,973*	-0,339	0,811	-0,801	0,786	0,870	0,152
NRRA		-0,859	0,343	-0,317	0,345	-0,99**	-0,968*	0,471
LN			-0,283	0,736	-0,743	0,888	0,958*	-0,079
LIF				0,176	-0,227	-0,452	-0,294	-0,397
LIS-CYT					-0,997**	0,346	0,541	0,256
MDA						-0,363	-0,561	-0,183
GST							0,972*	-0,345
CAT								-0,320
DNA dan.								

B) Branchie

	NRRA	AChE	GST	CAT
[CAF]	-0,731	0,187	-0,262	-0,460
NRRA		-0,635	-0,325	0,551
AChE			0,897	-0,861
GST				-0,614
CAT				

[CAF], concentrazioni di caffeina

AChE, acetilcolinesterasi

MDA, malondialdeide

NRRA, neutral red retention assay

LIF, lipofuscine

DNA dan., danno primario al DNA

GST, glutatione-s-transferasi

LN, lipidi neutri

*p < 0,05 secondo il test di Pearson

LIS/CIT, rapporto volume lisosoma/citoplasma

CAT, catalasi

** p < 0,01 secondo il test di Pearson

4.4 Discussione e Conclusioni

M. galloprovincialis è una specie bioindicatrice ottimale per valutare la tossicità dei contaminanti presenti nell'ambiente acquatico. I bivalvi infatti, filtrando grandi volumi di acqua, sono in grado di incorporare i composti organici in essa disciolti (Gagné et al., 2004). Questa specie è stata utilizzata come organismo modello per valutare gli effetti sub-letali indotti da un'esposizione sub-cronica di 7 giorni a concentrazioni ambientali di CAF, lo stimolante psicoattivo più utilizzato al mondo (Fent et al., 2006; Lawrence et al., 2005) e più presente in ambiente (Nikolau et al., 2007). Data l'elevata presenza nell'ambiente acquatico, numerosi studi hanno dimostrato alterazioni a carico dell'organizzazione biologica in diverse specie acquatiche. L'esposizione di un'ora a CAF è in grado di alterare lo sviluppo larvale del riccio *P. lividus* (Aguirre-Martínez et al., 2015); indurre stress ossidativo nella vongola *R. philippinarum* e nel granchio *C. maenas* dopo rispettivamente 35 e 28 giorni di esposizione (Aguirre-Martínez et al., 2013a; Aguirre-Martínez et al., 2013b); ed alterare l'espressione delle heat shock protein (HSP) nel mitilo *M. californianus* dopo 30 giorni di esposizione (del Rey et al., 2011).

Le possibili alterazioni dopo esposizione alla CAF sono state valutate utilizzando un'ampia batteria di biomarker di stress ambientale, precedentemente dimostratisi adatti per rilevare l'alterazione dello stato di salute generale dei mitili esposti a residui farmaceutici (Fabbri e Franzellitti, 2015). In particolare è stato valutato lo stato di salute generale dei mitili (LMS), lo stress ossidativo (LN, LIF, LIS/CIT, GST, CAT, MDA) e lo stress neuro (AChE) e genotossico (danno primario al DNA).

La stabilità delle membrane lisosomiali (LMS) negli emociti valutata tramite il NRRA (*Neutral Red Retention Assay*) è considerato un biomarker altamente sensibile che fornisce risposte precoci circa lo stato di salute degli animali (Martínez-Gómez et al., 2008; Viarengo et al., 2007), e permette di valutare lo stress generale degli organismi esposti ai contaminanti. Utilizzando i valori soglia proposti da Moore *et al.*, (2006a) per il tempo di ritenzione del colorante (*Neutral red retention time*, NRRT) è possibile definire lo stato di salute dei mitili come segue: in buono stato se NRRT \geq 120 min.; stressati ma in grado di compensare se NRRT < 120 ma \geq 50 min.; altamente stressati se NRRT < 50 min. I mitili di controllo presentavano un

buon stato di salute (NRRT > 120 min.), mentre l'esposizione a CAF ha dimostrato una riduzione significativa del 70 % rispetto al controllo alla concentrazione più alta testata (500 ng/L) con un tempo di destabilizzazione delle membrane di 42 ± 8 min. suggerendo una situazione di stress per gli animali al limite della compensazione già alle concentrazioni ambientali. Questi risultati sono in accordo con studi precedenti condotti sulla vongola *R. philippinarum* e sul granchio *C. maenas* in cui si è osservato un effetto negativo su LMS dopo esposizione a CAF (Aguirre-Martínez et al., 2013a; . Aguirre-Martínez et al., 2013b). Una stretta correlazione positiva è stata dimostrata tra la riduzione di LMS e l'incremento di LIS/CIT e l'accumulo intra lisosomiale di LN e LIF in mitili esposti per 7 giorni all'antidepressivo fluoxetina (Franzellitti et al., 2014). L'accumulo di LN e LIF nei lisosomi è indice di una condizione di stress generale ed alterazione della risposta antiossidante (Viarengo and Nott, 1993; Moore et al., 2006b). L'accumulo di LN nella ghiandola digestiva ha mostrato un aumento di questi composti correlato alle concentrazioni di CAF somministrate, le cui differenze sono risultate significative solamente alla concentrazione più alta testata. Un accumulo di queste sostanze nella ghiandola digestiva di mitilo in concomitanza con una riduzione di LMS può indicare un'alterazione della fisiologia cellulare (Koehler, 2004) che, se protratta nel tempo, può portare a fenomeni di lipidosi come spesso accade dopo esposizione a composti tossici (Moore, 1988).

LIS/CIT è un parametro molto sensibile all'eccesso di materiale cellulare che viene degradato dopo esposizione a xenobiotici (Orbea et al., 2006). Nessuna differenza in LIS/CIT è stata riscontrata a nessuna delle concentrazioni di CAF testate, indicando che non sono in atto processi di autofagia come conseguenza di alterazioni dello stato redox degli organelli cellulari (Moore et al., 2008b).

L'esposizione di mitili a farmaci come il propranololo (β -bloccante), la fluoxetina (antidepressivo) e la carbamazepina (antiepilettico), ha mostrato importanti alterazioni a carico del sistema detossificante (Franzellitti et al., 2015; Franzellitti et al., 2014; Martín-Díaz et al., 2009). Queste alterazioni si manifestano con un accumulo di LIF (prodotti finali della perossidazione lipidica di acidi grassi e proteine) ed MDA (prodotto intermedio di perossidazione lipidica) nei lisosomi della ghiandola digestiva dopo esposizione a xenobiotici (Viarengo et al., 2007; Moore et al., 2007). Diversamente da quanto osservato negli studi

precedenti, la CAF non ha indotto un accumulo ne' di LIF ne' di MDA nel comparto lisosomiale della ghiandola digestiva.

Il possibile stress ossidativo indotto da CAF è stato ulteriormente valutato attraverso due biomarker enzimatici, la GST e la CAT.

CAT è un enzima intracellulare coinvolto nei meccanismi di difesa contro i radicali liberi generati dai contaminanti ambientali, deputato a ripristinare l'omeostasi cellulare prima che si manifestino condizioni irreversibili (Regoli and Giuliani 2014).

La GST è stato selezionato come enzima di fase II coinvolto nel metabolismo degli xenobiotici. Esso catalizza la coniugazione delle sostanze estranee all'organismo con il glutatione per facilitarne l'eliminazione. Il glutatione agisce da antiossidante mitigando gli effetti delle specie reattive dell'ossigeno, detossificando l'organismo (Wright e Welbourn, 2002; Newman e Unger, 2003).

L'attività di questi enzimi è stata valutata sia nelle branchie che nella ghiandola digestiva dei mitili esposti. L'attività di CAT, in entrambi i tessuti analizzati, non ha mostrato differenze significativamente diverse rispetto al controllo a nessuna delle concentrazioni testate.

Mentre non si sono riscontrate differenze significative nell'attività di GST nelle branchie, una sovra regolazione si è verificata nella ghiandola digestiva soprattutto alla concentrazione più alta testata (incremento di 1,5 volte rispetto al controllo). Un risultato molto simile è stato osservato nel mollusco di acqua dolce *C. fluminea*, dove variazioni a carico dell'attività dell'enzima si sono riscontrate dopo esposizione di 21 giorni a CAF già alla concentrazione di 0,1 µg/L (Aguirre-Martínez et al. 2015).

Questo incremento nell'attività dell'enzima è supportato dalla correlazione negativa con LMS. Alla concentrazione più alta testata infatti si osserva una significativa diminuzione di LMS con un incremento di GST, avvalorando l'ipotesi di una possibile alterazione dello stato ossidativo anche se non severa data l'assenza di variazioni degli altri parametri di stress ossidativo (MDA, LIF e CAT). Nel complesso la CAF non è in grado di indurre uno stress ossidativo importante sui mitili alle concentrazioni testate che ricadono nel range di concentrazioni riscontrate nelle acque costiere. I risultati ottenuti sono in accordo con gli studi condotti sulla vongola *R. philippinarum* ed il granchio *C. maenas*, in cui si è visto che la CAF è in grado di indurre stress

ossidativo a concentrazioni uguali o superiori ai 5 µg/L (Aguirre-Martínez et al., 2013a; . Aguirre-Martínez et al., 2013b).

Lo stress neuro tossico è stato misurato tramite la valutazione dell'enzima AChE, un biomarker specifico per la valutazione delle alterazioni neurologiche indotte da xenobiotici negli organismi acquatici (Valbonesi et al., 2003). La sua inibizione selettiva rappresenta il meccanismo d'azione di molti pesticidi ed organofosfati usati in agricoltura. Tuttavia è stato dimostrato che anche certe classi di farmaci come gli antidepressivi, sono in grado di indurre alterazioni a carico dell'attività di questo enzima nei mitili (Franzellitti et al., 2014; Gonzalez-Rey and Bebianno, 2013). Nessuno studio ha finora valutato gli effetti della CAF sull'AChE di mitilo, ma è noto che nell'uomo è in grado di inibire l'attività dell'enzima bloccando i recettori (Karadsheh et al., 1991). Nel nostro studio, l'attività dell'enzima misurata nelle branchie dei mitili, non ha mostrato variazioni significative rispetto al controllo nelle diverse concentrazioni di CAF testate. Gli studi condotti hanno mostrato un'inibizione della CAF sull'attività dell'enzima a concentrazioni attorno ai 20 mg/L (Karadsheh et al., 1991; Mohamed et al., 2013), concentrazioni molto superiori rispetto a quelle testate nel presente studio. Inoltre, nessuno studio ha finora mostrato la presenza di recettori adenosinici nei molluschi, e questo potrebbe spiegare ulteriormente il non effetto della CAF sull'attività di AChE.

Infine le alterazioni genotossiche sono state valutate attraverso l'analisi del danno primario al DNA che tende ad aumentare in caso di danno importante. Non sono state riscontrate differenze significative rispetto al controllo nei mitili esposti a CAF. Al contrario, i livelli tendono a diminuire rispetto al controllo anche se non in modo significativo. Questo dato è in accordo con lo studio di Aguirre-Martínez *et al.* (2013b) in cui si è visto che la CAF induce una riduzione dei livelli primari di danno al DNA nel granchio *C. maenas* in un range di concentrazione da 5 a 50 µg/L, avvalorando l'ipotesi di un possibile effetto anti-genotossico anche sui mitili come dimostrato sul topo da Abraham e Singh (1999).

In conclusione, lo studio ha mostrato che la tossicità della CAF è molto più bassa rispetto ai farmaci propranololo, fluoxetina e carbamazepina, precedentemente testati nel nostro laboratorio nelle stesse condizioni sperimentali (Franzellitti et al., 2011, 2014, 2015; Martin-Diaz et al., 2009). L'esposizione a queste sostanze ha dimostrato alterazioni isto e citotossiche,

disturbi neurologici, alterazioni a carico dell'espressione genica di geni coinvolti nella risposta detossificante e modificazioni a carico del secondo messaggero AMPc (adenosina monofosfato ciclico) che regola numerosi processi cellulari e fisiologici nel mitilo come nell'uomo. Tuttavia, l'esposizione a CAF, soprattutto alla concentrazione più alta (500 ng/L), ha mostrato un'importante riduzione nel tempo di destabilizzazione delle membrane lisosomiali indicando un'induzione della sindrome da stress avvalorata dall'aumento di LN e dall'incremento di GST nella ghiandola digestiva. Poiché altri parametri di stress ossidativo come CAT, LIF e MDA non sono stati influenzati dalla CAF, riteniamo che la sostanza venga metabolizzata dai mitili e che GST sia il principale enzima deputato alla sua eliminazione. Lo studio ha confermato il basso pericolo posto dalla CAF per le specie acquatiche, alle concentrazioni ambientali, come precedentemente affermato da Moore *et al.* (2008). Tuttavia, i dati mostrano un'induzione della sindrome da stress dopo esposizione di soli sette giorni alla sostanza. L'esposizione prolungata nel tempo ed in concomitanza con altri elementi stressori (es: xenobiotici, variazioni dei parametri abiotici, *etc.*) potrebbe indurre ad alterazioni irreversibili a livello cellulare ed enzimatico, compromettendo la capacità degli organismi di rispondere allo stress e di conseguenza diminuendo la resilienza della popolazione.

4.5 Riferimenti Bibliografici

- Abraham SK, Singh SP. (1999) Anti-genotoxicity and glutathione S-transferase activity in mice pretreated with caffeinated and decaffeinated coffee. *Food Chem Toxicol.* 37:733-739.
- Aguirre-Martínez GV, Buratti S, Fabbri E, DelValls AT, Martín-Díaz ML. (2013a) Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. *J Environ Sci.* 25:1408-1418.
- Aguirre-Martínez GV, DelValls AT, Laura Martín-Díaz M. (2015) Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicol Environ Saf.* 120:142-154.
- Aguirre-Martínez GV, DelValls TA, Martín-Díaz ML. (2013b) Identification of biomarkers responsive to chronic exposure to pharmaceuticals in target tissues of *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res.* 87:1–11.
- Aguirre-Martínez GV, Owuor MA, Garrido-Pérez C, Salamanca MJ, Del Valls TA, Martín-Díaz ML. (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.
- Banni M, Dondero F, Jebali J, Guerbei H, Boussetta H, Viarengo A. (2007) Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast. *Biomarkers.* 12:369-383.
- Barone JJ and Roberts HR. (1996) Caffeine consumption. *Food Chem. Toxicol.* 34:119-129.
- Buerge IJ, Poiger T, Muller MD, Buser HR. (2003) Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ Sci Technol*, 37:691–700.
- Calleja MC, Persoone G, Geladi P. (1994) Comparative acute toxicity of the first 50 multicentre evaluation of in vitro cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol.* 26: 69-78.
- Chen YH, Huang YH, Wen CC, Wang YH, Chen WL, Chen LC, Tsay HJ. (2008) Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. *Neurotoxicology and Teratology.* 30: 440–447.
- Choi K, Kim Y, Park J, Park CK, Kim MY, Kim HS, Kim P. (2008) Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Sci Tot Environ.* 405:120-128.
- Deblonde T, Cossu-Leguillieb C, Hartemanna P. (2011) Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature International. *Journ of Hyg and Environ Health.* 214:442– 448.
- Ellman GL, Courtney KD, Andre V Jr, Feather-Stone RM. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7:88-95.
- Fabbri E, Franzellitti S. (2015) Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environ Toxicol Chem.* doi: 10.1002/etc.3131
- Fent K, Weston AA, Caminada D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 76:122-159.
- Fernández C, González-Doncel M, Pro J, Carbonell G, Tarazona JV. (2010) Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the henares-jarama-tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. *Sci Tot Environ.* 408:543–551.
- Fernández-Gómez C, López-López JA, Matamoros V, Díez S, -Vargas MG, Moreno C. (2013) Atmospheric influence on the distribution of organic pollutants in the Guadalquivir River estuary, SW. Spain. *Environ Monit Assess.* 185:3209–3218.
- Fraker SL, Smith GR. (2004) Direct and interactive effects of ecologically relevant concentrations of organic wastewater contaminants on *Rana pipiens* tadpoles. *Environ Toxicol.* 19:250–256.
- Franzellitti S, Buratti S, Capolupo M, Du B, Haddad SP, Chambliss CK, Brooks BW, Fabbri E. (2014) An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquat Toxicol.* 151:14-26.
- Franzellitti S, Buratti S, Capolupo M, Du B, Haddad SP, Chambliss CK, Brooks BW, Fabbri E. (2014) An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquat Toxicol.* 151:14–26.
- Franzellitti S, Buratti S, Du B, Haddad SP, Chambliss CK, Brooks BW, Fabbri E. (2015) A multibiomarker approach to explore interactive effects of propranolol and fluoxetine in marine mussels. *Environ Pollut.* 205:60-69.
- Franzellitti S, Buratti S, Valbonesi P, Capuzzo A, Fabbri E. (2011) The β -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.* 101:299-308.

- Frary CD, Johnson RK, Wang MQ. (2005) Food Sources and Intakes of Caffeine in the Diets of Persons in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*. 105:110-113.
- Gagné F, Blaise C, André C. (2006) Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicol Environ Safety*. 64:329–336.
- Gagné F, Blaise C, Hellou J. (2004) Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal effluent plume for 1 year. *Comp Biochem Phys. C* 138:33–44.
- Gardinali PR, Zhao X. (2002) Trace determination of caffeine in surface water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC-APCI-MS). *Environ Int*. 28:521–528.
- Gonzalez-Rey M, Bebianno MJ. (2013) Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environ Pollut*. 173:200-209.
- Gonzalez-Rey M, Bebianno MJ. (2014) Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*. 148:221–230.
- Hyne RV, Maher WA. (2003) Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol Environ Saf*. 54:366–374.
- ICES. (2011) Report of the Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC), 14–18 March 2011, Copenhagen, Denmark. ICES CM 2011/ACOM:30. 265 pp.
- Jacobs LE, Weavers LK, Houtz EF, Chin YP. (2012) Photosensitized degradation of caffeine: Role of fulvic acids and nitrate. *Chemosphere*. 86:124–129.
- Karadsheh N, Kussie P, Linthicum DS. (1991) Inhibition of acetylcholinesterase by caffeine, anabasine, methyl pyrrolidine and their derivatives. *Toxicology letters*. 55:335-342.
- Koehler A, Alpermann T, Lauritzen B, van Noorden CJF. (2004) Clonal xenobiotic resistance during pollution-induced toxic injury and hepatocellular carcinogenesis in liver of female flounder. *Acta Histochem*. 106:155-170.
- Kosma CI, Lambropoulou DA, Albanis TA. (2014) Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. *Sci Tot Env*. 466–467; 421–438.
- Lam MW, Young CJ, Brain RA, Johnson DJ, Hanson MA, Wilson CJ, Richards SM, Solomon KR, Mabury SA. (2004) Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environ Toxicol Chem*. 23:1431-1440.
- Lawrence JR, Swerhone GDW, Wassenaar LI, Neu TR. (2005) Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities. *Can J Microbiol*. 51:655–659.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-275.
- 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*. *Aquat Toxicol*. 94:177-85.
- Martínez-Gómez C, Benedicto J, Campillo JA, Moore M. (2008) Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. *J Environ Monit*. 10:490-499.
- Metcalfe CD, Miao XS, Koenig BG, Struger J. (2003) Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ Toxicol Chem*. 22:2881–2889.
- Mimeault C, Trudeau VL, Moon TW. (2006) Waterborne gemfibrozil challenges the hepatic antioxidant defense system and down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor beta (PPARbeta) mRNA levels in male goldfish (*Carassius auratus*). *Toxicology*. 228:140-150.
- Mohamed T, Osman W, Tin G, Rao PP. (2013) Selective inhibition of human acetylcholinesterase by xanthine derivatives: *in vitro* inhibition and molecular modeling investigations. *Bioorg Med Chem Lett*. 23:4336-4341.
- Moore MN, Allen JI, McVeigh A, Shaw J. (2006b) Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals. *Autophagy*. 2:217-220.
- Moore MN, Allen JI, McVeigh A. (2006a) Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar Environ Res*. 61:278–304.
- Moore MN, Kohler A, Lowe D, Viarengo A. (2008b) Lysosomes and autophagy in aquatic animals. *Methods Enzymol*. 451:581-620.
- Moore MN, Viarengo A, Donkin P, Hawkins AJS. (2007) Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat Toxicol*. 84: 80-91.

- Moore MN. (1988) Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar Ecol Prog Ser.* 46:81-89.
- Moore MT, Greenway SL, Farris JL, Guerra B. (2008a) Assessing caffeine as an emerging environmental concern using conventional approaches. *Arch Environ Contam Toxicol.* 54:31-35.
- Newman MC, Unger MA. (2003) Fundamentals of ecotoxicology. Second Edition Lewis publishers, United States of America, p. 458.
- Nikolau A, Meric S, Fatta D. (2007) Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem.* 387:1225–1234.
- Olive OP. (1988) DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen.* 11:487-495.
- Orbea A, Garmendia L, Marigómez I, Cajaraville MP (2006). Effects of the 'Prestige' oil spill on cellular biomarkers in intertidal mussels: results of the first year of studies. *Mar Ecol Prog Ser.*306:177–189.
- Park J. (2005) Pharmaceuticals in the Environment and Management Approach in Korea. KEI - *Korean Environment Institute.* 139 pp.
- Pearse AGE. (1972) Histochemistry, theoretical and applied, vol. 2. London: Churchill-Livingstone.
- Pereira WE, Moody JA, Hostettler FD, Rostad CE, Leiker TJ. (1995) Concentrations and mass transport of pesticides and organic contaminants in the Mississippi River and some of its tributaries, 1987-89 and 1991-92, In: *USGS Open-File Report 94-376, US Government Printing Office, Washington, DC.* <<http://www.pubs.usgs.gov/of/1994/0376/report.pdf>>.
- Poiger T, Buser HR, Müller MD, Balmer ME, Buerge IJ. (2003) Occurrence and Fate of Organic Micropollutants in the Environment: Regional Mass Balances and Source Apportioning in Surface Waters Based on Laboratory Incubation Studies in Soil and Water, Monitoring, and Computer Modeling. *Chimia.* 57:492–498.
- Regoli F, Giuliani ME (2014) Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar Environ Res.* 93:106-17.
- Rodriguez del Rey Z, Granek EF, Buckley BA. (2011) Expression of HSP70 in *Mytilus californianus* following exposure to caffeine. *Ecotoxicology* 20:855–861.
- Sawyer SJ, Muscatine L. (2001) Cellular mechanisms underlying temperature-induced bleaching in the tropical sea anemone *Aiptasia pulchella*. *J Exp Biol.* 204:3443-56.
- Sedeño-Díaz JE and López-López E. (2012) Freshwater Fish as Sentinel Organisms: From the Molecular to the Population Level, a Review. *New Advances and Contributions to Fish Biology.* 4:151-174.
- Silva CP, Lima DLD, Schneider RJ, Otero M, Esteves VI. (2014) Evaluation of the anthropogenic input of caffeine in surface waters of the north and center of Portugal by ELISA. *Sci Total Environ.* 479–480, 227–232.
- Tang-Liu DD, Williams RL, Riegelman S. (1982) Disposition of caffeine and its metabolites in man. *J Pharm Exp Ther.* 224:180–185.
- Ternes TA, Bonerz M, Schmidt T. (2001) Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journ of Chrom.* 938:175-185.
- UNEP/MED POL 2006. Biological Effects Monitoring Programme; Mediterranean Action Planning Technical Reports Series, 166, 240 pp.
- UNEP/RAMOGGE, 1999. Manual on Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens, 39 pp.
- Valbonesi P, Sartor G, Fabbri E. (2003) Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Sci Total Environ.* 312:79–88.
- Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A. (2007) A The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp Biochem Phys.* 146:281–300.
- Viarengo A, Nott JA. (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol. C Comp Pharmacol Toxicol.* 104:355-372.
- Wennmalm Å, Gunnarsson B, Eckerman I. (2010) Pharmaceuticals – Permanent Pollutants in Environment: Basic facts and proposed measures to protect the public health and the environment. *ISDE document on pharmaceuticals,* 1-6.
- Wright DA, Welbourn P. (2002) Environmental Toxicology Cambridge Environmental Chemistry Series. 11. Cambridge University Press, United Kingdom, p. 630.

5. Approccio biologico per la valutazione della qualità ambientale della laguna costiera Piallassa Piombone



Glossario

AChE	acetilcolinesterasi
CAN-E	canale est
CAT	catalasi
CENTR	centrale
GST	glutathione-s-transferasi
IDRO	idrovara
LIF	lipofuscine
LIS/CIT	rapporto lisosoma/citoplasma
LMS	stabilità membrane lisosomiali
LN	lipidi neutri
MDA	malondialdeide
MT	metallotioneine
NRRA	neutral red retention assay
PM	porta marea
SE	sud-est

5.1 Introduzione

Le lagune costiere sono ambienti particolarmente complessi poiché situati tra la terra ed il mare. Sono caratterizzati da fluttuazioni dei parametri chimico-fisici e spesso sono soggette a forti impatti antropici. Il monitoraggio della qualità ambientale di questi ecosistemi è piuttosto difficile data la loro variabilità intrinseca che limita il potere degli approcci chimici ed ecotossicologici.

Negli ultimi anni sono state sviluppate strategie alternative che si sono rivelate particolarmente utili nel monitoraggio di questi ambienti. Nello specifico, l'analisi dei biomarker su organismi sentinella è stato inserito nel quadro dei programmi internazionali (es: UNEP/MAP, MED-POL) ed applicata al biomonitoraggio degli ambienti marino-costieri (Cajaraville et al., 2000; Romeo et al., 2003). Tuttavia, l'utilizzo di biomarcatori per il biomonitoraggio delle lagune costiere ha sempre avuto minore importanza (Nasci et al., 2002).

Grazie all'elevata sensibilità dei biomarker anche nei confronti di contaminanti emergenti (farmaci, ormoni *etc.*), forniscono delle risposte sensibili e precoci riguardo gli effetti sub-letali dei contaminanti sugli animali prima che si presentino delle alterazioni irreversibili (ICES 2011; UNEP MED-POL 2006; Viarengo et al., 2007). L'uso dei biomarker non sostituisce le analisi chimiche o i test ecotossicologici, ma li integra fornendo informazioni uniche nel determinare la tossicità dei contaminanti nel provocare una sindrome da stress anche quando presenti a concentrazioni basse e sub-letali (Viarengo et al., 2007). Più recentemente, i biomarker sono stati proposti per la valutazione degli ambienti marino-costieri da parte del Panel di Esperti JRC-ICES (2010) al fine del raggiungimento del *Good Environmental Status* nell'ambito della Marine Strategy Framework Directive.

L'area di studio è la Piallassa Piombone, una laguna salmastra localizzata a sud del porto-canale di Ravenna, il Candiano, in area litoranea e sublitoranea tra i lidi di Marina di Ravenna e Punta Marina, e comprende tre tipologie di ambienti: la zona umida Piallassa Piombone, la Pineta litoranea tra la Piallassa ed il mare ed il tratto di litorale con lembi di dune attive. Questa zona umida, nonostante faccia parte della Stazione "Pineta di San Vitale e Piallasse di Ravenna" del Parco Regionale del Delta del Po, è oggi interessata da fortissime

pressioni antropiche che causano alterazioni e disturbi anche significativi sull'ecologia del sito. E' inserita in un sistema idrodinamico particolare in quanto rappresenta una zona di transizione tra le acque dolci fluviali e le acque marine. Nonostante l'ambiente presenti un certo dinamismo naturale, le pressioni antropiche (aree portuali ed industriali, caccia, pesca e fruizione indiscriminata) insieme a fenomeni naturali quali l'eutrofizzazione, hanno determinato rilevanti squilibri.

Al fine di verificare la qualità generale, dal punto di vista ambientale, delle acque e degli organismi in esso presenti nell'area di interesse, sono stati utilizzati i mitili come organismi sentinella.

I molluschi bivalvi sono organismi sessili che vivono all'interfaccia acqua/sedimento, in grado di filtrare grandi volumi d'acqua come anche materiale particolato. Vivono in ambienti caratterizzati da un'elevata escursione dei parametri ambientali quali salinità e temperatura, sono fortemente tolleranti ai cambiamenti abiotici ed ai parametri biotici, e per questi motivi sono modelli ottimali per studiare le alterazioni fisiologiche degli ambienti di transizione (Franzellitti et al., 2010). Grazie alle buone risposte che sono in grado di fornire dopo esposizione ai contaminanti, i mitili sono oggi largamente usati come organismi sentinella nei programmi internazionali di biomonitoraggio ambientale come UNEP, RA.MO.GE, BEEP, etc. (Viarengo et al., 2007). Inoltre, data la loro capacità di accumulare i contaminanti nei tessuti, forniscono una valutazione nel tempo della biodisponibilità di tali sostanze (Benedetti et al., 2015).

Gli obiettivi dello studio sono stati quelli di valutare la qualità ambientale della Piailassa Piombone, di determinare una possibile sindrome da stress dei mitili trapiantati in campo e di identificare la possibile presenza di farmaci nell'ambiente tramite l'analisi del bioaccumulo nei tessuti dei mitili esposti. A tal fine è stata utilizzata una batteria di biomarker o indici di stress analizzati in tessuti di mitili in accordo con i protocolli UNEP/RAMOGGE (1999). Quattro consolidati biomarker sono stati utilizzati per valutare lo stress generale: la stabilità delle membrane lisosomiali (LMS), il contenuto di lipofuscine (LIF) e lipidi neutri (LN) ed il rapporto volume lisosoma/citoplasma (LIS/CIT). Lo stress ossidativo è stato misurato valutando l'attività degli enzimi catalasi (CAT) e glutatione-S-transferasi (GST) ed analizzando il contenuto di

malondialdeide (MDA), prodotto intermedio di perossidazione lipidica. Gli effetti genotossici, l'esposizione a metalli pesanti e ai pesticidi sono stati valutati rispettivamente tramite l'analisi di danno primario al DNA, contenuto di metallotioneine (MT) ed attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE). Infine, la presenza di farmaci e idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nell'ambiente è stata valutata attraverso l'analisi del bioaccumulo nei tessuti dei mitili esposti. I risultati ottenuti sono stati integrati ed interpretati tramite l'uso del Sistema Esperto (Dagnino et al., 2007) che permette di definire vari livelli di stato di salute degli organismi sentinella esposti nell'area d'interesse.

5.2 Materiali e Metodi

Animali e Disegno sperimentale

Mitili della specie *Mytilus galloprovincialis* sono stati acquistati dalla Cooperativa Copr.al.mo (Cesenatico, Italia) e trasportati in laboratorio dove sono stati selezionati per taglia (5-6 cm) e stabulati per 3 giorni in vasche contenenti acqua di mare filtrata in condizioni di temperatura e areazione costanti, rispettando il naturale fotoperiodo. Gli organismi sono stati esposti in 6 stazioni all'interno della Piallassa Piombone per un tempo di 28 giorni (9 ottobre – 6 novembre 2013). I mitili sono stati suddivisi in 6 gruppi di 60 animali ciascuno e trasferiti nelle stazioni di monitoraggio (Fig. 5.2.1): Canale-Est (CAN-E), Idrovora (IDRO), Porta Marea (PM), Sud-Est (SE), Ovest e Centrale (CENTR). Un ulteriore gruppo è stato analizzato immediatamente come campione di controllo per la valutazione dello stato fisiologico degli animali all'inizio del monitoraggio (tempo zero, T0). Al termine del periodo di esposizione in campo, i mitili sono stati recuperati e trasferiti in laboratorio per essere processati per l'analisi dei biomarker e del bioaccumulo. Per la valutazione dei biomarker le analisi sono state fatte in sestuplicato (N = 6).



Fig.5.2.1 Mappa delle 6 stazioni di monitoraggio all'interno della Piallassa Piombone

Stabilità delle membrane lisosomiali (LMS)

LMS è stata valutata negli emociti di mitilo utilizzando il metodo del neutral red retention assay (NRRA) come riportato in dettaglio da Martinez- Gómez *et al.* (2008). LMS è stata valutata come il tempo di destabilizzazione che rappresenta il tempo in cui più del 50% dei lisosomi rilasciano il colorante nel citosol. Per ogni trattamento, i dati sono espressi come la percentuale di variazione \pm ES rispetto al T0.

Parametri lisosomiali misurati nella ghiandola digestiva

Per valutare il rapporto volume lisosomi/citoplasma (LIS/CIT) ed il contenuto lisosomiale di lipidi neutri (LN) e lipofuscine (LIF), le ghiandole digestive sono state sezionate e poste su un supporto in alluminio (chuck), congelate in esano a -70 °C e rapidamente trasportate a -80 °C. Per le analisi, le procedure sono state effettuate in accordo con gli standard UNEP/RAMOG

(1999). Ulteriori dettagli nel capitolo IV. I risultati sono stati espressi come variazione percentuale rispetto al T0.

Attività degli enzimi antiossidanti glutatione-S-transferasi (GST) e catalasi (CAT)

I tessuti di branchia (circa 200 mg) sono stati omogenati in tampone potassio-fosfato 50mM (KPB), pH 7.0, contenente Na₂EDTA 0,5mM seguendo il protocollo di Mimeault *et al.* (2006). Il contenuto di proteine totali è stato valutato attraverso il metodo messo a punto da Lowry (1951). L'attività enzimatica è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro modello DU800 (Beckman) a 25°C. Ulteriori dettagli metodologici nel capitolo IV. L'attività finale è espressa come µmol/min/mg di proteina.

Attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE)

L'attività di AChE è stata determinata nelle branchie seguendo il metodo di Ellman *et al.* (1961). Ulteriori dettagli nel capitolo IV. I risultati sono stati espressi come nmol/min/mg proteina.

Formazione di malondialdeide (MDA)

Il contenuto di MDA è stato analizzato secondo il protocollo introdotto da Banni *et al.* (2007) con lievi modifiche. Ulteriori dettagli metodologici nel capitolo IV. Il risultato finale è stato espresso in nmol/mg proteine (Martin-Diaz *et al.*, 2009).

Danno al DNA

I livelli primari di danno al DNA sono stati valutati seguendo il protocollo descritto da Olive (1988). Ulteriori dettagli nel capitolo IV. I risultati sono espressi in µg DNA/mg di proteine.

Livello tissutale di metallothioneine (MT)

Le metallothioneine (MT), proteine citoplasmatiche in grado di legare metalli pesanti e tossici per ridurre gli effetti, sono state valutate attraverso il metodo descritto in Viarengo *et al.* (1997). Il metodo consiste nel frazionamento con etanolo-cloroformio del campione di ghiandola digestiva ottenuto in seguito a centrifugazione, allo scopo di ottenere una frazione parzialmente purificata contenente le MT. La concentrazione di MT viene quindi valutata misurando il contenuto di residui -SH tramite un metodo spettrofotometrico che impiega il reagente di Ellman (DTNB: acido 5,5 ditiobis 2 nitrobenzoico). Visto l'alto contenuto di cisteina

delle MT (rappresenta circa il 20-30%) rispetto alle altre proteine presenti nell'estratto etanolico, questo metodo di valutazione è efficace e molto selettivo.

Bioaccumulo di contaminanti nei tessuti

Le analisi relative al bioaccumulo di farmaci ed IPA (idrocarburi policiclici aromatici) sono state eseguite dagli esperti del Norwegian Institute for Water Research (NIVA). I campioni destinati alla misurazione di IPA sono stati estratti attraverso saponificazione alcalina e successivamente analizzati mediante gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa. Per l'analisi del bioaccumulo di farmaci è stata effettuata un'estrazione mediante solvente e successiva analisi mediante cromatografia liquida e spettrometria di massa tandem.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati usando il pacchetto software statistico SigmaStat 12.0. Le differenze significative tra i siti ed il campione di controllo (T0) sono state determinate usando ANOVA ad una via seguita dal test di Bonferroni usato come test *post hoc*. Le differenze sono state considerate significative con $p < 0,05$. L'integrazione dei dati ottenuti dall'analisi dei biomarker è stata ottenuta mediante l'applicazione del Sistema Esperto per la stima della vulnerabilità biologica degli ambienti acquatici. Il Sistema Esperto (Dagnino et al., 2007) permette l'integrazione dei dati ottenuti dall'impiego dei biomarker. Il sistema si basa su una scala di classificazione che considera le diverse caratteristiche delle risposte biologiche ai fattori di stress. I dati dei biomarker vengono suddivisi in categorie sulla base del trend caratteristico di ciascun parametro in risposta ad un gradiente di stress (aumento, riduzione, andamento bimodale "a campana"). Il sistema, inoltre, tiene in considerazione anche le possibili interferenze che possono intercorrere tra diverse risposte biologiche in condizioni di stress. Infine, la batteria di biomarker integra le risposte di endpoint a diversi livelli della complessità biologica, dal livello molecolare fino alle risposte dell'intero organismo. I parametri analizzati negli organismi esposti *in situ* nelle 6 stazioni all'interno della Pialassa Piombone sono stati confrontati con gli stessi parametri analizzati negli organismi di controllo (T0). La significatività delle variazioni osservate rispetto al campione di controllo è stata testata mediante il test di Bonferroni. Variazioni (seppur statisticamente significative) inferiori al 20% sono considerate

fluttuazioni naturali. Per ciascun biomarker le differenze significative tra gli organismi esposti *in situ* e gli organismi di controllo sono classificate utilizzando valori soglia stabiliti sulla base del profilo di risposta di ciascun biomarker. Questi valori soglia considerano le differenze nei range dinamici dei diversi biomarkers, e sono stati definiti sulla base di studi precedenti. Un biomarker tra quelli componenti la batteria viene selezionato come parametro guida, i.e. il parametro più responsivo tra quelli valutati. Alle variazioni del parametro guida viene attribuito un peso maggiore nell'integrazione dei dati. Secondo questa procedura di classificazione, vengono definiti 5 livelli di HSI (Health Status Index) che definiscono altrettanti livelli dello stato di salute degli organismi sentinella esposti ai siti in esame:

- A – condizioni di buona salute
- B – debole alterazione fisiologica
- C – moderata alterazione fisiologica
- D – elevata alterazione fisiologica
- E – alterazioni patologiche

5.3 Risultati

Stabilità delle membrane lisosomiali (LMS)

Nessun tasso di mortalità è stato registrato dopo i 28 giorni di esposizione dei mitili nelle diverse stazioni della Piallassa Piombone. In Fig.5.3.1 è mostrata la stabilità delle membrane lisosomiali tramite il Neutral Red Retention Assay (NRR). Il tempo di ritenzione del colorante è di circa 180 min. negli organismi al T0. Dopo 28 giorni di esposizione, tutti i siti analizzati presentano valori medio-alti di stabilità delle membrane lisosomiali significativamente ridotti rispetto al campione T0. CAN-E e PM presentano il tempo più basso registrato, 60 min. (- 67%); IDRO e OVEST quello più alto, 115 min. (- 37%).

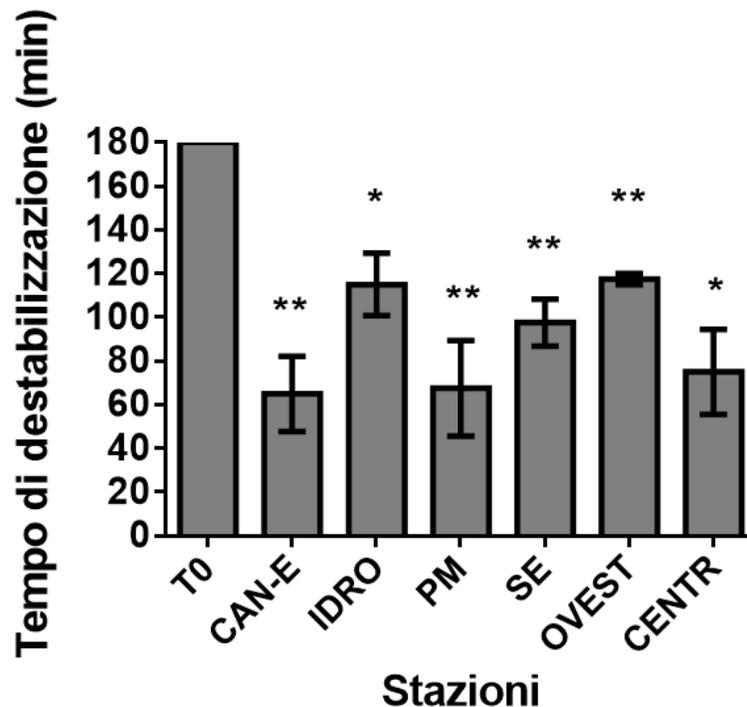


FIG.5.3.1: LMS valutata tramite NRR in emociti di mitilo dopo 28 giorni di esposizione in campo. I risultati sono espressi come la media \pm ES. Asterischi indicano differenze significative rispetto al T0. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Parametri lisosomiali misurati nella ghiandola digestiva

Il contenuto di lipidi neutri (LN), lipofuscine (LIF) ed il rapporto volume lisosomi/citoplasma (LIS/CIT) è mostrato in Fig.5.3.2. Dopo 28 giorni di esposizione si osserva un aumento significativo di circa il 20% nel contenuto di LN (Fig. 5.3.2A) nelle stazioni CAN-E, IDRO e PM rispetto al T0. Il contenuto di LIF (Fig. 5.3.2B) aumenta in modo significativo in tutte le stazioni fino al 200% rispetto al T0. Il rapporto volume LIS/CIT (Fig. 5.3.2C) aumenta significativamente (dal 20 al 60 %) rispetto al T0 nelle stazioni CAN-E, IDRO, PM, OVEST E CENTR.

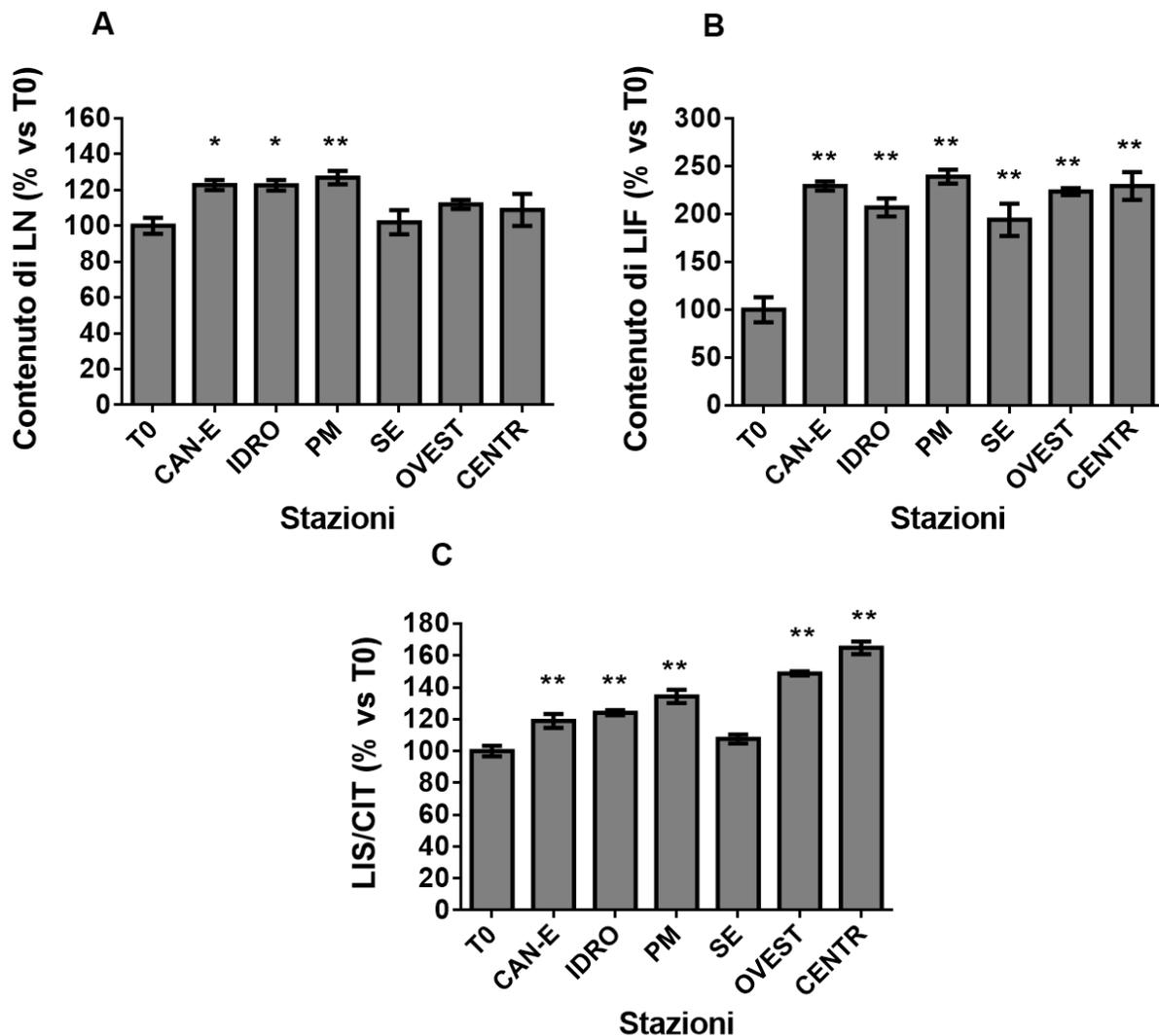


FIG.5.3.2: Accumulo di LN (A), LIF (B) e rapporto volume LIS/CIT (C) valutati nella ghiandola digestiva di mitilo dopo 28 giorni di esposizione in campo. I risultati sono espressi come la media \pm ES. Asterischi indicano differenze significative rispetto al T0. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Attività degli enzimi antiossidanti

L'attività degli enzimi antiossidanti GST e CAT, misurata nelle branchie, è mostrata in Fig. 5.3.3. Dopo 28 giorni di esposizione in campo, non si sono riscontrate variazioni significative rispetto al T0 nell'attività di GST in nessuna delle 6 stazioni (Fig. 5.3.3A). I livelli di attività dell'enzima CAT (Fig. 5.3.3B) risultano significativamente ridotti, fino al 50%, nei mitili esposti nelle stazioni CAN-E, IDRO e SE.

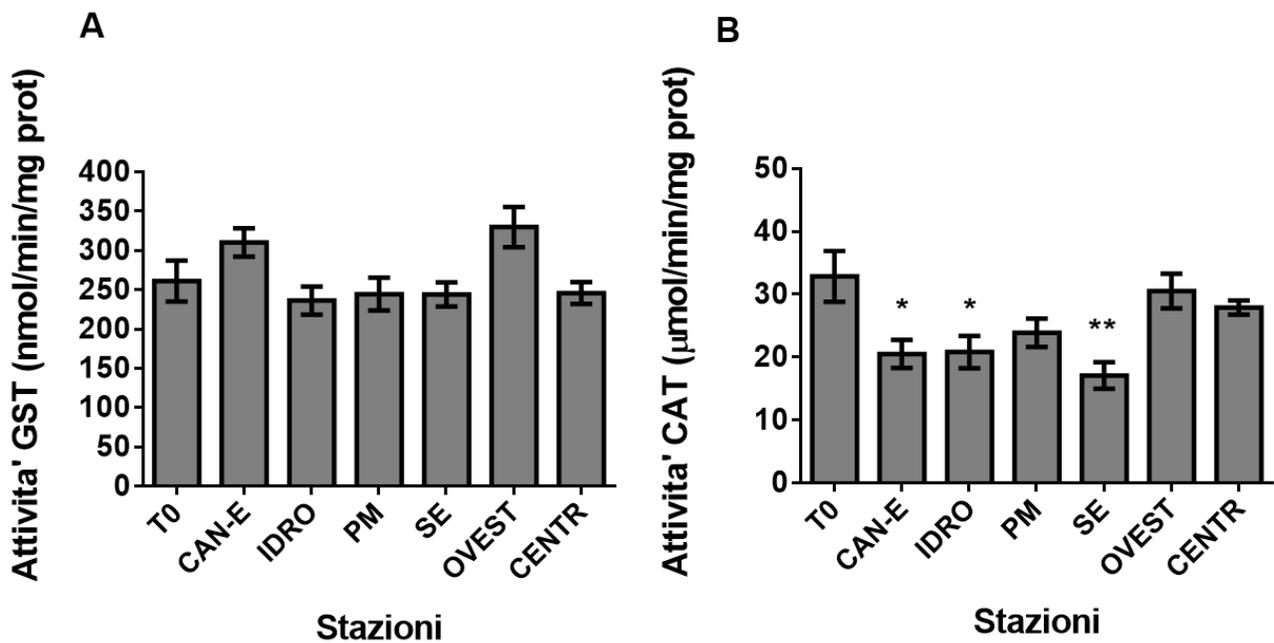


FIG.5.3.3: Attività di GST (A) e CAT (B) in branchie di mitilo dopo 28 giorni di esposizione in campo. I risultati sono espressi come la media \pm ES. Asterischi indicano differenze significative rispetto al T0. * $p<0,05$; ** $p<0,01$

Attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE)

L'attività dell'enzima AChE è mostrata in Fig. 5.3.4. L'attività espressa come % rispetto al T0, non ha mostrato differenze significative rispetto al T0 in nessuna delle stazioni all'interno dell'area di studio.

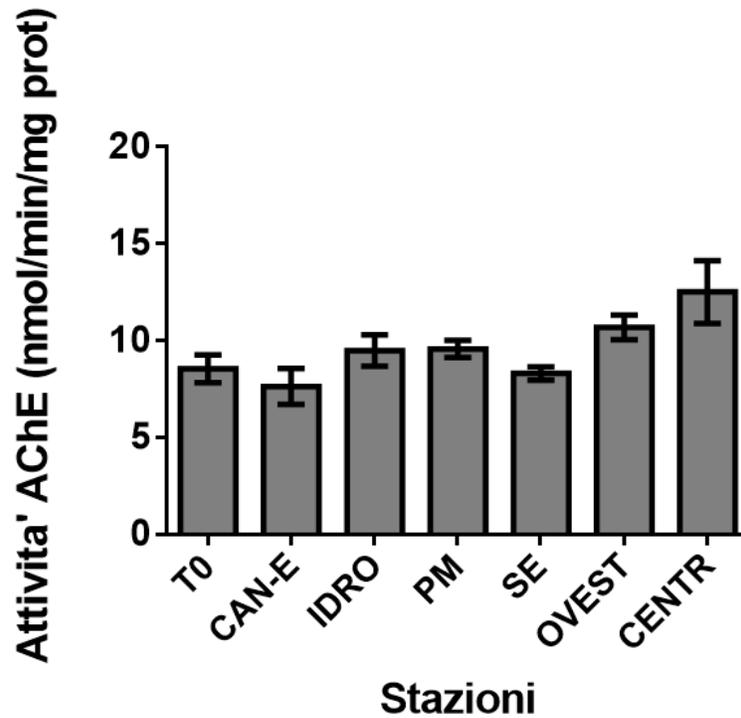


FIG.5.3.4: Attività di AChE in branchie di mitilo dopo 28 giorni di esposizione in campo. I risultati sono espressi come la media \pm ES della percentuale di variazione rispetto al T0.

Formazione di malondialdeide (MDA)

La perossidazione lipidica valutata nel tessuto branchiale come contenuto di MDA (Fig. 5.3.5), è risultata significativamente ridotta rispetto ai campioni del T0 nei mitili esposti nelle stazioni IDRO, PM, OVEST e CENTR, (da - 30% a - 50%).

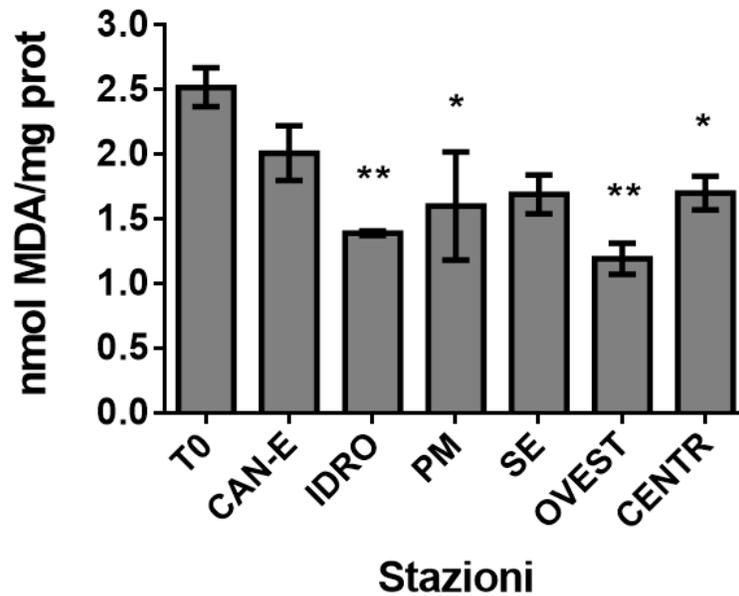


FIG.5.3.5: Livelli di perossidazione lipidica misurati tramite contenuto di MDA nella tessuto branchiale di mitilo dopo 28 giorni di esposizione in campo. I risultati sono espressi come nmol di MDA/mg di proteine (media ± ES). Asterischi indicano differenze significative rispetto al T0. *p<0,05; **p<0,01

Danno al DNA

La determinazione della quantità di DNA danneggiato è presentata in Fig. 5.3.6. La quantità di DNA danneggiato, rilevato tramite il colorante di Hoechst, ha mostrato livelli particolarmente elevati nei mitili esposti in campo nella stazione di CAN-E, con valori quasi 4 volte più elevati rispetto ai mitili del campione T0. Nei mitili esposti in tutti gli altri siti non si sono osservate alterazioni significative rispetto al T0.

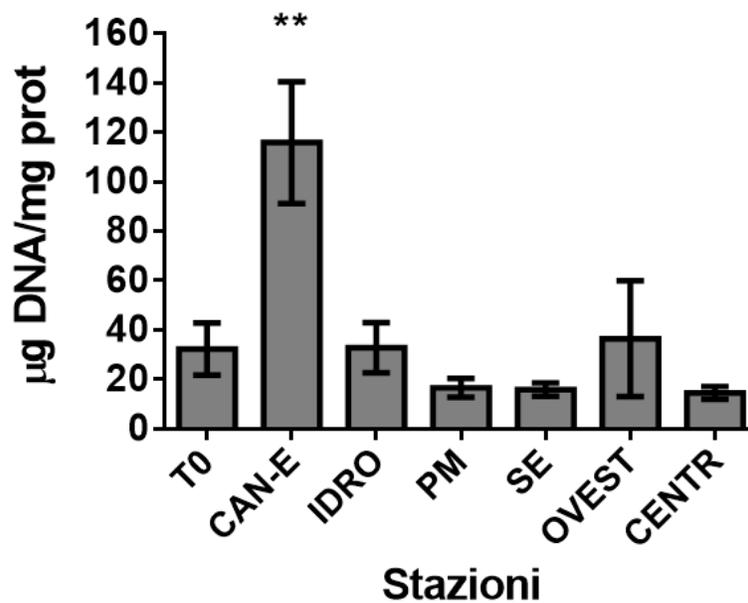


FIG.5.3.6: Livelli di danno al DNA valutati nella ghiandola digestiva di mitilo dopo 28 giorni di esposizione in campo. I risultati sono espressi come µg di DNA danneggiato/mg di proteina (media ± ES). Asterischi indicano differenze significative rispetto al T0. **p<0,01

Livello tissutale di metallothioneine (MT)

Il contenuto di MT nella ghiandola digestiva di mitili esposti in campo è mostrato in Fig.5.3.7. Dalle analisi si è riscontrato un aumento significativo dei livelli di MT rispetto ai campioni del T0 per i mitili posti nelle stazioni IDRO, SE, OVEST e CENTR con valori fino a 3 volte più elevati.

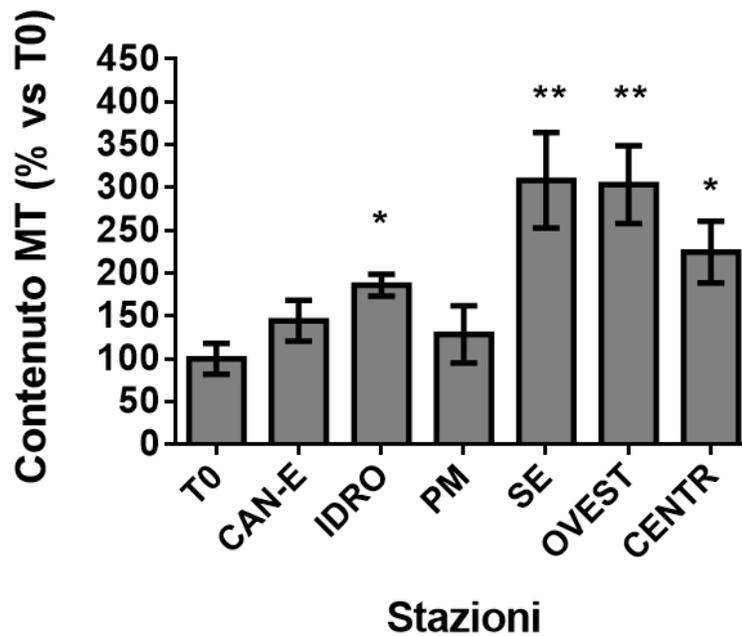


FIG.5.3.7: Livelli tissutali di MT misurati nella ghiandola digestiva di mitilo dopo 28 giorni di esposizione in campo. I risultati sono espressi come la media \pm ES della percentuale di variazione rispetto al T0. Asterischi indicano differenze significative rispetto al T0. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Bioaccumulo di contaminanti nei tessuti

L'analisi del bioaccumulo di composti organici nei tessuti dei mitili esposti (Tab. 5.3.1) segnala una maggiore concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici nei tessuti dei mitili prelevati nel sito CANALE EST e, in misura minore, nelle stazioni IDRO, OVEST e SE.

Tabella 5.3.1. Concentrazioni tissutali di composti organici misurate nei mitili trapiantati per 28 giorni in diversi siti della Pialassa Piombone.

ng/g (peso fresco)	T0	CAN-E	IDRO	PM	SE	OVEST	CENTR
Acenaftene	0,31	0,20	0,25	0,15	0,15	0,19	0,10
Acenaftilene	0,10	0,98	0,29	0,70	0,38	0,44	0,21
Antracene	<0,1	0,25	0,17	0,17	0,10	0,12	0,10
Benzo(a)antracene	<0,1	0,89	0,47	0,43	0,28	0,59	0,31
Benzo(a)pirene	<0,1	0,71	0,14	0,37	0,19	0,28	0,14
Benzo(b,j)fluorantene	0,17	1,69	0,88	0,87	0,57	1,01	0,47
Benzo(e)pirene	0,17	1,50	0,87	1,08	0,59	1,20	0,64
Benzo(ghi)perilene	<0,1	2,18	0,66	1,62	0,83	0,73	0,45
Benzo(k)fluorantene	<0,1	0,40	0,19	0,20	0,13	0,23	0,10
Crisene	<0,1	1,07	0,89	0,72	0,54	1,12	0,57
Dibenz(ac/ah)antracene	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Dibenzotiofene	0,14	0,15	0,24	0,11	0,11	0,14	0,09
Fenantrene	1,4	2,8	2,5	2,4	1,9	2,2	1,5
Fluorantene	0,17	3,76	2,20	2,54	1,88	2,13	1,43
Fluorene	0,52	0,49	0,47	0,36	0,34	0,36	0,25
Indeno(1,2,3-cd)pirene	<0,1	0,81	0,24	0,50	0,29	0,26	0,18
Naftalene	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Perilene	0,33	0,92	0,93	0,75	0,39	1,56	0,59
Pirene	0,19	12,65	3,77	7,97	4,77	4,85	2,77

In tabella 5.3.2 sono riportati i dati relativi al bioaccumulo di farmaci nei tessuti dei mitili trapiantati per 28 giorni all'interno della Pialassa. Tutti i farmaci ricercati sono risultati al di sotto del limite di rilevabilità dello strumento, eccezione fatta per l'antiinfiammatorio diclofenac riscontrato in tutte le stazioni analizzate. Livelli più elevati del farmaco si sono evidenziate nella stazione PM, seguita da CAN-E e SE con concentrazioni fino a 4,6 ng/g.

Tabella 5.3.2. Concentrazioni tissutali di Farmaci misurate nei mitili trapiantati per 28 giorni in diversi siti della Pialassa Piombone.

ng/g (peso fresco)	T0	CAN-E	IDRO	PM	SE	OVEST	CENTR
Etinilestradiolo	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Estradiolo	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Estrone	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Atenololo	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Ciprofloxacina	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Bezafibrato	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Carbamazepina	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Diclofenac	2,1	3,8	3,2	4,6	3,5	2,1	2,5
Naproxene	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Gemfibrozil	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Sistema esperto

L'integrazione dei risultati dei biomarker attraverso il Sistema Esperto ha permesso di assegnare a ciascuna delle 6 stazioni di monitoraggio della Pialassa Piombone un indice univoco che descriva la condizione di stress rilevata nei mitili esposti in situ per 28 giorni.

Come mostrato in Tabella 5.3.3, i siti CAN-E, SE e OVEST sono stati classificati come B, livello di stress debole, mentre gli altri siti sono classificati come C, livello di stress moderato. In nessuno dei siti analizzati le risposte fisiologiche osservate hanno dimostrato la presenza di livelli significativi di composti organici, così come confermato ulteriormente dall'analisi del bioaccumulo dei pesticidi risultati tutti al di sotto del limite di significatività dello strumento (dati non mostrati). Nei mitili esposti nei siti IDRO, SE, e CENTR le risposte osservate, soprattutto le variazioni dei livelli di metallotioneine, suggeriscono la presenza di livelli significativi di metalli. In un sito (CAN-E) viene segnalata la presenza di sostanze genotossiche.

Tabella 5.3.3: Integrazione dei dati tramite Sistema Esperto (SE). Il SE confronta i valori significativi di ogni biomarker rispetto al controllo per ottenere un fattore di alterazione (AF). Questi sono confrontati con specifici valori soglia per ottenere un livello di alterazione (AL), che viene integrato in un algoritmo per produrre un indice di stato di salute (HSI).

Biomarker	Profilo tossicologico		TO	CAN-E	IDRO	PM	SE	OVEST	CENTR
<i>Cell</i>									
LMS ^{PG}	Riduzione	AF	1,00	0,36**	0,64*	0,38**	0,54**	0,65**	0,42*
		AL	NV	--	-	--	-	-	--
LN	Aumento	AF	1,00	1,23*	1,23*	1,27**	1,02	1,12	1,09
		AL	NV	+	+	+	NV	NV	NV
LIF	Aumento	AF	1,00	2,30**	2,07**	2,39**	1,94**	2,24**	2,30**
		AL	NV	++	++	++	+	++	++
GST	A campana	AF	1,00	1,19	0,90	0,94	0,93	1,26	0,94
		AL	NV	NV	NV	NV	NV	+	NV
CAT	A campana	AF	1,00	0,63*	0,63*	0,73	0,52**	0,93	0,85
		AL	NV						
AChE	Riduzione	AF	1,00	0,89	1,11	1,12	0,97	1,25	1,46
		AL	NV						
MDA	A campana	AF	1,00	0,80	0,55**	0,63*	0,67	0,47**	0,67*
		AL	NV						
DAN dan.	Aumento	AF	1,00	3,58**	1,0	0,51	0,49	1,13	0,45
		AL	NV	+++	NV	NV	NV	NV	NV
MT	Aumento	AF	1,00	1,44	1,86*	1,28	3,08**	3,03**	2,25*
		AL	NV	+	+	+	+++	+++	++
<i>Tessuto</i>									
LIS/CIT	Aumento	AF	1,00	1,19**	1,24	1,34	1,08	1,49	1,65
		AL	NV	NV	+	+	NV	+	+
<i>Organismo</i>									
Sopravvivenza	Riduzione	AF	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
		AL	NV						
HSI			A	B	C	C	B	B	C

LMS, stabilita delle membrane lisosomiali misurata negli emociti; LN, lipidi neutri; LIF, lipofuscine; GST, glutatione-s-transferasi; CAT, catalasi; AChE, acetilcolinesterasi; MDA, malondialdeide; DAN dan., danno al DNA; MT, metallotioneine; LIS/CIT, rapporto volume lisosoma/citoplasma. GP, parametro guida. *p<0,05 vs TO, **p<0,01 vs TO. HSI: indice di stato di salute. Valori soglia di AF per biomarker con andamento a campana/incremento: NV (no variazione) = AF < 1,2; + = AF > 1,2. Valori soglia di AF per biomarker con andamento a riduzione: NV = AF > 0,8; - = AF < 0,8.

5.4 Discussione e Conclusioni

La Piallassa Piombone è una laguna costiera caratterizzata da forti pressioni antropiche come aree portuali ed industriali al contorno, caccia, pesca e fruizione indiscriminata delle risorse naturali. Queste pressioni in concomitanza a fenomeni naturali possono causare rilevanti squilibri e causare disturbi significativi sull'ecologia del sito.

Al fine di valutare la qualità ambientale della laguna e la possibile contaminazione di farmaci nel sito di interesse, è stato utilizzato un approccio biologico che ha impiegato i mitili come organismi sentinella, valutandone la sindrome da stress dopo 28 giorni di esposizione. Essendo animali fortemente tolleranti ai cambiamenti abiotici ed ai parametri biotici, sono modelli ottimali per studiare le alterazioni fisiologiche associate alla sindrome da stress e per dare un quadro generale della qualità ambientale degli ambienti di transizione (Franzellitti et al., 2010).

La batteria di biomarker analizzati in questo studio include diversi parametri relativi allo stato di salute generale dei mitili (LMS, LN, LIF, LIS/CIT), allo stress ossidativo (GST, CAT, MDA), allo stress neuro (AChE) e genotossico (danno primario al DNA) ed all'esposizione a metalli pesanti (MT). La presenza di farmaci e di composti organici in ambiente è stata invece valutata attraverso il bioaccumulo di queste sostanze nei tessuti dei mitili esposti.

La valutazione del tasso di mortalità degli organismi è l'indice di stress massimo. L'esposizione dei mitili dopo 28 giorni nelle sei stazioni della Piallassa Piombone non ha mostrato alcun tasso di mortalità, indicando che nell'area di studio le condizioni ambientali non erano sufficientemente gravi da causare la morte degli organismi esposti. Tuttavia, alterazioni importanti a livello cellulare e fisiologico possono manifestarsi negli organismi prima che subentrino danni irreversibili.

Il sistema lisosomiale delle ghiandole digestive dei mitili è coinvolto nei cambiamenti patologici che si verificano negli organismi esposti ai contaminanti ambientali tra cui gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) ed i policlorobifenili (PCBs) (Moore, 1988). La stabilità delle membrane lisosomiali negli emociti (LMS) è considerato un biomarker molto sensibile ed un indice di stato generale di salute che viene rapidamente modificato dall'esposizione ai contaminanti, come ampiamente dimostrato in studi condotti su molluschi sia in campo

(Franzellitti et al., 2010; Petrovic et al., 2004; Maranho et al., 2015) che in laboratorio (Franzellitti et al., 2015; Aguirre-Martinez et al., 2013). Inoltre è stato proposto come screening iniziale per la valutazione di impatto ambientale nell'approccio a due livelli (Viarengo et al., 2007). La riduzione di LMS ha mostrato una diminuzione significativa dello stato di salute dei mitili esposti nella Piallassa Piombone in tutte le stazioni analizzate. I dati ottenuti suggeriscono un'induzione della sindrome da stress all'interno della laguna con valori minimi di ritenzione del colorante nelle stazioni CAN-E e PM (60 min.). Pur mostrando una significativa alterazione dello stato di salute rispetto ai mitili di controllo (T0), questi valori definiscono una condizione di stress in cui gli animali sono comunque in grado di compensare (NRRT tra 50 e 120 min.), come definito dai valori soglia di Moore *et al.* (2006).

Molti contaminanti possono indurre alterazioni a carico del comparto lisosomiale con un conseguente accumulo di lipidi neutri (LN) e lipofuscine (LIF) nei lisosomi. Sebbene non siano direttamente correlati ad uno stress specifico, questi biomarker sono indice di uno stato di salute critico. Il contenuto di LN aumenta significativamente del 20% in tre delle sei stazioni analizzate, mentre il contenuto di LIF aumenta enormemente in tutte le stazioni rispetto ai mitili di controllo (incremento di circa di 2,5 volte). L'incremento significativo di entrambi i parametri suggerisce una condizione di stress generale e l'alterazione dello stato ossidativo degli organismi esposti in tutta la laguna, in accordo con i risultati del LMS. Analogamente, il rapporto volume lisosomi/citoplasma (LIS/CIT) tende ad aumentare significativamente (fino al 60%) nella maggior parte delle stazioni analizzate, indicando che sono in atto processi di autofagia come conseguenza di alterazioni dello stato redox degli organelli cellulari (Moore et al., 2008).

Il sistema detossificante è stato valutato tramite l'attività degli enzimi glutathione-S-transferasi (GST), catalasi (CAT) e contenuto di malondialdeide (MDA) nelle branchie dei mitili esposti. La GST è l'enzima principale che interviene nella fase II del processo di detossificazione degli xenobiotici (farmaci e composti organici polari) che ne permette l'eliminazione tramite la coniugazione del glutathione ridotto (Martín-Díaz et al., 2008). La CAT è un enzima antiossidante intracellulare coinvolto nei meccanismi di difesa contro i radicali liberi generati dai contaminanti ambientali. Vari studi hanno dimostrato la relazione tra gli enzimi del sistema

detossificante e l'esposizione a xenobiotici negli invertebrati acquatici (Cajaraville et al., 2000). La MDA è un prodotto intermedio della perossidazione lipidica ed è considerato un indice importante nelle analisi di danni chimici indotti da agenti inquinanti nei mitili (Giarratano et al., 2010).

Nessuna differenza è stata riscontrata nell'attività di GST, mentre l'attività della CAT è significativamente ridotta nelle stazioni CAN-E, IDRO e SE. Il contenuto di MDA è significativamente ridotto nelle stazioni IDRO, PM, OVEST e CENTR in cui si sono osservati anche valori più bassi per LMS. La risposta di questi enzimi ed intermedio di sintesi, segue un andamento a campana con un aumento iniziale dovuto alla sintesi seguito da una diminuzione dell'attività enzimatica/formazione del prodotto. Per questo, significative riduzioni di CAT e MDA, accompagnate a livelli ridotti di LMS ed aumento di LIF, indicano l'instaurarsi di una sindrome da stress, suggerendo alterazioni importanti a carico del sistema antiossidante. Questo si verifica soprattutto nei mitili esposti nelle stazioni CAN-E e PM.

Essendo l'area di studio fortemente impattata da pressioni antropiche (aree portuali ed industriali al contorno), l'interferenza causata da pesticidi ad uso agricolo è stata valutata tramite l'attività dell'enzima acetil-colin-esterasi (AChE), che viene tipicamente ridotta dalla presenza di questi composti. Nessuna differenza è stata riscontrata in nessuna delle sei stazioni analizzate in accordo con l'analisi dei pesticidi effettuata nei tessuti dei mitili esposti (dati non riportati) che non ha mostrato la presenza di questi composti all'interno della laguna. La presenza nella laguna di metalli pesanti è stata valutata attraverso il contenuto di metallotioneine (MT), proteine citoplasmatiche in grado di legare elevate quantità di metalli tossici, riducendone gli effetti avversi. Sono generalmente espresse nei tessuti degli animali e sono fortemente sovra regolate come conseguenza all'esposizione a metalli pesanti (Viarengo et al., 1999). Le MT sono state valutate nella ghiandola digestiva dei mitili esposti, dove se ne è riscontrato un sovra accumulo in 4 delle sei stazioni, con valori estremamente elevati (circa 3 volte) nelle stazioni SE e OVEST. E' stata osservata una chiara correlazione tra la diminuzione della LMS e l'aumento di LIF e contenuto di MT, come precedentemente riportato in diversi studi in campo (Franzellitti et al., 2010; Domouhtsidou et al., 2004). L'aumento di MT nella ghiandola digestiva indica dunque la presenza di metalli pesanti nell'area di studio, come

confermato dall'ulteriore analisi del bioaccumulo dei metalli nei tessuti dei mitili esposti (dati non mostrati).

Alterazioni genotossiche sono state riscontrate esclusivamente nei mitili trapiantati nella stazione CAN-E i cui livelli di danno primario al DNA sono di circa 4 volte superiori rispetto al T0. Queste alterazioni significative, in concomitanza con la diminuzione dell'attività di CAT, confermano lo stress ossidativo per questi organismi. Le rotture dei filamenti di DNA possono essere causate infatti anche dalla presenza di radicali liberi dell'ossigeno.

La riduzione della LMS indica una diminuzione dello stato di salute dei mitili esposti nella laguna Piailassa Piombone; l'accumulo di LIF nei lisosomi e l'aumento del volume LIS/CIT è in accordo con l'insorgenza di stress ossidativo. L'aumento nel contenuto di MT nella ghiandola digestiva suggerisce un'esposizione ai metalli pesanti e a ROS, confermato ulteriormente dall'aumento dei livelli del danno primario al DNA riscontrati in una stazione.

L'integrazione dei risultati dei biomarker attraverso il Sistema Esperto (Dagnino et al. 2007) ha permesso di assegnare a ciascuna delle 6 stazioni della Piailassa Piombone un indice univoco che descriva la condizione di stress rilevata nei mitili esposti *in situ* per 28 giorni (Tab.5.4.1). Questo sistema fornisce una classificazione riferita allo stato di salute dei mitili, a sua volta correlata alla qualità dell'acqua a cui i mitili sono stati esposti. La Piailassa Piombone presenta uno stato di media qualità con alcune aree in condizioni di stress debole (livello B) ed altre con moderata criticità (livello C, stress moderato).

Tabella 5.4.1. Valutazione dello stato di salute dei mitili attraverso SISTEMA ESPERTO

I dati relativi alle stazioni di monitoraggio sono confrontati con il campione di controllo (T0). Con il termine "eccesso" ci si riferisce a concentrazioni che disturbano lo stato di salute dei mitili.

	CAN-E	IDRO	PM	SE	OVEST	CENTR
Stato di salute	B	C	C	B	B	C
Eccesso di composti organici	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Eccesso di metalli	NO	SI	NO	SI	SI	SI
Effetti genotossici	SI	NO	NO	NO	NO	NO

La presenza di composti organici e di farmaci nella laguna è stata valutata attraverso l'analisi del bioaccumulo di queste sostanze nei mitili esposti per 28 giorni nella Piailassa. L'analisi ha

mostrato una maggiore concentrazione di IPA nei tessuti dei mitili prelevati nella stazione CAN-E e, in misura minore, nelle stazioni IDRO, OVEST e SE. Considerando la natura cancerogena e mutagena di questi composti, tali dati ben si correlano con l'eccesso di composti genotossici emerso dal Sistema Esperto per i mitili esposti nella stazione CAN-E. Dei dieci farmaci ricercati, solamente l'antiinfiammatorio diclofenac è stato riscontrato nei mitili di tutte le stazioni analizzate con valori più alti nelle stazioni PM, CAN-E e SE. L'accumulo di questo farmaco nei tessuti non sorprende in quanto presenta un coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ($\log K_{ow}$) $> 4,5$. Più questo valore è alto, tanto più la sostanza è lipofila e maggiore sarà la tendenza ad accumularsi nei tessuti. Secondo l'Environmental Protection Agency (EPA), farmaci con un $\log K_{ow} > 4,5$ devono essere considerati potenzialmente pericolosi per l'ambiente. Per tutti i farmaci di nuova sintesi con un $\log K_{ow} > 4,5$, sono previsti ulteriori prove di bioaccumulo, persistenza e tossicità prima della messa in commercio (linee guida EMEA 2006). L'Unione Europea ha recentemente inserito il diclofenac nella lista delle sostanze potenzialmente pericolose per l'ambiente (Dir. 2013/39) dopo che fece scalpore nel 2004 quando un'intera popolazione di avvoltoi asiatici morì in seguito all'ingestione di bestiame trattato con diclofenac (Oaks et al., 2004). Solitamente i farmaci non inducono effetti letali per gli organismi acquatici alle concentrazioni ambientali ($\text{ng-}\mu\text{g/L}$); tuttavia inducono cambiamenti del ciclo biologico, rallentano l'accrescimento od inducono deformità che possono portare ad una diminuzione della performance biologica della popolazione (Ankley et al., 2007). Il diclofenac nello specifico, anche a concentrazioni ambientali, è risultato avere degli effetti avversi sullo sviluppo larvale di mitili esposti alla sostanza per 48h (Fabbri et al., 2014).

In conclusione, le analisi effettuate sugli organismi esposti nella laguna non hanno rilevato alterazioni tali da rappresentare una minaccia immediata per la resilienza delle popolazioni di animali della Pialassa Piombone. Tuttavia, si osserva la sussistenza di condizioni ambientali correlate alla comparsa di effetti cronici che potrebbero generare nel lungo periodo un aumento della vulnerabilità delle specie autoctone in associazione ad ulteriori fattori di stress ambientale. La presenza di effetti sub-letali nei bivalvi filtratori è verosimilmente ascrivibile ad una maggiore sospensione di metalli pesanti ed IPA piuttosto che alla presenza di farmaci nell'ambiente. Infine, è stato possibile identificare 3 stazioni a maggiore criticità (CAN-

E, SE, IDRO), contraddistinte da una maggiore biodisponibilità di metalli pesanti ed IPA, come suggerito dalle analisi del bioaccumulo e dagli effetti osservati dall'integrazione dei biomarker nel Sistema Esperto.

5.5 Riferimenti Bibliografici

- Aguirre-Martínez GV, Owuor MA, Garrido-Pérez C, Salamanca MJ, Del Valls TA, Martín-Díaz ML. (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.
- Ankley GT, Brooks BW, Huggett DB, Sumpter JP. (2007) Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environ Sci Technol*. 41:8211–8217.
- Banni M, Dondero F, Jebali J, Guerbei H, Boussetta H, Viarengo A. (2007) Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast. *Biomarkers*. 12:369-383.
- Benedetti M, Giuliani ME, Regoli F. (2015) Oxidative metabolism of chemical pollutants in marine organisms: molecular and biochemical biomarkers in environmental toxicology. *Ann NY Acad Sci*. 1340:8-19.
- Cajaville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ*. 247:295–311.
- Dagnino A, Allen JI, Moore MN, Broeg K, Canesi L, Viarengo A. (2007) Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers*. 12:155-172.
- Domouhtsidou GP, Dailianis S, Kaloyianni M, Dimitriadis VK. (2004) Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers. Combination with trace metal concentrations. *Mar Pollut Bull*. 48:572-586.
- Ellman GL, Courtney KD, Andre V Jr, Feather-Stone RM. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 7:88-95.
- 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*. *Mar Environ Res*. 99:1-8.
- Franzellitti S, Buratti S, Capolupo M, Du B, Haddad SP, Chambliss CK, Brooks BW, Fabbri E. (2014) An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquat Toxicol* 151:14-26.
- Franzellitti S, Buratti S, Donnini F, Fabbri E. (2010) Exposure of mussels to a polluted environment: Insights into the stress syndrome development. *Comp Biochem Phys*. 152: 24–33.
- Franzellitti S, Buratti S, Du B, Haddad SP, Chambliss CK, Brooks BW, Fabbri E. (2015) A multibiomarker approach to explore interactive effects of propranolol and fluoxetine in marine mussels. *Environ Pollut*. 205:60-69.
- Giarratano E, Duarte CA, Amin OA. (2010) Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. *Ecotoxicol Environ Saf*. 73: 270-279.
- ICES. (2011) Report of the Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC), 14–18 March 2011, Copenhagen, Denmark. ICES CM 2011/ACOM:30. 265 pp.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-275.
- Maranhão LA, André C, Del Valls TA, Gagné F, Martín-Díaz ML. (2015) In situ evaluation of wastewater discharges and the bioavailability of contaminants to marine biota. *Sci Total Environ*. 538:876-887.
- Martín-Díaz L, Franzellitti S, Buratti S, Valbonesi P, Capuzzo A, Fabbri E. (2009) Effect of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarker and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*. 94:177-185.
- Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA. (2008) Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environ Pollut*. 151:631–640.
- Martínez-Gómez C, Benedicto J, Campillo JA, Moore M. (2008) Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. *J Environ Monit*. 10:490-499.
- Mimeault C, Trudeau VL, Moon TW. (2006) Waterborne gemfibrozil challenges the hepatic antioxidant defense system and down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor beta (PPARbeta) mRNA levels in male goldfish (*Carassius auratus*). *Toxicology*. 228:140-150.
- Moore MN, Kohler A, Lowe D, Viarengo A. (2008) Lysosomes and autophagy in aquatic animals. *Methods Enzymol*. 451:581-620.

- Moore MN. (1988) Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar Ecol Prog Ser.* 46:81-89.
- Nasci C, Nesto N, Monteduro RA, Da Ros L. (2002) Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (VE Italy). *Mar Environ Res.* 54:811–816.
- Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJ, Arshad M, Mahmood S, Ali A, Khan AA. (2004) Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature.* 427:630-633.
- Olive OP. (1988) DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen.* 11:487-495.
- Pearse AGE. (1972) Histochemistry, theoretical and applied, vol. 2. London: Churchill- Livingstone.
- Petrovic S, Semencic L, Ozretic B, Ozretic M. (2004) Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). *Mar Pollut Bull.* 49:713–720.
- Romeo M, Hoarau P, Garello G, Gnassia-Barelli M, Girare JP. (2003) Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ Pollut.* 122:369–378.
- UNEP/MED POL. (2006) Biological Effects Monitoring Programme; Mediterranean Action Planning Technical Reports Series, 166, 240 pp.
- UNEP/RAMOGÉ. (1999) Manual on the Biomarkers Recommended for the MED. POL. Biomonitoring Programme. UNEP, Athens.
- 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. *Comp Biochem Phys.* 146:281–300.
- Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri R. (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar Environ Res.* 44: 69–84.

6. Conclusioni Generali

Il problema della contaminazione da farmaci nell'ambiente acquatico è oggi una preoccupazione di livello mondiale, che ha ricevuto una notevole attenzione da parte della comunità scientifica. Gli organismi acquatici sono target importanti per studiare i potenziali effetti dei residui farmaceutici in ambiente. Sono infatti in grado di fornire delle risposte mirate circa i potenziali effetti avversi che questi composti possono avere su organismi che presentano gli stessi bersagli molecolari su cui i farmaci agiscono.

Il presente studio ha voluto valutare gli effetti sub-letali di farmaci di rilevanza ambientale su due specie d'interesse commerciale, il mitilo mediterraneo e l'anguilla europea. Queste due specie, oltre ad essere buoni bioindicatori della qualità ambientale, sono organismi edibili che ricoprono un ruolo socio-economico di estrema rilevanza sia a livello nazionale che mondiale. Essendo continuamente esposti per tutta la durata della loro vita a questi contaminanti attraverso le acque reflue, la valutazione dei possibili effetti avversi è di notevole importanza in un'ottica di salvaguardia ambientale e tutela della salute umana.

Lo studio si è focalizzato sulla valutazione degli effetti sub-letali per verificare se i farmaci fossero in grado di alterare i livelli più bassi dell'organizzazione biologica (processi cellulari o fisiologici) prima del manifestarsi di alterazioni irreversibili, in grado di compromettere la sopravvivenza e la resilienza degli organismi nel lungo periodo (Fig. 6.1).

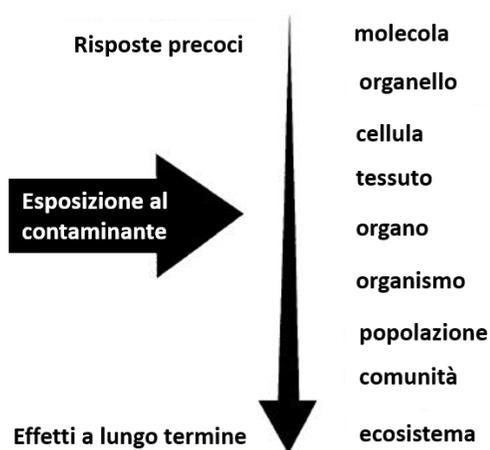


Fig. 6.1: Rappresentazione schematica della sequenza di risposte in seguito all'esposizione ad un contaminante all'interno di un sistema biologico. (Modificato da Van der Oost et al., 2003)

Gli effetti sono stati valutati attraverso lo sviluppo e l'applicazione di indicatori biologici in studi condotti sia in laboratorio che in campo.

Le conoscenze ottenute riguardo la fisiologia dell'anguilla europea, hanno permesso lo sviluppo di un indicatore biologico per valutare gli effetti di due farmaci β -bloccanti (propranololo ed atenololo) sul metabolismo glucidico epatico e le possibili conseguenze sulle risposte fisiologiche mediate dal principale ormone dello stress nei pesci, l'adrenalina. Le concentrazioni testate sono state realmente riscontrate nel sangue dei pesci esposti, ed i risultati ottenuti hanno mostrato la maggior efficacia del propranololo nell'alterare il metabolismo e di inibire l'adrenalina nella regolazione di questo processo, anche a concentrazioni più basse rispetto la dose terapeutica umana. Nonostante le concentrazioni testate siano state raggiunte nel sangue dei pesci dopo esposizione a concentrazioni più alte rispetto a quelle ambientali, i dati ottenuti forniscono delle informazioni utili in merito l'elevata sensibilità di questi organismi e permettono di dare delle valide indicazioni al fine della valutazione di rischio ambientale posto da farmaci.

L'ampia batteria di biomarker utilizzata, si è rivelata efficace per valutare gli effetti indotti dalla caffeina sullo stato generale di salute e sullo stress ossidativo nel mitilo. I risultati hanno evidenziato che la tossicità della caffeina è molto inferiore rispetto ad altri farmaci testati in precedenza nelle stesse condizioni sperimentali. Tuttavia, alterazioni a carico dello stato di salute degli organismi con conseguente induzione della sindrome da stress si è verificata già alle concentrazioni ambientali. Gli stessi biomarker si sono rivelati dei buoni indicatori per la valutazione della qualità biologica della laguna costiera Piailassa Piombone, nella quale tuttavia, i farmaci ricoprono un ruolo minoritario rispetto ad altri contaminanti.

La consolidata batteria di biomarker utilizzata sui mitili in condizioni controllate di laboratorio, ha permesso di identificare i farmaci di maggiore preoccupazione ambientale. Tuttavia, quando applicata in campo, dove la presenza di farmaci è combinata ad altri contaminanti (metalli, IPA *etc.*), la batteria di biomarker non è in grado di discriminare gli effetti derivanti esclusivamente dai farmaci. Questa limitazione nasce anche dal fatto che, ad oggi, non sono noti gli effetti dei farmaci su specifici meccanismi cellulari/molecolari negli invertebrati.

Diversamente nelle anguille, data l'elevata omologia nei bersagli molecolari e nei meccanismi cellulari coinvolti nella risposta adrenergica, la glicogenolisi, valutata in un sistema particolarmente sensibile (gli epatociti isolati perfusi in colonna), può essere considerata come un indicatore specifico di contaminazione da composti adrenergici. Questa metodologia potrebbe quindi trovare applicazione in ambito ambientale, per valutare il potenziale adrenergico delle sostanze inquinanti in matrici ambientali (es. acque trattate), in cui questi composti tendono a persistere anche dopo trattamento depurativo.

Infine, bisogna considerare che nell'ambiente naturale, gli organismi sono continuamente esposti a miscele di farmaci che potrebbero interagire tra di loro ed amplificare o modificare gli effetti sulla fisiologia degli organismi. Le caratteristiche intrinseche dell'ambiente marino, sono in grado di alterare le caratteristiche di questi composti, aumentandone gli effetti avversi sugli animali acquatici. Per questo motivo vi è la necessità di approfondire gli studi sugli organismi marini, cercando di riprodurre le situazioni dell'ambiente naturale, per l'implementazione di procedure da utilizzare nella valutazione di rischio ambientale posto da farmaci.

7. Attività di ricerca presso l'Università di Ottawa (Canada)



Glossario

5-HT	serotonina
CRF	fattore di rilascio della corticotropina
FK	forskolin
FLX	fluoxetina
ISO	isotocina
SERTa	trasportatore di membrana della serotonina
VT	vasotocina

7.1 Introduzione

Grazie ad una borsa di studio conferita dal programma Marco Polo, ho avuto l'opportunità di spendere 4 mesi nel laboratorio di endocrinologia comparata del Center for Advanced Research in Environmental Genomics (CAREG) dell'Università di Ottawa in Canada sotto la supervisione del Prof. Vance Trudeau.

Il progetto di ricerca, tutt'ora in corso, ha voluto indagare i possibili effetti del farmaco antidepressivo fluoxetina su neuropeptidi coinvolti nella risposta allo stress e nella riproduzione del ciprinide *Danio rerio*.

Molti organismi acquatici presentano comportamenti di stress dovuti alle fonti naturali come la difesa del territorio, la competizione per il cibo, l'interazione con altri organismi o l'esposizione a contaminanti. Negli esseri umani situazioni di stress persistente si traducono nell'impossibilità di far fronte a queste situazioni inducendo il disturbo d'ansia. Studi farmacologici hanno dimostrato che comportamenti legati all'ansia sono associati all'alterazione di almeno uno dei maggiori sistemi di neurotrasmissione nel cervello: uno di questi è il sistema serotonergico (serotonina). Questo neurotrasmettitore è coinvolto in numerosi meccanismi, ormonali e neuronali, e svolge un'importante funzione nell'assunzione del cibo, nei comportamenti sessuali e nella regolazione del ritmo circadiano. La serotonina è un neurotrasmettitore molto conservato, presente anche negli invertebrati (Fong, 1998), tuttavia gli effetti ad esso associati sono differenti.

Per capire il meccanismo che sta alla base dei comportamenti di stress ed ansia, vengono utilizzati modelli animali in grado di fornire delle risposte, fisiologiche e comportamentali, in seguito a situazioni di stress (Cryan e Sweeney, 2011). Il ciprinide *Danio rerio* è un modello emergente per capire questi comportamenti (Stewart et al., 2012) poiché presenta delle risposte fisiologiche simili a quelle che si manifestano nei mammiferi dopo esposizione a farmaci antidepressivi (Egan et al., 2009; Stewart et al., 2012).

Gli inibitori selettivi del reuptake della serotonina (SSRIs) sono i primi farmaci che vengono prescritti per alleviare i disturbi d'ansia (Westenberg, 2009). Quello maggiormente prescritto, con più di 24,4 milioni di prescrizioni solo negli Stati Uniti, è rappresentato dalla fluoxetina

(FLX). Costituisce il principio attivo del Prozac che viene utilizzato per il trattamento della depressione e dell'ansia sia negli adulti che nei bambini (Verispan Vona, 2007).

Il meccanismo d'azione della FLX e degli altri SSRI è il blocco specifico del trasportatore di membrana posto sul neurone presinaptico (*slc6a4*); in tal modo la FLX inibisce il reuptake sinaptico ed il conseguente recupero di serotonina (Wong et al., 1995).

La FLX viene metabolizzata nel fegato dal citocromo P4502D6 in norfluoxetina (nFLX) che, essendo strutturalmente simile alla FLX, risulta equipotente (Hiemke e Hartter, 2000). Circa l'11% della dose che viene ingerita è escreta tal quale attraverso le urine mentre il 7% viene escreta come nFLX (de Vane, 2000). Tra l'escrezione e l'inappropriato smaltimento, la FLX, assieme ad altri farmaci (Fent et al., 2006), è presente nella rete fognaria e negli impianti di depurazione (WWTP). E' abbastanza resistente all'idrolisi e alla fotolisi (Kwon e Armbrust, 2006) per cui tende a non essere completamente degradata dai WWTP. Concentrazioni particolarmente elevate di SSRI si riscontrano negli effluenti urbani (Metcalf et al., 2010) ed ospedalieri (Vasskog et al., 2008). Le concentrazioni ambientali raggiungono i 540 ng/L e presenta livelli di tossicità acuta tra i più elevati per gli organismi acquatici (Fent et al., 2006). Poiché è l'antidepressivo più venduto e sono presenti molti dati riguardanti la tossicologia acquatica di questa sostanza, la FLX è stata scelta come composto modello per studiare gli effetti dei SSRI (Oakes et al., 2010).

Diversi studi hanno dimostrato inoltre che la FLX tende a bioconcentrarsi nel tessuto cerebrale di ciprinidi, perciformi e siluriformi (Brooks et al. 2005; Chu and Metcalfe 2007; Ramirez et al. 2009, Schultz et al. 2010) dato il suo potenziale di bioaccumulo che tende ad aumentare in condizioni alcaline (Nakamura et al., 2008). Per tale motivo ha destato preoccupazione circa i potenziali effetti sub-letali sulla modulazione neuroendocrina nei processi fisiologici. Molti di questi processi sono modulati dalla serotonina nell'ipotalamo e nel telencefalo dei pesci, ed essendo questi i bersagli principali del farmaco, lo studio degli effetti come distruttore endocrino è di rilevante importanza.

L'obiettivo dello studio è stato quello di indagare il meccanismo con cui la FLX agisce nel cervello del ciprinide *Danio rerio* e le possibili interferenze sul sistema serotonergico. In particolare sono state valutate le alterazioni a carico dell'espressione genica dei geni che

codificano per neuropeptidi coinvolti nella risposta allo stress e nella riproduzione (fattore di rilascio della corticotropina, isotocina, vasotocina) e per il trasportatore di membrana adibito al reuptake della serotonina (*slc6a4*). Le variazioni sono state valutate dopo esposizione *in vivo* di sette giorni a FLX 0,54 µg/L (concentrazione ambientale) e 54 µg/L (dose terapeutica umana). Infine è stato condotto un esperimento preliminare per la messa a punto di un protocollo sperimentale *in vitro* al fine di valutare le alterazioni a carico dei geni d'interesse dopo esposizione a FLX, 5-HT e forskolin (FK).

7.2 Materiali e Metodi

Animali e condizioni sperimentali

Zebrafish adulti della specie *Danio rerio* sono stati acquistati da un rivenditore locale (Ottawa, ON, Canada) e mantenuti in acquari da 10 L (n = 30 per acquario) in un sistema chiuso di stabulazione. I pesci erano più o meno tutti della stessa taglia ed età. Tutti gli acquari contenevano acqua dechlorinata a 28°C in condizioni di aereazione costante. Gli animali erano mantenuti in condizioni di fotoperiodo 12:12h ed alimentati giornalmente con un mangime per zebrafish adulti. Le procedure sperimentali sono state approvate dal comitato etico e scientifico dell'Università di Ottawa in conformità con le linee guida istituzionali per la cura degli animali aderendo a quelle del Consiglio canadese sulla cura degli animali. Gli zebrafish sono stati selezionati per taglia e sessati. Solo gli animali maschi sono stati usati per gli esperimenti al fine di evitare possibili differenze dovute al sesso.

Esposizione in vivo

I pesci sono stati fatti acclimatare per tre giorni nei nuovi acquari prima di iniziare l'esposizione. Sono stati poi suddivisi in acquari (n = 13 per acquario) ed esposti per 7 giorni a due concentrazioni di FLX (Sigma-Aldrich): 0,54 µg/L (concentrazione massima ambientale) e 54 µg/L (dose terapeutica umana); più un trattamento di controllo. Gli animali venivano alimentati una volta al giorno e l'acqua veniva cambiata dopo un'ora dalla somministrazione del cibo al fine di mantenere bassi i livelli di ammoniaca e nitrati. Alla fine del periodo di esposizione, gli animali sono stati sacrificati ed il telencefalo e l'ipotalamo sono stati prelevati (pool di 4 tessuti/campione), congelati in ghiaccio secco e conservati a - 80°C per le successive analisi molecolari.

Esposizione in vitro

I pesci sono stati rapidamente sacrificati e il telencefalo e l'ipotalamo (pool da 3 tessuti/campione) sono stati prelevati, lavati tre volte con il mezzo di incubazione e trasferiti in piastre sterili da 12 pozzetti contenenti 2 mL di mezzo per pozzetto (Fig. 7.2.1). Il mezzo di incubazione era costituito da soluzione di Hanks' (pH 7,2) tamponata con HEPES (25 mM) ed

arricchita con glucosio (1 mg/mL). Sono stati aggiunti inoltre acido ascorbico (50 μ M) e bacitracina (50 μ M) per prevenire ossidazione e degradazione dei tessuti. L'esposizione è avvenuta in un incubatore termostato a 28°C per un tempo totale di 6 ore. Il telencefalo e l'ipotalamo sono stati esposti a:

- FLX 54 μ g/L (dose terapeutica umana)
- Serotonina (5-HT) 2130 μ g/L (10 μ M)
- Forskolina (FK) 4100 μ g/L (10 μ M), usato come controllo positivo

Il mezzo di incubazione veniva cambiato ogni 2 ore con soluzioni fresche contenenti le sostanze da testare alle concentrazioni opportune. Alla fine del periodo di incubazione i tessuti sono stati raccolti, congelati in ghiaccio secco e trasferiti a - 80°C per le successive analisi molecolari.

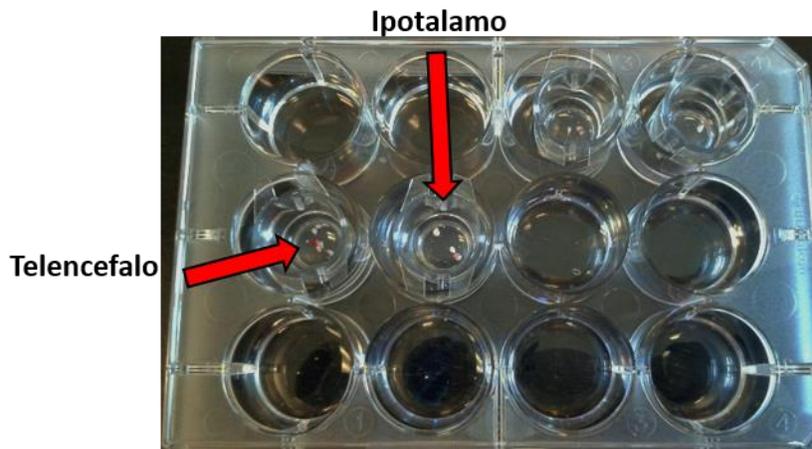


Fig. 7.2.1: Incubazione di telencefalo ed ipotalamo di zebrafish in piastre da 12 pozzetti

Estrazione di RNA e sintesi di cDNA dai tessuti

L'RNA totale è stato estratto dai tessuti di telencefalo ed ipotalamo utilizzando il protocollo TRIzol® Reagent (Life technologies) seguendo le specifiche riportate sul protocollo. La quantità di RNA è stata valutata usando Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e l'integrità è stata valutata tramite elettroforesi su gel d'agarosio. 200 ng di RNA sono stati denaturati a 70°C per 5 min. e successivamente fatti correre in un gel d'agarosio all' 1,1% a 110 v per 30 min. L'integrità è stata determinata mediante la visualizzazione delle sub unità 18S e 28S in assenza di sbavature

o altre bande che indicherebbero un RNA degradato o contaminato. 1 µg di RNA è stato retro trascritto a cDNA tramite il Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) utilizzando come trascrittasi inversa l'M-MuLV RT. Il cDNA formato è stato poi usato come template nel saggio di PCR real time (RT-PCR).

RT-PCR

Ogni campione era formato da un pool di 4 (esperimento *in vivo*) e 3 (esperimento *in vitro*) ipotalami o telencefali per assicurare sufficiente RNA durante la fase di estrazione. I primer sono stati disegnati utilizzando il software Primer 3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) e sintetizzati da Invitrogen (Tab. 7.2.1).

Tabella 7.2.1: Lista di primer usati nella PCR real-time quantitativa. CRF (fattore di rilascio della corticotropina), ISO (isotocina), VT (vasotocina), SERTa (trasportatore di membrana per la serotonina), Ef1a (fattore di elongazione 1 α)

Target mRNA	Sequenza primer 5'-3'	Amplicone (bp)
CRF	GCCGATTTCCCTAGATCTGAC TCTTTGGCTGATGGGTTTCG	147
ISO	TGGCCCATTCGACAGTGTAT AAATCCTCCTCCAGACAGCG	134
VT	GGAGCCCATCAGACAGTGTA TCCTCTCCATGCAGACCTG	132
SERTa	CGGAGGTGCGTTTGTGTGTA GCAGAAACGTGTTGTCCCAT	118
Ef1a	GAGCTTCTCCACCTACCTC TGCAGACTTTGTGACCTTGC	127

I primer sono stati ottimizzati per il protocollo di RT-PCR usando Maxima SYBR green qPCR Master Mix (Thermo Scientific). La reazione seguiva un ciclo a due-step tramite un ciclo di denaturazione iniziale a 95°C per 10 min., seguito da 40 cicli a 95°C per 15 sec (fase di denaturazione) ed una fase di annealing/estensione a 60°C per 45 sec.

La curva standard per ogni gene in ogni tessuto è stata costruita facendo delle diluizioni in serie partendo da un pool di cDNA da tutti i campioni sperimentali (controlli e trattati). Dopo ogni reazione di amplificazione è stata effettuata una curva di dissociazione (curva di melting) per verificare l'assenza di prodotti di amplificazione aspecifici che alterino la validità del risultato ottenuto. Per l'amplificazione e la rilevazione dei trascritti d'interesse è stato usato CFX96 Real-

Time PCR Detection System (Bio-Rad). Al termine della reazione i risultati relativi alle variazioni nell'espressione dei geni bersaglio nei trattamenti sperimentali sono stati espressi in termini di rapporti di induzione (fold change) rispetto al controllo sperimentale, normalizzati sui livelli di espressione del controllo endogeno.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con il software CFX Manager™ versione 2.0. La normalizzazione dei dati è stata effettuata utilizzando l'algoritmo NORMA-Gene (Heckmann et al. 2011). I dati sono espressi come “*fold change*” rispetto al controllo e presentati come la media \pm ES dell'espressione genica da 3 replicati biologici (n=3) (saggiati in duplicato) per ogni gruppo. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software SigmaStat 12.0. Differenze statisticamente significative tra i dati sono state determinate utilizzando ANOVA ad 1 via seguita dal test di Bonferroni come test *post hoc*.

7.3 Risultati

Esposizione in vivo

L'esposizione, della durata di 7 giorni, a FLX ha mostrato variazioni a carico dell'espressione genica dei 4 geni presi in esame.

In Fig. 7.3.1 sono mostrati i dati relativi l'espressione genica nel telencefalo. I livelli relativi di mRNA per CRF sembrano essere debolmente sotto espressi rispetto al controllo all'aumentare della concentrazione del farmaco anche se non in maniera significativa. Notevoli variazioni rispetto al controllo si sono osservate per i geni che codificano per ISO e VT i cui livelli di mRNA risultano essere sovra espressi. In particolare sono state riscontrate variazioni significative nell'espressione di ISO alla concentrazione più alta testata con livelli fino a 3 volte superiori rispetto al controllo. Per il gene VT differenze significative si sono riscontrate alla concentrazione più bassa testata (0,54 µg/L) i cui livelli di espressione risultano essere circa 1,7 volte più alti rispetto al controllo; alla concentrazione di 54 µg/L i livelli aumentano di circa 2,5 volte anche se non in maniera significativa. L'espressione del gene per il trasportatore di membrana della serotonina (SERTa) non sembra essere alterata all'aumentare della dose di FLX.

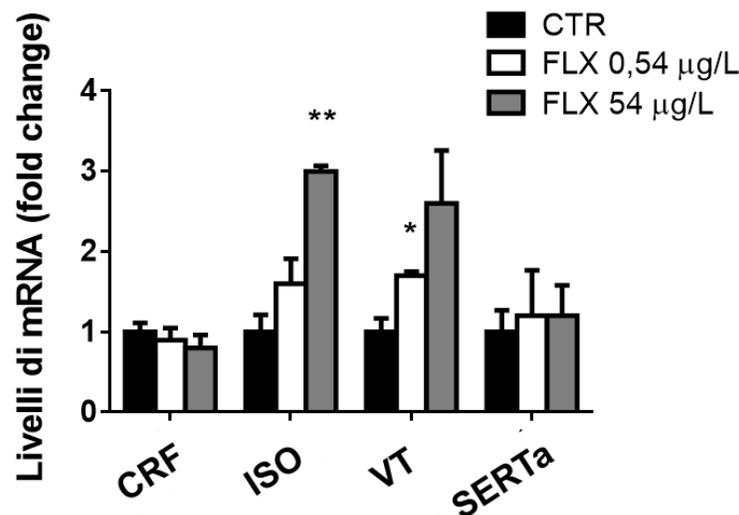


Fig.7.3.1: Effetti di FLX dopo 7 giorni di esposizione su: fattore di rilascio della corticotropina (CRF), isotocina (ISO), vasotocina (VT) e trasportatore della serotonina (SERTa) nel telencefalo di *Danio rerio*. Livelli di espressione relativa sono mostrati per il gruppo di controllo (barre nere), FLX 0,54 µg/L (barre bianche) e FLX 54 µg/L (barre grigie). I dati sono espressi come la media ± ES. Asterischi indicano differenze significative rispetto ai rispettivi controlli. * p < 0,05; ** p < 0,01.

I dati relativi l'espressione genica nell'ipotalamo sono mostrati in Fig. 7.3.2. Data l'elevata variabilità non si sono riscontrate differenze significative rispetto al controllo per nessuno dei 4 geni presi in esame. Tuttavia si può notare un aumento di circa 2,5 volte nei livelli di espressione per ISO alla concentrazione di 54 µg/L. I livelli di mRNA per VT tendono ad aumentare leggermente alla concentrazione di FLX più bassa testata per poi diminuire a quella più alta. Una sovra espressione fino a 2,5 volte rispetto al controllo si è riscontrata anche per SERTa ad entrambe le concentrazioni testate.

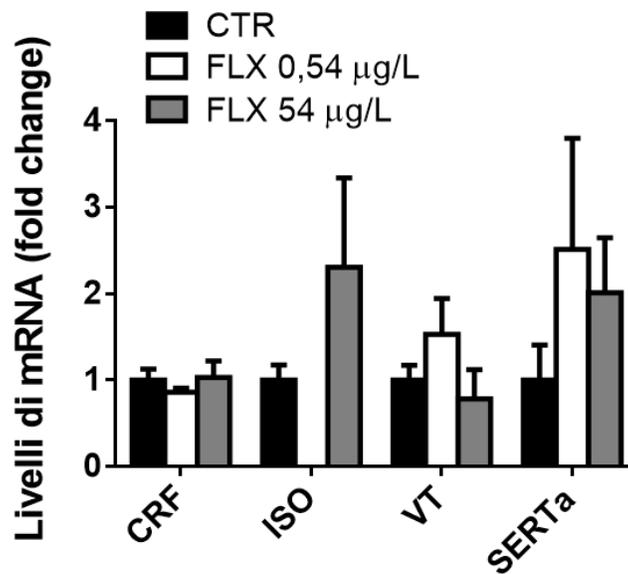


Fig.7.3.2: Effetti di FLX dopo 7 giorni di esposizione su: fattore di rilascio della corticotropina (CRF), isotocina (ISO), vasotocina (VT) e trasportatore della serotonina (SERTa) nell'ipotalamo di *Danio rerio*. Livelli di espressione relativa sono mostrati per il gruppo di controllo (barre nere), FLX 0,54 µg/L (barre bianche) e FLX 54 µg/L (barre grigie). I dati sono espressi come la media ± ES.

Esposizione in vitro

Dopo una prima messa a punto del protocollo per l'esposizione *in vitro* di telencefalo ed ipotalamo, è stato possibile valutare le alterazioni a carico dell'espressione dei 4 geni di interesse previa esposizione di 6 ore dei tessuti a diversi trattamenti: serotonina (5-HT) 10 μ M, forskolin (FK) 10 μ M (controllo positivo) e fluoxetina (FLX) 54 μ g/L (dose terapeutica umana).

In Fig. 7.3.3 sono mostrati i dati relativi l'espressione genica nel telencefalo. In tutti i geni d'interesse si è osservata una leggera sotto espressione, anche se non significativa, rispetto al controllo dopo esposizione a 5-HT 2130 μ g/L (10 μ M).

Il trattamento con FK 4100 μ g/L (10 μ M) ha mostrato un incremento di circa 1,5 volte nei livelli di CRF ed una diminuzione nei livelli di mRNA per gli altri geni presi in esame con differenze significative a carico del trasportatore di membrana per la serotonina (SERTa). L'esposizione a FLX 54 μ g/L ha mostrato una leggera sotto espressione nei livelli di CRF e ISO anche se non significativa.

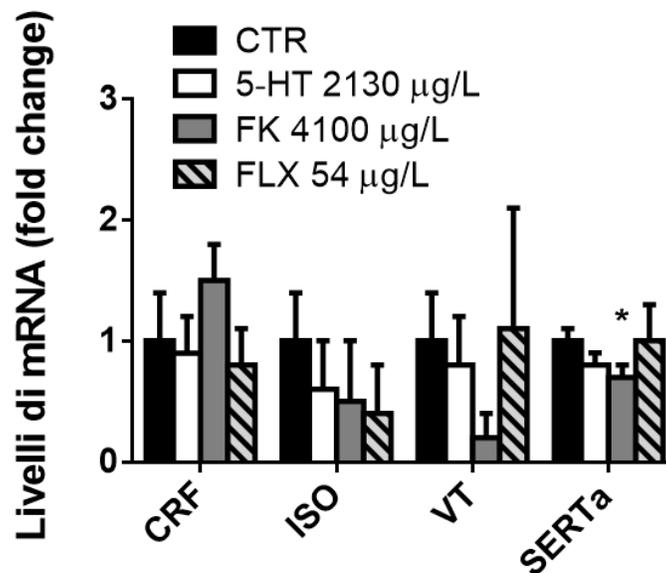


Fig.7.3.3: Effetti di FLX 54 μ g/L, 5-HT 10 μ M e FK 10 μ M dopo 6 ore di incubazione su: fattore di rilascio della corticotropina (CRF), isotocina (ISO), vasotocina (VT), trasportatore della serotonina (SERTa) nel telencefalo di *Danio rerio*. Livelli di espressione relativa sono mostrati per il gruppo di controllo (barre nere), 5-HT 10 μ M (barre bianche) FK 10 μ M (barre grigie) e FLX 54 μ g/L (barre a strisce). I dati sono espressi come la media \pm ES. Asterischi indicano differenze significative rispetto ai rispettivi controlli. * $p < 0,05$.

I dati relativi l'incubazione dell'ipotalamo sono mostrati in Fig. 7.3.4.

5-HT 10 μ M ha indotto un aumento nei livelli di mRNA per CRF ed ISO (pari a circa 3 volte) anche se non in maniera significativa. Un incremento significativo di circa 2,5 volte rispetto al controllo si è osservato per VT. Al contrario i livelli di SERTa tendono ad essere debolmente sotto espressi.

Il trattamento con FK 10 μ M non ha causato variazioni per i geni CRF, VT e SERTa. Si osserva un incremento di circa 4,5 volte rispetto al controllo per ISO anche se la variazione non risulta significativa.

Dopo esposizione a FLX 54 μ g/L, si riscontra una sovra espressione di circa 6 volte solo nei livelli di ISO anche se la variazione non risulta significativa, data ancora una volta l'elevata variabilità.

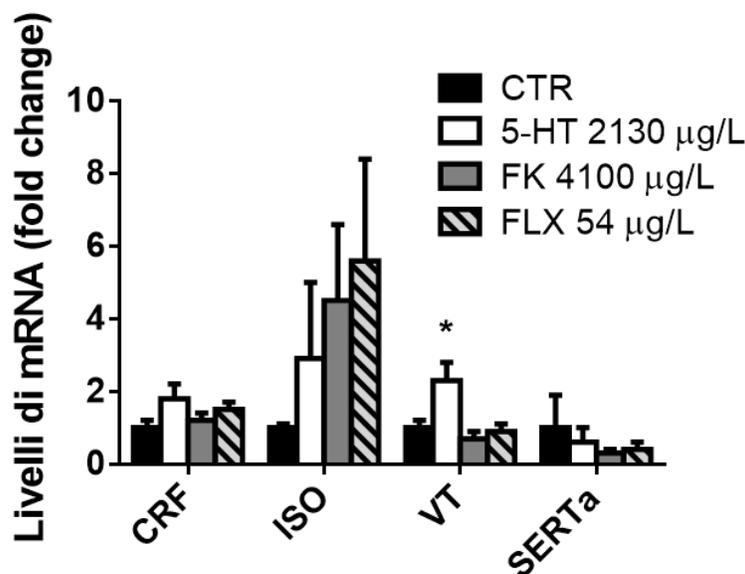


Fig. 7.3.4: Effetti di FLX 54 μ g/L, 5-HT 10 μ M e FK 10 μ M dopo 6 ore di incubazione su: fattore di rilascio della corticotropina (CRF), isotocina (ISO), vasotocina (VT), trasportatore della serotonina (SERTa) nell'ipotalamo di *Danio rerio*. Livelli di espressione relativa sono mostrati per il gruppo di controllo (barre nere), 5-HT 10 μ M (barre bianche) FK 10 μ M (barre grigie) e FLX 54 μ g/L (barre a strisce). I dati sono espressi come la media \pm ES. Asterischi indicano differenze significative rispetto ai rispettivi controlli. * $p < 0,05$.

7.4 Discussione e Conclusioni

Il presente studio ha esaminato se il farmaco antidepressivo fluoxetina (FLX) interferisce con i processi fisiologici nel cervello del ciprinide *Danio rerio* e le possibili interferenze sul sistema serotoninergico. La FLX ha ricevuto una notevole attenzione nella valutazione del rischio da contaminanti emergenti per la sua frequente presenza negli ambienti acquatici (Kolpin et al., 2002; Metcalfe et al., 2003); inoltre è considerato uno dei farmaci umani con la più alta tossicità acuta verso organismi non target (Fent et al., 2006). La FLX è il principio attivo del Prozac, il farmaco antidepressivo più prescritto, che rientra nella classe degli inibitori selettivi del reuptake della serotonina (SSRIs). Interferendo con il sistema serotoninergico, ha il potenziale di alterare innumerevoli funzioni fisiologiche nei pesci tra cui la riproduzione, la risposta allo stress ed il metabolismo (Mennigen et al., 2011). Inoltre dato il suo potenziale di bioaccumulo che tende ad aumentare in condizioni alcaline (Nakamura et al., 2008), viene maggiormente accumulata nel cervello, ponendo un rischio ancora più elevato per i pesci che si trovano continuamente a contatto con questa sostanza.

In particolare sono state valutate le alterazioni a carico dell'espressione dei geni che codificano per neuropeptidi coinvolti nella risposta allo stress e nella riproduzione (fattore di rilascio della corticotropina, isotocina, vasotocina) e per il trasportatore di membrana adibito al reuptake della serotonina (*slc6a4*).

Durante lo studio è stato condotto un esperimento sub cronico *in vivo* esponendo i pesci a due concentrazioni di FLX: la dose massima ambientale (0,54 µg/L) e la dose terapeutica (54 µg/L).

Le variazioni nell'espressione genica non hanno mostrato differenze significative rispetto al controllo per il gene che codifica per il fattore di rilascio della corticotropina (CRF) ne' nel telencefalo ne' nell'ipotalamo, a nessuna delle concentrazioni testate. Questo neuropeptide viene prodotto nell'area preottica del telencefalo dopo stimolazione dell'ipotalamo (Alderman and Vijayan, 2012), e regola molte vie fisiologiche nei vertebrati. Nei mammiferi è il principale neuropeptide che stimola la secrezione adrenocorticotropa e modula diversi processi biologici (Seasholtz et al., 2002). Nei pesci è coinvolto nella regolazione dell'asse ipotalamo – ipofisi – tessuto interrenale ed interviene principalmente nella risposta allo stress a lungo termine ma

anche in altri processi biologici come la riproduzione, l'assunzione del cibo e la regolazione del comportamento (Yao e Denver, 2007; Alderman e Bernier, 2009). I dati non sembrerebbero quindi mostrare un effetto della FLX nei livelli di espressione del peptide che regola la risposta allo stress a lungo termine, come invece osservato nello studio di Mennigen *et al.* (2009), condotto sul pesce rosso, in cui si osserva una sovra regolazione nell'ipotalamo dopo iniezione di una dose di 5 µg/g di FLX.

Variazioni significative si sono riscontrate nei livelli di espressione del gene che codifica per l'isotocina (ISO) nel solo telencefalo. L'ISO è un peptide neuroipofisario molto abbondante nel cervello dei pesci ed omologo dell'ossitocina dei mammiferi (Gwee et al., 2008). Nei pesci maschi, stimola i comportamenti riproduttivi, la steroidogenesi (Rodriguez e Specker, 1991), ma interviene anche nei comportamenti relativi allo stress e all'ansia (Wong et al., 2013).

In particolare i livelli di mRNA aumentano all'aumentare della concentrazione con valori fino a 3 volte superiori (FLX 54 µg/L) rispetto al controllo. Questi dati sono in accordo con lo studio di Wong *et al.* (2013) in cui si è osservata una sovra espressione nei livelli di mRNA dopo esposizione degli zebrafish a 100 µg/L di FLX. Un altro studio condotto sempre sullo zebrafish ha mostrato che iniezioni di isotocina diminuiscono la paura verso un predatore in maniera dose-dipendente (Braidà et al., 2012); l'esposizione a FLX, portando ad un aumento nei livelli del gene che codifica per ISO, suggerirebbe quindi un effetto ansiolitico nello zebrafish così come nei mammiferi.

La vasotocina (VT) è un peptide neuroipofisario omologo della vasopressina nei mammiferi (Gwee et al., 2008), coinvolto nella regolazione dei comportamenti riproduttivi in risposta ai feromoni (Thompson et al., 2008). E' stato visto che livelli alti di VT mRNA sono correlati positivamente con l'aggressività territoriale nel pesce *Thalassoma bifasciatum* (Semsar et al., 2004) e l'esposizione a FLX ha mostrato una sotto regolazione dei livelli di VT ed una diminuzione dei comportamenti aggressivi. I dati ottenuti in questo studio hanno invece mostrato un trend differente nei livelli di VT mRNA, in cui si è osservata una sovra espressione nel telencefalo all'aumentare della concentrazione di FLX con variazioni significative alla concentrazione ambientale (0,54 µg/L). Lo stesso risultato è stato ottenuto nel pesce rosso dopo esposizione di 14 giorni alle medesime concentrazioni di FLX (Mennigen et al., 2010).

L'esposizione a FLX quindi, potrebbe alterare la risposta del neuropeptide nei comportamenti riproduttivi in risposta ai feromoni ed aumentare l'aggressività nella competizione per il territorio.

I livelli di espressione del gene (*slc6a4a*) che codifica per il trasportatore di membrana della serotonina (SERTa) non ha mostrato variazioni significative rispetto al controllo a nessuna delle concentrazioni testate sia nel telencefalo che nell'ipotalamo. La sequenza nucleotidica di questo gene nello zebrafish ha un'omologia del 70% con quella umana e presenta le stesse caratteristiche funzionali, tra cui il riassorbimento della serotonina dalla fessura sinaptica al neurone, modulando la neurotrasmissione (Wang et al., 2006). Nel cervello dei teleostei, *slc6a4a* è espresso nei neuroni serotoninergici che si trovano nell'ipotalamo (Wang et al., 2006), nel telencefalo e nel bulbo olfattorio (Kah and Chambolle, 1983). I nostri dati sono in accordo con numerosi altri studi condotti sia su pesci che su mammiferi in cui trattamenti cronici di FLX non hanno alterato il trasportatore della serotonina (Wong et al., 2013; Mennigen et al., 2008; Lee et al., 2010). Gli SSRIs si legano ai trasportatori della serotonina per inibire la loro funzione, tuttavia, potrebbero non regolare l'espressione del gene. Sebbene diversi studi di microarray, focalizzati su una specifica regione del cervello, non hanno mostrato differenze significative nell'espressione del gene che codifica per il trasportatore della serotonina con i trattamenti di FLX (Mennigen et al., 2008; Lee et al., 2010), non si può escludere che altre regioni siano più specializzate nella regolazione del gene e dunque più influenzate dal farmaco.

L'esperimento *in vitro* ha mostrato un'elevata variabilità nei parametri analizzati, molto probabilmente imputabile al fatto che il protocollo sperimentale debba essere ulteriormente implementato. Il seguente studio è infatti tutt'ora in corso nel laboratorio e parte integrante di un altro progetto di dottorato. Pertanto i risultati ottenuti sono del tutto preliminari.

Per determinare l'efficienza del protocollo sperimentale, il telencefalo e l'ipotalamo sono stati esposti oltre che al farmaco, a serotonina (5-HT) e a forskolin (FK). 5-HT è il principale neuromodulatore nei processi biologici che regola la produzione dei neuropeptidi presi in esame. Il FK è un diterpene prodotto dalla pianta indiana *C. forskohlii*, comunemente usato in biochimica come strumento per innalzare i livelli di AMP ciclico nelle cellule (Huerta et al., 2010). Esso infatti, attivando l'enzima adenil ciclasi, aumenta i livelli intracellulari di AMPc, un

importante secondo messaggero che regola le risposte biologiche cellulari dopo stimolazione da parte di ormoni o di stimoli extracellulari.

L'esposizione di 6 ore a FLX alla dose terapeutica (54 µg/L), non ha indotto differenze significative nell'espressione dei geni analizzati né nel telencefalo né nell'ipotalamo. Differenze significative sono state riscontrate nell'ipotalamo in cui si è osservata una sovra regolazione di circa due volte, nel gene che codifica per VT dopo esposizione a 5-HT, l'aumento di VT può essere imputabile ad un effetto anoressigenico (inibizione dell'assunzione di cibo) di questo neuropeptide come dimostrato nello studio di Gesto *et al.* (2014). Il FK non ha indotto variazioni significative nei livelli di mRNA per i geni analizzati, eccezione fatta per i livelli di espressione del gene che codifica per il trasportatore di membrana della serotonina (SERTa), che tendono a diminuire in modo significativo nel telencefalo.

Lo studio, seppur preliminare, ha dimostrato gli effetti avversi della fluoxetina sul sistema serotonergico, un sistema che controlla numerosi processi fisiologici e biologici nei pesci così come nei mammiferi.

In particolare si è riscontrato che questo farmaco è in grado di alterare anche in maniera significativa l'espressione dei geni che codificano per i neuropeptidi che intervengono nella risposta allo stress, nella regolazione del ritmo circadiano, nei comportamenti riproduttivi e nella regolazione dell'assunzione del cibo. Queste evidenze, come mostrato da studi condotti in precedenza su altre specie di pesci, confermano l'ipotesi che la FLX agisca da interferente endocrino nei i pesci.

Lo studio è tutt'ora in corso, ed i risultati ottenuti verranno integrati con i dati relativi l'alterazione del comportamento nel ciprinide *D. rerio* esposto alle medesime concentrazioni di fluoxetina.

Il potenziale impatto della fluoxetina, già a concentrazioni riscontrabili nell'ambiente acquatico, è di rilevante interesse in un'ottica di valutazione di rischio ambientale e per la salvaguardia dell'ambiente e delle specie in esso presenti.

7.5 Riferimenti Bibliografici

- Alderman SL, Bernier NJ. (2009) Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol.* 164:61-69.
- Alderman SL, Vijayan MM. (2012) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in zebrafish brain: a functional role in hypothalamus-pituitary-interrenal axis regulation. *J Endocrinol.* 215:393-402.
- Braida D, Donzelli A, Martucci R, Capurro V, Busnelli M, Chini B, Sala M. (2012) Neurohypophyseal hormones manipulation modulate social and anxiety-related behavior in zebrafish. *Psychopharmacology (Berl).* 220:319-30.
- Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, and Lewis RJ. (2005) Determination of select antidepressants in fish from an effluent dominated stream. *Environ Toxicol Chem.* 24: 464–69.
- Chu S, and Metcalfe CD. (2007) Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. A* 1163:112–18.
- Cryan JF, Sweeney FF. (2011) The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *Br J Pharmacol.* 164:1129–1161.
- De Vane CL. (2000) Metabolism and pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Cell Mol Neurobiol.* 19:443-466
- Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavella PR, Elegante MF, Elkhayat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien DH, et al. (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res.* 205:38–44.
- Fent K, Weston AA, Caminada D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 76:122-159.
- Fong PP. (1998) Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biol Bull.* 194 (2):143-149
- Gesto M, Soengas JL, Rodríguez-Illamola A, Míguez JM. (2014) Arginine vasotocin treatment induces a stress response and exerts a potent anorexigenic effect in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Neuroendocrinol.* 26:89-99.
- Gwee P, Amemiya CT, Brenner S, Venkatesh B. (2008) Sequence and organization of coelacanth neurohypophyseal hormone genes: evolutionary history of the vertebrate neurohypophyseal hormone gene locus. *BMC Evol. Biol.* 8:93.
- Heckmann LH, Sørensen PB, Krogh PH and Sørensen JG. (2011) NORMA-Gene: A simple and robust method for qPCR normalization based on target gene data. *BMC Bioinformatics* 12:250.
- Hiemke C, Hartter S. (2000) Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther.* 85:11-28
- Huerta M, Urzúa Z, Trujillo X, González-Sánchez R, Trujillo-Hernández B. (2010) Forskolin compared with beclomethasone for prevention of asthma attacks: a single-blind clinical trial. *J Int Med Res.* 38:661–668.
- Kah O, Chambolle P. (1983) Serotonin in the brain of the goldfish, *Carassius auratus*. An immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 234:319-333.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. (2002) Pharmaceuticals, hormones, contaminants in U.S. streams 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol.* 36:1202–1211.
- Kwon JW, Armbrust KL. (2006) Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ Toxicol Chem.* 25:2561-2568.
- Lee JH, Ko E, Kim YE, Min JY, Liu J, Kim Y, Shin M, Hong M, Bae H. (2010) Gene expression profile analysis of genes in rat hippocampus from antidepressant treated rats using DNA microarray. *BMC Neurosci.* 11:152.
- Mennigen JA, Harris EA, Chang JP, Moon TW, Trudeau VL. (2009) Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain. *Regul Pept.* 155:99-104.
- Mennigen JA, Lado WE, Zamora JM, Duarte-Guterman P, Langlois VS, Metcalfe CD, Chang JP, Moon TW, Trudeau VL. (2010) Waterborne fluoxetine disrupts the reproductive axis in sexually mature male goldfish, *Carassius auratus*. *Aquat Toxicol.* 100:354-364.
- Mennigen JA, Martyniuk CJ, Crump K, Xiong H, Zhao E, Popesku J, Anisman H, Cossins AR, Xia X, Trudeau VL. (2008) Effects of fluoxetine on the reproductive axis of female goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol Genomics.* 35:273–282.

- Mennigen JA, Stroud P, Zamora JM, Moon TW, Trudeau VL. (2011) Pharmaceuticals as neuroendocrine disruptors: lessons learned from fish on Prozac. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 14:387-412.
- Metcalfe CD, Chu S, Judt C, Li H, Oakes KD, Servos MR, Andrews DM. (2010) Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environ Toxicol Chem.* 29:79-89.
- Metcalfe CD, Miao XS, Koenig BG, Struger J. (2003) Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ Toxicol Chem.* 22:2881-2889.
- Nakamura Y, Yamamoto H, Sekizawa J, Kondo T, Hirai N, Tatarazako N. (2008) The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere* 70:865-873.
- Oakes KD, Coors A, Escher B, Fenner K, Garric J, Gus tM, Knacker T, Kuster A, Kussatz C, Metcalfe CD, Monteiro S, Moon T, Mennigen JA, Parrott J, Pery AR, Ramil M, Tarazona JV, Sanchez-Arguello P, Ternes TA, Trudeau VL, Boucard T, Van der Kraak GJ, Servos M. (2010) An environmental risk assessment for the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine—a case study utilizing the European risk assessment framework. *Integr Environ Assess Manag.* 6:1-16.
- Ramirez AJ, Brain RA, Usenko S, Mottaleb MA, O'Donnell JG, Stahl LL, Wathen JB, Snyder BD, Pitt JL, Perez-Hurtado P, Dobbins LL, Brooks BW, and Chambliss CK. (2009) Occurrence of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in fish: Results of a national pilot study in the U.S. *Environ Toxicol Chem.* doi:10.1897/08-561.1.
- Rodríguez M, Specker JL. (1991) In vitro effects of arginine vasotocin on testosterone production by testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol.* 83:249-257.
- Schultz MM, Furlong, ET, Kolpin DW, Werner SL, Schoenfuss HL, Barber LB, Blazer VS, Norris DO, and Vajda AM. (2010) Antidepressant pharmaceuticals in two effluent-impacted U. S. streams: Occurrence and fate in water and sediment and selective uptake in fish neural tissue. *Environ Sci Technol.* 44:1918-25.
- Seasholtz AF, Valverde RA, Denver RJ. (2002) Corticotropin-releasing hormone-binding protein: biochemistry and function from fishes to mammals. *J Endocrinol.* 175:89-97.
- Semsar K, Perreault HA, Godwin J. (2004) Fluoxetine-treated male wrasses exhibit low AVT expression. *Brain Res.* 1029:141-147.
- Stewart A, Gaikwad S, Kyzar E, Green J, Roth A, Kalueff AV. (2012) Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology* 62:135-143.
- Thompson RR, Dickinson PS, Rose JD, Dakin KA, Civiello GM, Segerdahl A, Bartlett R. (2008) Pheromones enhance somatosensory processing in newt brains through a vasotocin-dependent mechanism. *Proc Biol Sci.* 275:1685-1693.
- Vasskog T, Anderssen T, Pedersen-Bjergaard W, Kallenborn R, Jensen E. (2008) Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *J Chromatogr. A* 1185:194-205.
- Verispan Vona. (2007) Top 200 generic drugs by units in 2007. Available at: <http://drugtopics.modernmedicine.com/drugtopics/data/articlestandard//drugtopics/072008/491181/article.pdf>
- Wang Y, Takai R, Yoshioka H, Shirabe K. (2006) Characterization and expression of serotonin transporter genes in zebrafish. *Tohoku J Exp Med.* 208:267-274.
- Westenberg HG. (2009) Recent advances in understanding and treating social anxiety disorder. *CNS Spectr.* 14:24-33.
- Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA. (1995) Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci.* 57:411-441.
- Wong RY, Oxendine SE, Godwin J. (2013) Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment. *BMC Genomics.* 14:348.
- Yao M, Denver RJ. (2007) Regulation of vertebrate corticotropin-releasing factor genes. *Gen Comp Endocrinol.* 153:200-216.