

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

**RISPOSTE DEL MOLLUSCO ANTARTICO *Adamussium colbecki* DOPO
ESPOSIZIONE AL PFOA IN CONDIZIONI CONTROLLATE DI
LABORATORIO**

Relatrice:

Prof. Paola Irato

Correlatrici:

Dr.ssa Sara Pacchini

Dr.ssa Elisabetta Piva

Laureanda: Caterina Iarvasini

Matricola: 2041724

Anno accademico: 2023/2024

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | |
| 1.1 ANTARTIDE | |
| 1.1.1 CARATTERISTICHE DEL CONTINENTE ANTARTICO..... | 1 |
| 1.1.2 LE SPECIE VIVENTI ANTARTICHE..... | 2 |
| 1.1.3 L'INQUINAMENTO IN ANTARTIDE..... | 2 |
| 1.1.4 PROGETTO ANTA-GPS..... | 3 |
| 1.2 PFAS | |
| 1.2.1 COSA SONO I PFAS..... | 3 |
| 1.2.2 CARATTERISTICHE E PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE DEI PFAS..... | 4 |
| 1.2.3 DISTRIBUZIONE DEI PFAS NELL'AMBIENTE..... | 4 |
| 1.2.4 PERICOLOSITÀ E TOSSICITÀ DEI PFAS..... | 5 |
| 1.3 ROS..... | 5 |
| 2. SCOPO DELLA TESI..... | 7 |
| 3. MATERIALI E METODI | |
| 3.1 SPECIE TARGET..... | 8 |
| 3.2 OMOGENEIZZAZIONE DEI TESSUTI..... | 8 |
| 3.3 DOSAGGIO PROTEICO SECONDO LA METODICA DI <i>LOWRY ET AL. (1951)</i> ...9 | |
| 3.4 SAGGIO DELL'ATTIVITÀ DELLA SUPEROSSIDO DISMUTASI SECONDO LA METODICA DI <i>CRAPO ET AL. (1978)</i> | 12 |
| 3.5 DOSAGGIO DELL'ATTIVITÀ CATALASICA SECONDO LA METODICA DI <i>LIVINGSTONE ET AL. (1992)</i> | 11 |
| 3.6 DOSAGGIO DELLA GLUTATIONE PEROSSIDASI SECONDO LA METODICA DI <i>LIVINGSTONE ET AL. (1992)</i> | 13 |
| 3.7 ANALISI STATISTICA..... | 14 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE..... | 15 |
| 5. CONCLUSIONI..... | 21 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 22 |
| 7. SITOGRAFIA..... | 25 |

1 INTRODUZIONE

1.1 ANTARTIDE

1.1.1 CARATTERISTICHE DEL CONTINENTE ANTARTICO

L'Antartide si trova nell'emisfero australe, al polo Sud, e si estende per 13,8 milioni di km². (Figura 1.1).

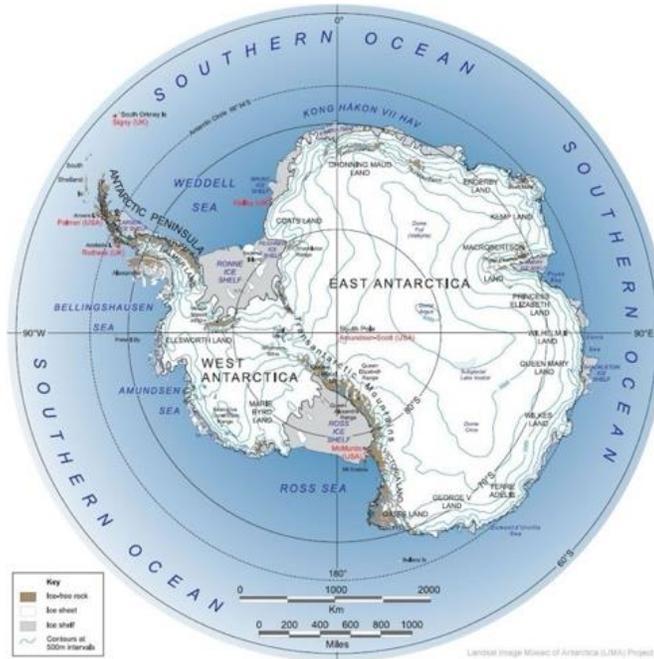


Figura 1.1: Il continente Antartico, PNRA.

Il continente Antartico è ricoperto prevalentemente da ghiaccio (calotta glaciale antartica) e solo lo 0,18% è privo di esso (Chu et al., 2019). Le aree senza ghiaccio sono chiamate “Dry Valleys”, hanno un clima freddo-desertico, con intervalli di temperatura media annua da -17 a -25 °C. In queste regioni l’acqua liquida scarseggia anche perché ci sono solamente precipitazioni nevose (Cassaro, 2021). In generale l’Antartide è un continente estremamente freddo, ventoso e arido: queste caratteristiche portano ad un’assenza quasi totale di vegetazione e alla generazione di condizioni ambientali estreme. Il confine di questa regione è un limite oceanografico, detto Convergenza Antartica o Fronte Polare Antartico. La Convergenza Antartica è un'area larga circa 40 km che circonda l’Antartide fra i 45° e 60° Sud ed è percorsa da una corrente marina che ruota in senso orario. Si crea così una sorta di “barriera” tra l’Oceano Antartico e gli altri oceani che lo circondano (Atlantico, Pacifico e Indiano) a causa della differenza di temperatura delle masse d’acqua e altre proprietà fisico-chimiche. La presenza della Corrente Antartica ha isolato questo continente, in quanto ha impedito gli scambi di vita per circa 20 milioni di anni. Per questo motivo l’Antartide è considerata un’area

geografica unica ed è utilizzata per lo studio dell'adattamento di particolari organismi (PNRA, 2019).

1.1.2 LE SPECIE VIVENTI ANTARTICHE

Le specie terrestri viventi in questo ambiente sono in numero molto limitato, date le condizioni estreme in cui si trovano: le basse temperature, la scarsità di acqua assimilabile, la scarsità di nutrienti ed il fatto che per gran parte del tempo ci sia una radiazione solare scarsa o nulla. Ci sono comunque delle specie che sono riuscite ad adattarsi e sono sopravvissute negli anni diversificandosi ed evolvendosi insieme all'ambiente circostante (PNRA, 2019). Il fattore che principalmente ha influenzato la scarsità di specie viventi animali e vegetali è la scarsa biodisponibilità di acqua liquida: per questo motivo gli organismi che si sono adattati a vivere nel continente antartico sono tolleranti alla disidratazione, hanno cicli di vita lunghi con lenti tassi di crescita e bassi tassi di riproduzione. In generale la vita è più concentrata nelle zone costiere prive di ghiaccio, dove la temperatura è mitigata dal mare e le precipitazioni nevose sono maggiori (Bargagli, 2008). Inoltre, la vita è legata anche alla presenza di uccelli marini, i quali, con il loro guano, arricchiscono di nutrienti il substrato, favorendo così la proliferazione di microrganismi resistenti al freddo e alla disidratazione (PNRA, 2019).

Uno degli aspetti più impressionanti degli ecosistemi antartici è il sorprendente contrasto tra l'estremo impoverimento degli ecosistemi terrestri e la ricchezza e l'elevata biomassa degli organismi marini. L'Oceano Antartico con le sue caratteristiche stabili e costanti nel tempo si è rivelato un'ambiente ottimale per la crescita e la proliferazione di alcuni organismi marini. Molti di questi si sono evoluti fino ad ottenere le qualità ideali per sopravvivere in queste condizioni: longevità, endemismo, gigantismo, lenti tassi di crescita, maturazione ritardata e assenza di stadi larvali pelagici (Bargagli, 2008).

1.1.3 L'INQUINAMENTO IN ANTARTIDE

L'Antartide sebbene sia un continente isolato non è esente dall'inquinamento da parte dell'uomo.

Nonostante ci siano delle "barriere" naturali, come la circolazione oceanica e atmosferica, nel continente antartico sono stati rilevati degli inquinanti (principalmente metalli pesanti e pesticidi) provenienti da altri continenti. Nell'ambiente antartico sono state rilevate nuove classi di contaminanti chimici: ciò è dovuto soprattutto alla crescita della popolazione e allo sviluppo industriale in molti paesi dell'emisfero australe (Bargagli, 2008).

I contaminanti antropici ritrovati in Antartide derivano sia da fonti globali (tramite trasporto atmosferico a lungo raggio) sia da fonti locali (le basi di ricerca scientifica).

Le attività umane, soprattutto se nelle vicinanze delle stazioni di ricerca, le quali si trovano prevalentemente nelle aree libere dai ghiacci in prossimità delle coste, rappresentano la

principale causa locale di inquinamento in Antartide. Le regioni prive di ghiacci sono molto ridotte, ma sono anche di fondamentale importanza in quanto ospitano la maggior parte della biodiversità animale terrestre e vegetale dell'intero continente antartico. Per questo motivo i suoli antartici sono estremamente vulnerabili all'impatto antropico.

I contaminanti in Antartide sono sia di tipo organico che inorganico, in particolare quelli organici includono i POP (Persistent Organic Pollutant) e pesticidi, come il diclorodifeniltricloroetano (DDT). I contaminanti inorganici sono prevalentemente metalli pesanti, quali rame (Cu), piombo (Pb), mercurio (Hg), cromo (Cr), cadmio (Cd) e arsenico (As). Le preoccupazioni riguardanti i metalli pesanti sono legate agli effetti che questi possono avere sull'uomo e su altri organismi viventi animali e vegetali. A causa di ciò alcune aree dell'Antartide sono state designate come Aree Antartiche Specialmente Protette (ASPA), in modo da proteggere questi ambienti dai disturbi umani (Chu et al., 2019).

1.1.4 PROGETTO ANTA-GPS

Il progetto ANTA-GPS è finanziato dal programma Nazionale di Ricerche in Antartide (PNRA), nato nel 1985 in seguito alla firmata parte dell'Italia, del Trattato Antartico. Lo scopo principale del PNRA è quello di fungere da founding agency della ricerca nazionale antartica (PNRA, 2019).

In particolare, il progetto ANTA-GPS (Antarctica as a Global Pollution Sensor) ha l'obiettivo di rendere l'Antartide un sensore dell'inquinamento utilizzando come bioindicatori specie endemiche. Con questo progetto di ricerca si vogliono monitorare alcuni inquinanti, sia tradizionali che emergenti, valutarne l'andamento negli ultimi anni e studiarne gli effetti. I risultati di questa ricerca forniranno i dati per creare un quadro generale dell'inquinamento globale e delle strategie di mitigazione e protezione (Anta-GPS, 2021).

1.2 PFAS

1.2.1 COSA SONO I PFAS

I PFAS (sostanze alchiliche perfluorate e polifluorate) sono una grande classe di composti chimici sintetici molto utilizzati in ambito industriale e di consumo, commercializzati da oltre mezzo secolo. Molti di essi a causa della loro elevata stabilità chimica e delle proprietà tensioattive sono stati dichiarati tossici e bioaccumulabili nelle reti trofiche (Casas et al., 2020). Si tratta di più di 4700 sostanze, per molte delle quali ci sono poche conoscenze riguardo le loro proprietà, gli utilizzi e i profili tossicologici, nonostante siano attualmente in uso.

Secondo la definizione di Buck et al. (2011), i PFAS sono delle sostanze alifatiche che contengono uno o più atomi di C su cui tutti gli atomi di H (presenti nelle sostanze non fluorurate da cui teoricamente derivano) sono stati sostituiti da atomi di F, in modo tale da

ottenere la frazione C_nF_{2n+1} , dove n è maggiore o uguale a 1. Successivamente sono state considerate PFAS anche quelle sostanze che presentavano una frazione del tipo C_nF_{2n} , come ad esempio acidi perfluorodicarbossilici (Glüge et al., 2020).

I PFAS più studiati e noti sono l'acido perfluorooctanoico (PFOA), l'acido perfluorooctano solfonico (PFOS), l'acido perfluoroesanosolfonico (PFHxS) e l'acido perfluorononanoico (PFNA) (Bonato et al., 2020).

1.2.2 CARATTERISTICHE E PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE DEI PFAS

I PFAS hanno la caratteristica di essere molto stabili per il legame C-F che è estremamente forte (Buck et al., 2011). In particolare il fluoro, essendo l'elemento più elettronegativo della tavola periodica, quando viene legato al carbonio forma uno dei legami singoli più forti e inerti trovati nei composti organici con un'energia di dissociazione del legame fino a $531,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ in PFAS. Pertanto, i PFAS, rispetto alle loro controparti idrocarburiche, hanno una stabilità chimica e fisica molto più elevata (Leung, 2023). La loro stabilità chimica e termica, oltre alla natura idrofoba e lipofobica, porta a proprietà altamente utili e durature nei tensioattivi e nei polimeri in cui sono incorporati (Buck et al., 2011). I PFAS hanno caratteristiche particolari che li rendono unici, come un'elevata resistenza al calore e agli agenti chimici e una bassa energia superficiale. Ciò garantisce loro alta versatilità, resistenza, resilienza e durata, per questo il loro uso è diffuso in molte applicazioni tecniche (Bonato et al., 2020).

1.2.3 DISTRIBUZIONE DEI PFAS NELL'AMBIENTE

Al giorno d'oggi i PFAS si trovano in tutto il mondo, comprese le parti più remote del globo terrestre, come il Polo Nord e il Polo Sud. Non ci sono ancora prove di biodegradazione di PFCA e PFAS, i quali oltre ad essere prodotti direttamente, sono anche il risultato terminale della biodegradazione di prodotti a base di perfluorooctanilfluoro e fluorotelomero. L'ampio utilizzo di questi composti, insieme alla loro persistenza, ha portato ad una dispersione globale (Bonato et al., 2020). La loro presenza nell'ambiente deriva dal loro uso industriale e dal successivo rilascio nell'ambiente, dall'uso e dallo smaltimento di prodotti di consumo che possono contenerli come impurità e dalla degradazione abiotica o biotica di derivati funzionali più grandi e polimeri che contengono una frazione di perfluoroalchilici che si degradano nell'ambiente per formare PFOS, PFOA e sostanze simili. Queste sostanze precursori sono soprattutto utilizzate commercialmente e possono essere rilasciate nell'ambiente da materie prime e prodotti industriali e da prodotti e articoli di consumo (Buck et al., 2011). Anche se i principali produttori di PFOS/PFOA hanno per lo più gradualmente eliminato e interrotto la produzione per anni, i PFAS non si degradano in ambiente in condizioni normali, ma possono subire cambiamenti fisico-chimici per formare composti di catene alchiliche più piccole, che però hanno una tossicità ancora maggiore (Leung, 2023).

I PFAS sono onnipresenti in tutti gli oceani e per molti anni si è pensato che le correnti oceaniche fossero il loro principale meccanismo di trasporto globale. Tuttavia, i PFAS sono stati segnalati anche in aree terrestri lontane dalla costa e in regioni remote. Questo è il caso dell'Antartide e di parti dell'Oceano Antartico, dove il trasporto marittimo dagli oceani Atlantico, Pacifico e Indiano è limitato dalla Corrente Circumpolare Antartica, che funge da barriera per lo scambio. Nonostante ciò, alcune specie di PFAS sono state trovate nelle acque antartiche costiere. Quindi le correnti marine potrebbero non essere il principale meccanismo di trasporto dei PFAS nell'Antartide marittima. Le concentrazioni atmosferiche di PFAS hanno dimostrato che essi sono onnipresenti nell'atmosfera oceanica, compreso l'oceano meridionale, che è coerente con il loro arrivo sulla costa antartica tramite trasporto atmosferico e successiva ossidazione e deposizione atmosferica, piuttosto che con il trasporto diretto da correnti oceaniche. Pertanto, come per i POP semivolatili, la deposizione a umido può svolgere un ruolo importante sul trasporto di PFAS, non solo per le regioni polari, ma attraverso diverse zone climatiche. (Casas et al., 2020).

1.2.4 PERICOLOSITÀ E TOSSICITÀ DEI PFAS

Secondo la classificazione PubChem, ci sono oltre 7 milioni di specie di sostanze chimiche PFAS trovate a livello globale e sono in continua crescita. Tra tutti i PFAS, l'acido perfluorocatansulfonico (PFOS) e l'acido perfluorootanoico (PFOA) hanno la storia di produzione più lunga e la loro tossicità è stata ben documentata. Di conseguenza, il PFOA, il PFHxS, il PFOS e il fluoruro di solfonile perfluorootano (PFOSF), nonché i loro sali e le sostanze ad essi correlate sono stati aggiunti all'elenco dei nuovi inquinanti organici persistenti (POP) ai sensi della Convenzione di Stoccolma. Inoltre, studi sugli animali hanno dimostrato che l'esposizione cronica ai PFAS porta a grandi rischi per la salute per quanto riguarda l'immunotossicità e la cancerogenicità. È stato dimostrato che l'esposizione ai PFAS ostacola anche la crescita e lo sviluppo del feto ed è correlata con disfunzione ormonale e altre malattie come la colite ulcerosa, l'ipertensione e il colesterolo alto. (Leung, 2023).

Il consumo di cibo e acqua contaminati è considerato la principale via di esposizione umana, in particolare il consumo di pesce, carne e uova. L'acqua potabile può anche essere una via di esposizione dominante, se la fonte d'acqua si trova in un'area contaminata da PFAS (Bonato et al., 2020).

1.3 ROS

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono delle sostanze reattive contenenti ossigeno, tra cui radicali liberi come l'idrossile ($\bullet\text{OH}$) e il superossido ($\text{O}_2\bullet^-$), e specie non radicaliche come il perossido di idrogeno (H_2O_2). La loro reattività è data dal fatto che possiedono uno o più elettroni spaiati (Demirci-Çekiç et al., 2022). Le ROS sono generate nei mitocondri e possono facilmente ossidare altre molecole (Sena & Chandel, 2012). La loro formazione avviene

durante la respirazione aerobia a causa dell'assorbimento graduale degli elettroni da parte dell'ossigeno molecolare da vari substrati. In un organismo sano può normalmente essere bilanciata dagli antiossidanti (AOX), che hanno il compito di controllare la quantità di ROS. Il sistema AOX cellulare è costituito da una serie di componenti tra cui specie enzimatiche e non enzimatiche: superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutazione perossidasi (GPx) come specie enzimatiche e glutazione come specie non enzimatica. La funzione della SOD è quella di catalizzare la reazione di dismutazione di $O_2^{\bullet-}$ con prodotti finali di O_2 e H_2O_2 . CAT e GPx scompongono H_2O_2 in H_2O e O_2 .

L'aumento della formazione di ROS è correlato quindi con un aumento delle difese antiossidanti perché queste hanno come scopo quello di bilanciare la produzione di ROS. Quando la sovrapproduzione delle ROS non può essere controbilanciata dalle difese antiossidanti, si ha uno sbilanciamento dell'equilibrio a favore degli ossidanti e conseguente stress ossidativo. Alti livelli di stress ossidativo sono dannosi per le macromolecole, in quanto le possono danneggiare o provocare addirittura la morte cellulare (Demirci-Çekiç et al., 2022).

2. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questo elaborato è quello di osservare le risposte del mollusco bivalve *Adamussium colbecki* dopo esposizione ad un inquinante facente parte del gruppo dei PFAS, ovvero l'acido perfluorooottanoico (PFOA). È stato confermato che l'acido perfluorooottanoico provochi a livello molecolare un'alterazione nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), seguita da uno squilibrio redox cellulare. Dato che ciò può causare danni a livello cellulare, gli organismi, per proteggersi, hanno sviluppato dei sistemi antiossidanti basati sull'utilizzo di enzimi. In particolare, in questo elaborato sono state studiate le attività degli enzimi catalasi (CAT), glutatione perossidasi (GPx) e superossido dismutasi (SOD).

È stata utilizzata una concentrazione di PFOA pari a 15 µg/L, alla quale sono stati esposti individui di *Adamussium colbecki* per un tempo totale di 10 giorni. Gli organi analizzati per osservare eventuali risposte enzimatiche sono stati le branchie e la ghiandola digestiva.

Le branchie svolgono varie funzioni vitali, quali respirazione, osmoregolazione ed escrezione e sono il sito principale per lo scambio dei gas. Sono organi sensibili e possono essere facilmente danneggiati da molti inquinanti presenti anche a basse concentrazioni. Hanno una grande superficie di contatto esterna e sono particolarmente suscettibili ai cambiamenti chimici e fisici nell'ambiente acquatico. Ciò le rende ottimi organi target per studi di esposizione a contaminanti. Le branchie vengono utilizzate in studi istopatologici per valutare gli effetti dei contaminanti sulla salute di organismi marini nell'ambiente e per cercare di stabilire una relazione causale tra l'esposizione a sostanze tossiche e le varie risposte biologiche (Flores-Lopez & Thomaz, 2011).

Le ghiandole digestive sono state scelte perché sono degli organi bersaglio molto usati in tossicologia ambientale in quanto accumulano inquinanti e partecipano alla disintossicazione dell'organismo e all'eliminazione delle sostanze nocive (Garmendia, 2011).

3. MATERIALI E METODI

3.1 SPECIE TARGET

La specie target utilizzata è il mollusco bivalve *Adamussium colbecki* (Fig. 3.1), una specie chiave per il monitoraggio dell'ambiente antartico. Questo mollusco è uno tra i più grandi bivalvi che vive nelle fredde acque dell'oceano Antartico (Peck et al., 2007). Si può trovare all'interno di popolazioni piuttosto dense e vive a profondità che possono raggiungere i 1300 m sotto il livello del mare (Greco et al., 2023). È considerata una “specie sentinella” per monitorare l'impatto del disturbo ambientale da parte dell'uomo. Per questo lo studio delle risposte biologiche indotte a livello biochimico/subcellulare può essere particolarmente utile, poiché variazioni simili rappresentano biomarcatori sensibili per la diagnosi precoce dell'esposizione/tossicità indotta da diverse condizioni stressanti (Regoli et al., 2002).



Figura 3.1: *Adamussium colbecki*, PNRA

3.2 OMOGENEIZZAZIONE DEI TESSUTI

Il primo passaggio effettuato per svolgere le analisi sui tessuti è stato quello di omogeneizzarli. Si è preparato un tampone di omogeneizzazione con Tris-HCl 20 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, DDT 1 mM, Saccarosio 0.5 M e KCl 0.15 M. Il tampone è stato poi aggiunto al tessuto, in quantità quadrupla rispetto ad esso, prima di utilizzare il Polytron (Fig. 3.2).

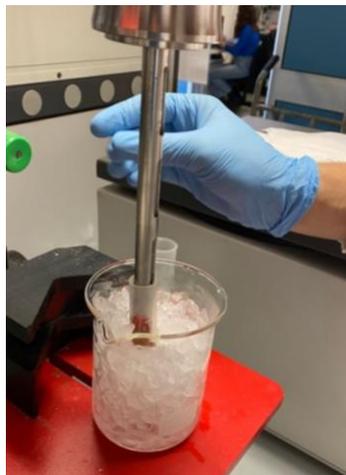


Figura 3.2: Polytron, utilizzato per l'omogeneizzazione dei tessuti.

Successivamente i campioni sono stati messi in centrifuga Beckman per 50 minuti a 20,000 rpm alla temperatura di 4°C.

Infine sono stati prelevati i supernatanti (*Fig. 3.3*), messi in provette eppendorf, congelati e conservati a -80°C.



Figura 3.3: I campioni una volta completata la centrifugazione.

3.3 DOSAGGIO PROTEICO SECONDO LA METODICA DI *LOWRY ET AL.* (1951)

Questo saggio permette di valutare la quantità totale di proteine contenute in ogni campione. Tale quantità risulta necessaria per poter normalizzare i valori di proteine totali determinate con i saggi biochimici. Per determinare il contenuto proteico viene utilizzando un reagente fenolico: Folin-Ciocalteu (Lowry et al., 1951). La concentrazione nei campioni viene determinata attraverso regressione lineare tra quantità note e crescenti di standard e i valori di assorbanza misurati ad una lunghezza d'onda di 750 nm con uno spettrofotometro (*Fig. 3.4*).



Figura 3.4: Spettrofotometro utilizzato per la lettura dell'assorbanza del dosaggio proteico.

Reagenti utilizzati:

- Soluzione A: Na_2CO_3 2% + NaOH 0,1 M
- Soluzione B: $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,5% in citrato di sodio 1%.
- Soluzione C: 25 mL di soluzione A + 0,5 mL di soluzione B
- Soluzione D: 1,36 mL di H_2O + 1 mL di Folin
- Albumina (1 mg/ml)

- Tampone di omogeneizzazione
- Campioni

Inizialmente sono state preparate delle provette contenenti quantità note crescenti di albumina (Fig 3.5). Come si può osservare dalla tabella, in ogni coppia di provette (eccetto la prima coppia che fungeva da bianco), è stata aggiunta una quantità di H₂O MilliQ tale che sommata alla quantità di albumina desse 200 µL.

| N° Provetta | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Albumina (µL) | 0 | 0 | 10 | 10 | 20 | 20 | 30 | 30 | 40 | 40 | 60 | 60 | 80 | 80 |
| H ₂ O MilliQ (µL) | 200 | 200 | 190 | 190 | 180 | 180 | 170 | 170 | 160 | 160 | 140 | 140 | 120 | 120 |
| Soluzione C (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Soluzione D (µL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Figura 3.5: Tabella con le quantità di reagenti utilizzati per ogni provetta

In seguito, è stato aggiunto 1 mL di soluzione C ad ogni provetta e sono state agitate utilizzando il Vortex. Aggiungendo alla soluzione proteica una soluzione rameica in ambiente basico, si ottiene una colorazione viola porpora con un assorbimento massimo a 540 nm.

Dopo 10 minuti in ognuna delle provette sono stati aggiunti 100 µL di soluzione D (contenente il Folin) e sono state agitate nuovamente utilizzando il Vortex. Dopo l'aggiunta del reattivo di Folin (reattivo fosfomolibdico fosfotungstico) che va a reagire con le tirosine ed i triptofani delle proteine, assume un colore blu (con massimo a 750 nm) dato dalla formazione di blu di tungsteno e blu di molibdeno grazie alla riduzione operata dal complesso rame proteina.

Dopo 30 minuti, durante i quali le provette sono state mantenute al buio, si è potuto procedere con la lettura dell'assorbanza a 750 nm utilizzando lo spettrofotometro. Con le misure di assorbanza così ottenute è stato possibile creare la retta di taratura (Fig. 3.6)

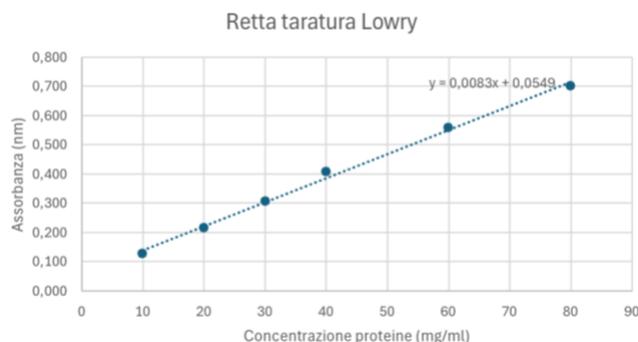


Figura 3.6: Retta di taratura. Nelle ascisse c'è la concentrazione proteica espressa in mg/ml, mentre nelle ordinate c'è l'assorbanza espressa in nm.

Successivamente si è ripetuto lo stesso protocollo, ma al posto dell'albumina è stato utilizzato il campione.

Per ottenere i mg di proteine è stata utilizzata la seguente formula:

$$\frac{mg\ proteine}{ml} = \frac{y - 0,0549}{0,0083} \cdot \frac{0,001}{ml\ di\ campione}$$

3.4 SAGGIO DELL'ATTIVITÀ DELLA SUPEROSSIDO DISMUTASI SECONDO LA METODICA DI CRAPO ET AL. (1978)

Il saggio dell'attività dell'enzima superossido dismutasi (SOD) si basa sulla capacità dell'enzima di eliminare $O_2^{\bullet-}$, cioè di inibire le reazioni causate dal radicale. L' $O_2^{\bullet-}$ è generato dalla reazione tra ipoxantina e xantina ossidasi e determina la riduzione del citocromo c^{3+} a citocromo c^{2+} . L'enzima SOD quindi inibisce questa riduzione e si misura con un incremento dell'assorbanza nel campione minore rispetto al bianco poiché si forma meno citocromo ridotto.

Reagenti:

- Tampone SOD
- Soluzione di citocromo c 1,6 mM
- Soluzione di ipoxantina 13mM
- Soluzione di xantina ossidasi
- Tampone di omogeneizzazione
- Campione

La misura dell'assorbanza viene fatta sia per il bianco che per il campione e per quest'ultimo dovrebbe essere circa la metà di quella del bianco. Una volta ottenuti i due valori di assorbanza, si ricavano le unità di SOD per mL con la seguente formula:

$$\frac{U\ SOD}{ml} = \frac{1 - \frac{Ac}{Ab}}{0,5} \cdot \frac{1}{Vc}$$

Dove:

- Ac è l'assorbanza media del campione
- Ab è l'assorbanza media del bianco
- Vc è il volume del campione utilizzato

Anche in questo saggio bisogna normalizzare le unità di SOD utilizzando il contenuto proteico ricavato dal primo saggio:

$$\frac{\left(\frac{U\ SOD}{ml}\right)}{\left(\frac{mg\ proteine}{ml}\right)} = \frac{U\ SOD}{mg\ proteine}$$

3.5 DOSAGGIO DELL'ATTIVITÀ CATALASICA SECONDO LA METODICA DI LIVINGSTONE ET AL. (1992)

Il saggio che misura l'attività catalasica è stato svolto utilizzando la metodica di Livingstone et al. (1992), secondo la quale si osserva un decremento dell'assorbanza nell'arco del tempo. La lunghezza d'onda utilizzata, di 240 nm, misura l'assorbanza dell'acqua ossigenata. Il decremento dell'assorbanza è dovuto quindi al decremento dell'acqua ossigenata che viene detossificata per dismutazione dalla catalasi.

Reagenti:

- Tampone fosfato 50 mM
- Perossido d'idrogeno (H₂O₂) 50 mM
- Campioni

Sono state fatte delle prove con proporzioni diverse tra supernatante e tampone fosfato e il miglior decremento di assorbanza si è osservato con le seguenti quantità:

- Per le ghiandole: 30 µL di campione e 1,970 mL di tampone fosfato
- Per le branchie: 100 µL di campione e 1,900 mL di tampone fosfato

Si procede con la lettura dei valori di assorbanza per ogni campione. Per determinare l'attività enzimatica per unità di volume si utilizza la seguente formula:

$$\frac{U\ CAT}{ml} = \frac{A_i - A_f}{40} \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{V\ totale}{ml\ di\ campione} \cdot 1000$$

Dove:

- A_i è il valore di assorbanza iniziale media misurata a t = 0 s
- A_f è il valore di assorbanza finale media misurato a t = 60 s
- 40 è il coefficiente di estinzione di H₂O₂
- t è il tempo che passa da A_i ad A_f ed è misurato in minuti
- V totale in questo caso è sempre 3 ed è espresso in mL
- 1000 è il fattore di conversione (da mmol a µmol)

Sono state effettuate misurazioni di assorbanza sia per i controlli (individui non esposti all'inquinante) che per i trattati (individui esposti a PFOA).

I valori di U CAT sono stati normalizzati utilizzando il contenuto proteico dal saggio precedente con la seguente formula:

$$\frac{\left(\frac{U\ CAT}{ml}\right)}{\left(\frac{mg\ proteine}{ml}\right)} = \frac{U\ CAT}{mg\ proteine}$$

3.5 DOSAGGIO DELLA GLUTATIONE PEROSSIDASI SECONDO LA METODICA DI LIVINGSTONE ET AL. (1992)

In questo saggio l'obiettivo è quello di misurare la velocità di ossidazione del NADPH operata dall'eccesso di glutatione reduttasi (GR) per la riduzione del GSSG (glutatione ossidato) a GSH (glutatione ridotto).

Sono state quantificate prima le attività delle GPx Se-dipendenti e poi successivamente le attività delle GPx totali (Se-dipendenti + Se-indipendenti).

Reagenti:

- Stock solution (NADPH 0,15 mM, GSH 2,5 mM, NaN₃ 1,25 mM e GSH-reduttasi 1,25 U)
- Perossido d'idrogeno come substrato per la GPx Se-dipendente
- Cumene idroperossido 30 mM come substrato per la GPx totale
- Campioni
- Tampone di omogeneizzazione

Dopo aver preparato i reagenti e aver opportunamente diluito i campioni, si procede con il loro inserimento in cuvetta per effettuare l'analisi con lo spettrofotometro.

Si procede con la lettura dei valori di assorbanza per ogni campione. Per determinare l'attività enzimatica per unità di volume si utilizza la seguente formula:

$$\frac{U \text{ GPX}}{ml} = \frac{A_i - A_f}{\Delta t} \cdot \frac{1000}{V \text{ campione} \cdot 6,22}$$

Dove:

- A_i è l'assorbanza iniziale media misurata a t = 0 s
- A_f è l'assorbanza finale media misurata a t = 300 s
- Δt è l'intervallo di tempo misurato in secondi
- 6,22 è una costante per normalizzare i risultati
- 1000 è il fattore di conversione da mL a L

Le unità di GPX su mL sono state normalizzate utilizzando il contenuto proteico ricavato dal primo saggio:

$$\frac{\left(\frac{U \text{ GPX}}{ml}\right)}{\left(\frac{mg \text{ proteine}}{ml}\right)} = \frac{U \text{ GPX}}{mg \text{ proteine}}$$

3.7 ANALISI STATISTICA

I valori ottenuti sono riportati come media +/- deviazione standard. Per verificare che i risultati ottenuti siano statisticamente significativi, è stata effettuata l'analisi statistica utilizzando Excel per svolgere il t-test di Student. Sono stati considerati statisticamente significativi valori con $p < 0,05$, altamente significativi valori con $p < 0,001$ e ancora più significativi con $p < 0,0001$.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

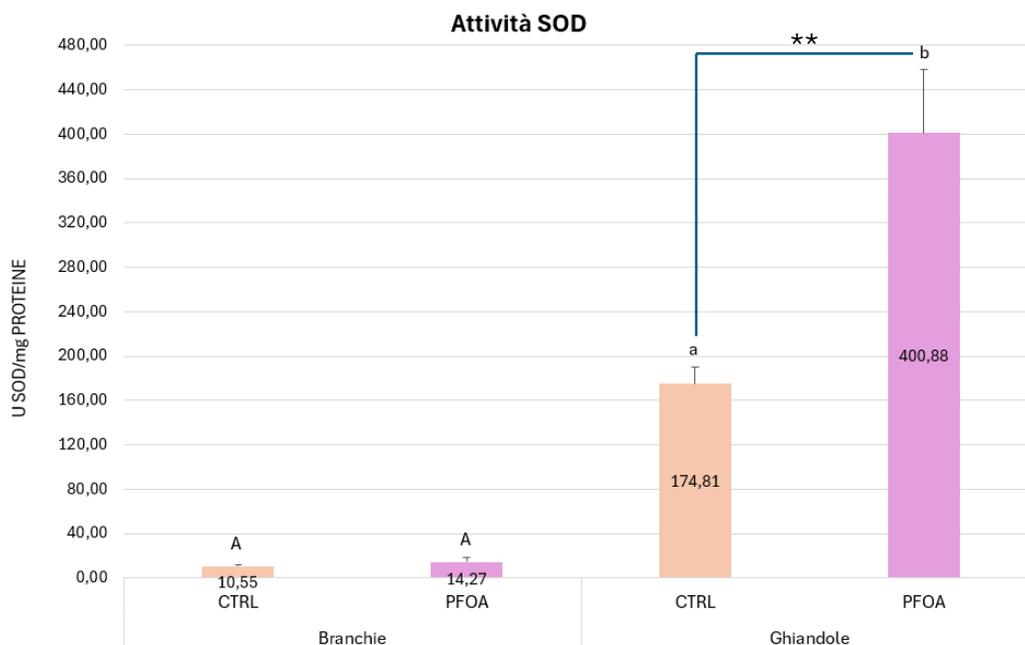


Figura 4.1: Attività della superossido dismutasi nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di *A. colbecki*: confronto tra gruppo di controllo e gruppo esposto al PFOA. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $p < 0,05$ (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$, *** = $p < 0,0001$).

I dati del grafico (Fig. 4.1) mostrano che in questo caso l'attività enzimatica aumenta negli individui esposti all'inquinante rispetto che ai controlli.

Si nota un aumento maggiore dell'attività della SOD nelle ghiandole rispetto che nelle branchie. In particolare, l'attività della superossido dismutasi nelle ghiandole ha un aumento in percentuale del 129%. Ciò dipende dal fatto che le ghiandole di *A. colbecki* tendono a bioaccumulare una maggiore quantità di inquinanti rispetto agli altri organi.

Nelle branchie la differenza mostra comunque un leggero aumento dell'attività enzimatica, ma non sufficiente da essere considerato statisticamente significativo. Ciò potrebbe derivare da vari fattori, come ad esempio dal limitato numero di campioni oppure dal fatto che l'attività dell'enzima SOD sia compromessa nonostante l'aumento delle ROS.

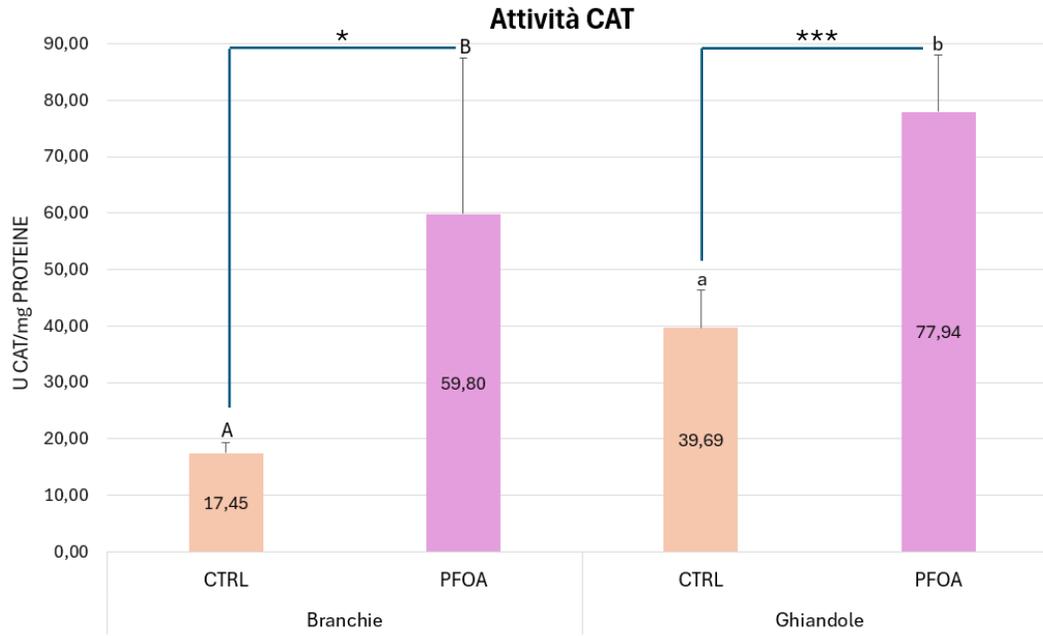


Figura 4.2: Attività della catalasi nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di *A. colbecki*: confronto tra gruppo di controllo e gruppo esposto al PFOA. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $p < 0,05$ (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$, *** = $p < 0,0001$).

Osservando i risultati dell'analisi enzimatica (Fig. 4.2) si può notare che, sia per quanto riguarda le branchie che per le ghiandole, la quantità di enzima è maggiore negli individui trattati rispetto a quelli non trattati. Da notare che la differenza tra livelli di catalasi tra controlli e trattati è maggiore per le branchie rispetto alle ghiandole. Nelle branchie infatti si osserva un aumento del 243%, mentre nelle ghiandole del 136%.

La ghiandola digestiva mostra valori più alti dell'attività della catalasi sia negli organismi di controllo che in quelli trattati. Ciò è dato dal fatto che la ghiandola di *A. colbecki* è l'organo più soggetto a bioaccumulo di inquinanti. Infatti, secondo uno studio di Santovito et al. (2005) La CAT è più attiva nella ghiandola digestiva, dove l'enzima porta a dismutazione dell' H_2O_2 derivato dalla riduzione bivalente di O_2 eseguita da varie ossidasi nei perossisomi.

La differenza è statisticamente significativa per entrambi i tessuti, in particolare risulta altamente significativa ($p < 0,001$) nelle ghiandole, questo verosimilmente dovuto ad una minore deviazione standard.

Confrontando questi dati con quelli ottenuti in analisi precedenti, svolte con una concentrazione di PFOA minore di un fattore 10, risultano in questo caso differenze più significative. Ciò è dovuto al fatto che un aumento della concentrazione dell'inquinante provoca un aumento delle ROS e di conseguenza dello stress ossidativo. Per controbilanciare

la produzione di ROS, una tipica risposta dell'organismo è quella di aumentare le difese antiossidanti, come ad esempio l'attività catalasica.

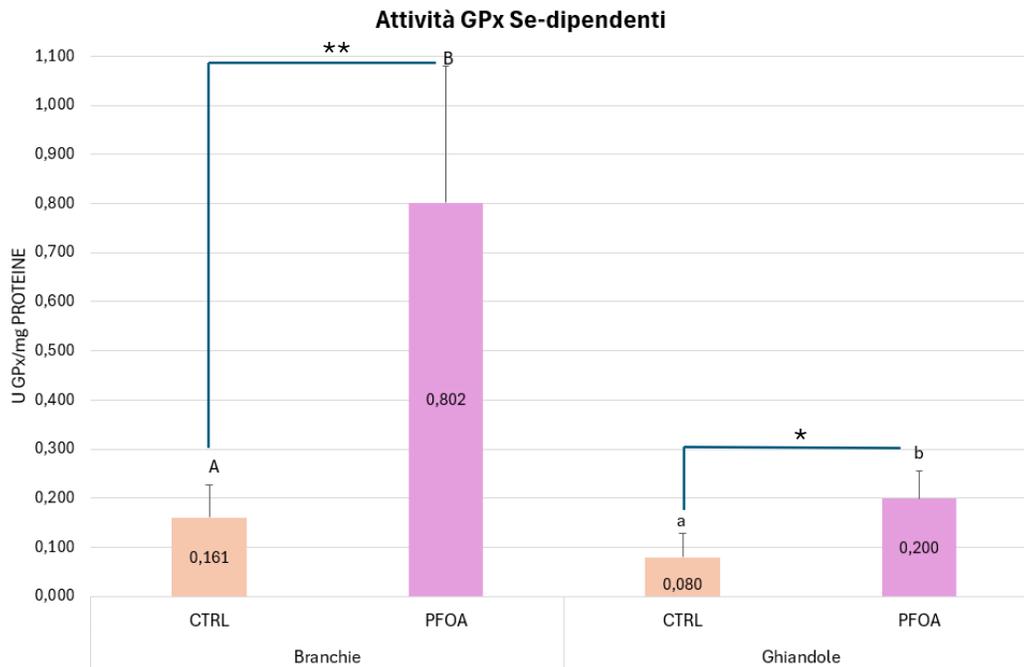


Figura 4.3: Attività delle glutatione perossidasi selenio-dipendenti nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di *A. colbecki*: confronto tra gruppo di controllo e gruppo esposto al PFOA. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $p < 0,05$ (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$, *** = $p < 0,0001$).

In questo grafico (Fig. 4.3) si può osservare ancora un aumento dell'attività enzimatica dei soggetti esposti all'inquinante rispetto agli individui di controllo. In particolare, nelle branchie c'è un aumento in percentuale del 398%, mentre nelle ghiandole digestive l'aumento è del 150%.

In questo caso l'aumento percentuale è maggiore nelle branchie rispetto che nelle ghiandole. Ciò deriva dal fatto che in questo tessuto l'enzima è più legato alla riduzione di H_2O_2 , substrato utilizzato nella Se-GPx.

In entrambi gli organi le differenze tra organismi di controllo e trattati con il PFOA sono statisticamente significative.

Confrontando questi dati con quelli ottenuti in analisi precedenti, svolte con una concentrazione di PFOA ridotta di un fattore 10, risulta che in questo caso, aumentando la concentrazione di PFOA si ottengono delle differenze più significative. Il motivo di ciò è il medesimo illustrato per l'attività della catalasi.

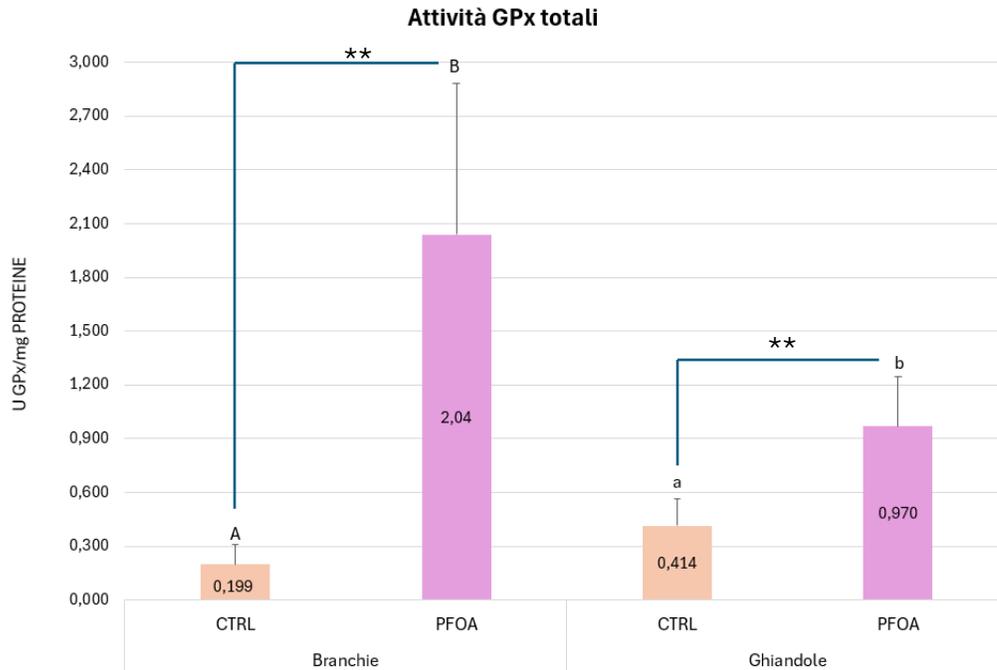


Figura 4.4: Attività delle glutatione perossidasi totali nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di A. colbecki: confronto tra gruppo di controllo e gruppo esposto al PFOA. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $p < 0,05$ (= $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$, *** = $p < 0,0001$).*

In questo grafico (Fig. 4.4) si può osservare ancora un aumento dell'attività enzimatica dei soggetti esposti all'inquinante rispetto agli individui di controllo. In particolare, nelle branchie c'è un aumento in percentuale del 925%, mentre nelle ghiandole digestive l'aumento è del 134%.

In entrambi gli organi le differenze tra organismi di controllo e trattati con il PFOA sono statisticamente significative.

Confrontando questi dati con quelli ottenuti in analisi precedenti, svolte con una concentrazione di PFOA ridotta di un fattore 10, risulta che in questo caso, aumentando la concentrazione di PFOA si ottengono delle differenze più significative. Il motivo di ciò è il medesimo illustrato per l'attività della catalasi.

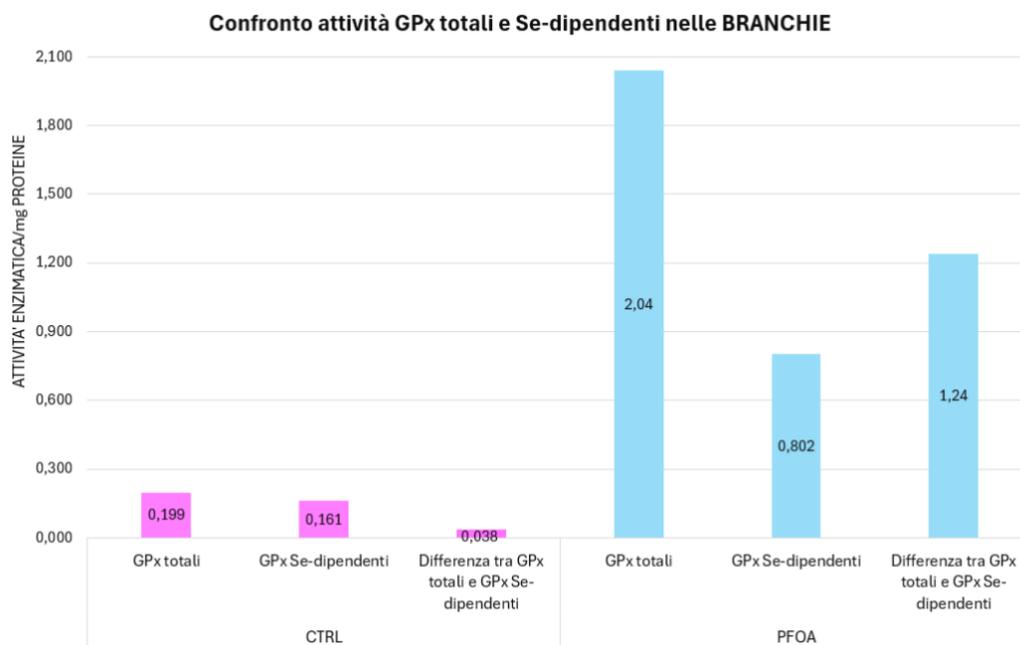


Figura 4.5: Risultati dati dal confronto di attività di GPx totali e GPx Se-dipendenti nelle branchie di A. colbecki.

Come si può osservare dal grafico (*Fig. 4.5*) nelle branchie l'attività enzimatica delle glutazione perossidasi totali è maggiore.

Le glutazione perossidasi totali comprendono sia le GPx Se-dipendenti che quelle Se-indipendenti, quindi il motivo per cui l'attività delle GPx totali sia maggiore delle Se-GPx è facilmente deducibile.

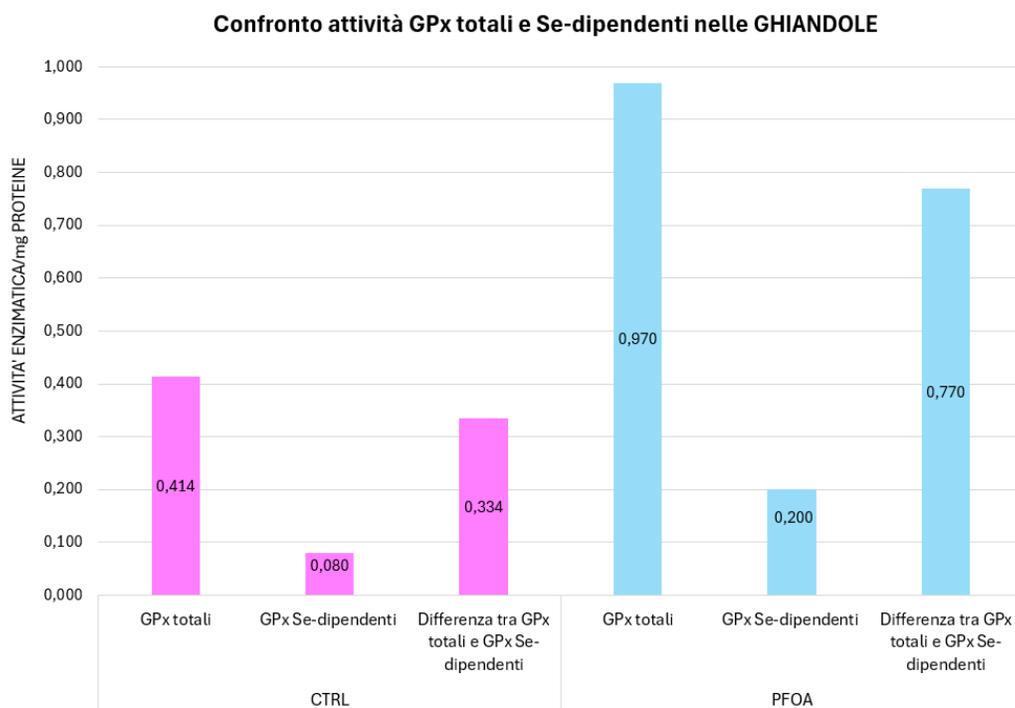


Figura 4.6: Risultati dati dal confronto di attività di GPx totali e GPx Se-dipendenti nelle ghiandole digestive di A. colbecki.

Come si può osservare dal grafico (Fig. 4.5) nelle ghiandole digestive l'attività enzimatica delle glutatione perossidasi totali è maggiore.

L'attività enzimatica delle GPx totali è maggiore rispetto a quella delle Se-GPx per gli stessi motivi illustrati precedentemente.

5. CONCLUSIONI

Negli ultimi anni si è osservato che anche luoghi remoti, come il continente Antartico, abbiano subito gli effetti dell'inquinamento antropico. In particolare, assieme alla crescita della popolazione è aumentata la produzione industriale e con essa l'utilizzo di nuove sostanze inquinanti potenzialmente tossiche. Tra queste vi sono sicuramente i PFAS, composti prodotti sinteticamente dall'uomo e ampiamente sfruttati a livello industriale, che negli ultimi decenni stanno aprendo dibattiti (Glüge et al., 2020).

Per studiare l'impatto che hanno i PFAS nell'ambiente sono stati effettuati degli studi su animali endemici, i quali hanno dimostrato di essere degli ottimi organismi bersaglio grazie alla loro capacità di bioaccumulare sostanze inquinanti.

I risultati ottenuti forniscono indicazioni sull'impatto da parte dell'uomo in continenti remoti e, di conseguenza, sull'intero globo. Infatti, in Antartide, la ricerca scientifica presenta grandi lacune per quanto riguarda la comprensione dei modelli di contaminazione passati e presenti (Bengston, 2011).

Il presente studio ha permesso di evidenziare l'impatto dell'esposizione a PFOA, un inquinante che desta sempre maggiore preoccupazione ed ha confermato l'utilità di *A. colbecki* come specie adatta al biomonitoraggio. Le analisi di due particolari tessuti di questo organismo ha mostrato la sua capacità di adattarsi a condizioni ossidative stressanti presenti in un ambiente estremo come l'Antartide.

È bene sottolineare che le attività degli enzimi SOD, CAT e GPx sono in stretta relazione tra di loro. In particolare, la CAT e la GPx agiscono sul perossido di idrogeno prodotto dalla SOD tramite dismutazione dell'anione superossido. I risultati però mostrano un aumento nelle branchie degli enzimi CAT e GPx che non corrisponde ad un aumento della SOD. Ciò fa presupporre che l'aumento di H_2O_2 non sia dovuto solamente dall'attività della SOD.

Bisogna tenere comunque in considerazione che gli enzimi antiossidanti sono una famiglia di enzimi ampia e complessa e i dati ottenuti da questo studio mostrano solamente una visione parziale dell'effetto dei PFAS, e le relative risposte degli enzimi antiossidanti.

Inoltre, come dimostrato in uno studio di Viarengo et al. (1991), i sistemi di difesa antiossidanti subiscono delle variazioni che dipendono dalla stagione, dallo stadio di maturazione dell'organismo preso in esame e dalla disponibilità di cibo.

Per questi motivi risulta fondamentale approfondire lo studio dell'ambiente Antartico, degli animali che ci vivono e di sostanze inquinanti come i PFAS, i quali in futuro potrebbero essere sempre più diffusi e circolanti nell'ecosistema.

6. BIBLIOGRAFIA

Bargagli R. (2008). Environmental contamination in Antarctic ecosystem. *Science of the Total Environment*, 400 (1-3), 212-226.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004896970800716X>

Bengtson Nash, S. (2011). Persistent organic pollutants in Antarctica: Current and future research priorities. *Journal of Environmental Monitoring*, 13, 497–504.

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/em/c0em00230e/unauth>

Bonato, M., Corrà, F., Bellio, M., Guidolin, L., Tallandini, L., Irato, P., & Santovito, G. (2020). PFAS Environmental Pollution and Antioxidant Responses: An Overview of the Impact on Human Field. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 8020.

<https://doi.org/10.3390/ijerph17218020>

Buck R., C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J. M., Cousins, I. T., de Voogt, P., Jensen, A. A., Kannan, K., Mabury, S. A. & van Leeuwen S. P.J. (2011). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: Terminology, classification, and origins. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7 (4), 513-541.

<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ieam.258>

Casas G., Iriarte J., D'Agostino L. A., L. Roscales J. L., Martinez-Varela A., Vila-Costa M., Martin J. M., Jiménez B. & Dachs J. (2023). Inputs, amplification and sinks of perfluoroalkyl substances at coastal Antarctica. *Environmental Pollution*, 338, 122608.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122608>

Cassaro, A., Pacelli, C., Aureli, L., Catanzaro, I., Leo, P., & Onofri, S. (2021). Antarctica as a reservoir of planetary analogue environments. *Extremophiles*, 25, 437–458.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00792-021-01245-w>

Chu, W., Dang, N., Kok, Y., Yap, K. I., Phang, S. & Convey, P. (2019). Heavy metal pollution in Antarctica and its potential impacts on algae. *Polar Science*, 20 (1), 75-83.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873965218300926>

Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., & Apak, R. (2022). Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 209, 114477.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114477>

Flores-Lopez, F., Thomaz, AT. (2011). Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. *Brazilian Journal of Biology*, 71 (1).

<https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000100026>

Glüge, J., Scheringer, M., Cousins, I. T., C. DeWitt, J. C., Goldenman, G., Herzke, D., Lohmann, R., A. Ng, C. A., Trier, X., & Wang, Z. (2020). An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) *Environmental Sciences: Processes Impacts*, 22, 2345-2373.

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/em/d0em00291g>

Greco, S., Gaetano, A.S., Manfrin, C., Capanni, F., Santovito, G., Giulianini, P.G., Pallavicini, A. & Gerdol, M. (2023). The Antarctic Scallop *Adamussium colbecki* Is Unable to Transcriptomically Respond to Captivity and Moderate Thermal Stress. *Stresses*, 3, 475–487.

<https://www.mdpi.com/2673-7140/3/2/34>

Leung, S. C. E., Wanninayake, D., Chen, D., Nguyen, N. & Li, Q. (2023). Physicochemical properties and interactions of perfluoroalkyl substances (PFAS) - Challenges and opportunities in sensing and remediation. *Science of the Total Environment*, 905, 166764.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969723053895#s0010>

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

[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52451-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf)

Peck, L. S., Powell, D. K. & Tyler, P. A. (2007). Very slow development in two Antarctic bivalve molluscs, the infaunal clam *Laternula elliptica* and the scallop *Adamussium colbecki*. *Marine Biology*, 150, 1191-1197.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00227-006-0428-8>

Regoli, F., Nigro, M., Chiantore, M., & Winston, G.W. (2002). Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Science of the Total Environment*, 289 (1-3), 205-211.

[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01047-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01047-6)

Santovito, G., Piccinni, E., Cassini, A., Irato, P., & Albergoni, V. (2005). Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140 (3-4), 321-329.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045605000621>

Sena, L. A. & Chandel, N. S. (2012). Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cells*, 48 (2), 158-167.

[https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765\(12\)00825-8](https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765(12)00825-8)

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., & Livingstone, D. R. (1991). Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100 (1-2), 187-190.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/074284139190151I>

8. SITOGRAFIA

PROGRAMMA NAZIONALE DI RICERCHE IN ANTARTIDE, PNRA (2019). Chi siamo. Antartide. Territorio. Ambiente.

<https://www.pnra.aq/index.php/it>

[Ultimo accesso: 02/10/2014]

ANTA-GPS (2021). Progetto.

<https://sites.google.com/view/anta-gps/progetto>

[Ultimo accesso: 02/10/2024]

RINGRAZIAMENTI

Voglio ringraziare prima di tutto la mia famiglia che mi ha sempre sostenuta nel mio percorso universitario. In particolare, ringrazio mia mamma che mi ha ascoltata nei momenti in cui mi sentivo giù, ma anche nei momenti allegri. Voglio ringraziare mio papà per l'aiuto che non mi ha mai fatto mancare. Ringrazio mia sorella Vittoria perché è una bravissima sorella che ha sempre provato a tirarmi su di morale quando ero un po' triste e con la quale ho sempre potuto parlare di tutto. Mi ha coinvolta in tutto quello che faceva e non mi ha mai fatta sentire sola.

Ringrazio anche il mio ragazzo Marco che mi ha supportata, ma soprattutto sopportata e ha sempre creduto in me.