

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE e TECNOLOGIE per L' AMBIENTE



RISPOSTE ANTIOSSIDANTI IN UN BIVALVE ANTARTICO (*ADAMUSSIUM COLBECKI*) ESPOSTO A CADMIO IN CONDIZIONI CONTROLLATE

Relatrice:

Prof. Paola Irato

Correlatrici:

Dott. Elisabetta Piva,

Dott. Sara Pacchini

Laureando/a: Anton Schönberger

Nr. di matricola: 1225971

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 L'ANTARTIDE.....	1
1.1.1 IL RUOLO CLIMATICO GLOBALE.....	2
1.1.2 IL CONTINENTE ISOLATO.....	3
1.1.3 BIODIVERSITÀ.....	5
1.2 IL PROGETTO DI RICERCA.....	6
1.2.1 ESPOSIZIONE A CADMIO.....	7
1.2.2 COSA SONO LE ROS?.....	8
2 SCOPO DELL'ELABORATO	9
3 MATERIALI E METODI	10
3.1 ADAMUSSIIUM COLBECKI	10
3.2 OMOGENEIZZAZIONE dei TESSUTI.....	11
3.3 DOSAGGIO PROTEICO SECONDO LOWRY ET AL.	12
3.4 SAGGIO DELLA CATALASI (CAT).....	14
3.5 SAGGIO DELLA GLUTATIONE PEROSSIDASI (GPX).....	16
3.6 ANALISI STATISTICA.....	17
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	18
4.1 ATTIVITÀ DELLA CATALASI	18
4.2 ATTIVITÀ DELLE Se - GPX.....	19
4.3 ATTIVITÀ DELLE GPX TOTALI.....	20
4.4 CONFRONTO TRA GPX TOTALI E Se - GPX.....	21
5. CONCLUSIONI	23
BIBLIOGRAFIA	25
SITOGRAFIA	27

1. INTRODUZIONE

1.1 L'ANTARTIDE

L'Antartide è conosciuta come il continente più arido e ventoso del pianeta, con le temperature più basse mai registrate dall'uomo. Alla stazione russa di ricerca "Vostok", situata nel centro del continente, nel mese di luglio del 1983 è stata registrata la temperatura record di $-89,6^{\circ}\text{C}$.

Il continente, incluse le piattaforme glaciali e le isole, si estende per una superficie di approssimativamente $4 \times 10^6 \text{ km}^2$, corrispondente all'incirca al 10% della superficie terrestre emersa, il che lo rende il quinto continente più esteso sulla Terra.

Situato nel sud del pianeta, circonda il polo sud geografico ed è contenuto quasi per intero nel Circolo polare antartico ($66^{\circ}33'39'' \text{ S}$).



Figura 1.1: mappa dettagliata dell'Antartide

La posizione pressoché centrata rispetto al polo geografico implica un angolo di incidenza dei raggi solari molto ampio rispetto alla verticale, il che dà loro un potere calorifico ridotto, data la porzione di atmosfera più estesa che devono attraversare. I gas e gli aerosol contenuti nell'atmosfera tendono infatti a riflettere e/o assorbire parte della radiazione solare prima che possa giungere al suolo.

L'inclinazione dell'asse di rotazione terrestre ($23^{\circ}27'$), rispetto al piano della sua orbita, fa sì che l'Antartide riceva luce solare esclusivamente durante l'estate australe (dal 21 settembre al 23 marzo) e la primavera, quando il Polo Sud è orientato verso il Sole. Il resto dell'anno, nella cosiddetta notte polare, rimane in ombra. Questo fa sì che durante il solstizio d'estate australe (21 dicembre) vi siano 24h ore di luce in un giorno e durante il solstizio d'inverno australe (21 giugno) vi siano 24h di buio.

L'Antartide è il continente che riceve la minor quantità di calore dal sole, per via dello spesso strato di ghiaccio che lo ricopre e che agisce come uno specchio riflettente per i raggi solari, determinando un'albedo $\geq 80\%$; in aggiunta delle sue catene montuose, che possono superare i 4000 m di quota.

Il bilancio di radiazione solare si rileva dunque fortemente negativo, ed è concausa dei fattori stagionali illustrati poc'anzi nel determinare le temperature estreme della regione.

Durante l'estate australe le temperature fluttuano tra 0°C nella zona costiera e -32°C in quella continentale, mentre nella stagione invernale tra -20°C in zone costiere e -70°C in aree continentali. Normalmente la temperatura media annua della maggior parte del plateau centrale è di -55°C

(Colacino, 1996).

1.1.1 IL RUOLO CLIMATICO GLOBALE

Alla latitudine antartica si registra una notevole differenza con le temperature delle zone equatoriali. Questo divario determina la cosiddetta forza di gradiente che, insieme alla forza di Coriolis, governa la circolazione generale dell'atmosfera, da cui dipende la ridistribuzione del calore sull'intera superficie terrestre. In aggiunta, il disgelo che si verifica nel passaggio dalla stagione fredda a quella calda, dà luogo alla formazione di acque fredde e dense, che, sprofondando, alimentano la circolazione di fondo ed il ricambio delle acque oceaniche **(Colacino, 1996).**

Semplificando, si può confrontare il sistema climatico terrestre ad un motore termodinamico, avente come fonte di calore le latitudini equatoriali e come dispersore quelle polari. Le interazioni di correnti atmosferiche e gradienti di densità di acque a diversa temperatura e salinità, danno origine alla Corrente Circumpolare Antartica (ACC), la quale collega i principali bacini oceanici del sistema oceanico terrestre **(Convey et al., 2009).**

1.1.2 IL CONTINENTE ISOLATO

Il continente è delimitato a sud dall'Oceano del Sud, punto di incontro tra Oceano Indiano, Pacifico ed Atlantico; a nord dalla Convergenza antartica. Quest'ultima traccia un confine oceanografico, situato a circa 1600 km dalla costa: un braccio di oceano largo dai 40 agli 80 km, attraversato dalla Corrente Circumpolare Antartica.

Il passaggio tra masse d'acqua distinte per temperatura e proprietà chimico – fisiche genera una barriera tra l'Oceano Antartico e gli altri oceani che incontra, isolando in larga misura il continente. In questa zona acque superficiali antartiche, fredde e poco salate, fluiscono al di sotto di acque superficiali sub – antartiche, meno fredde e più salate.

Il confine naturale così creatosi circa 25 milioni di anni fa, impedisce la migrazione di fauna marina da un lato all'altro, in entrambi i versi, data l'immiscibilità dei due corpi idrici a contatto. Ne consegue lo sviluppo, in acque antartiche, di un ecosistema marino separato da tutti gli altri. Questo rende il continente un'area geografica ideale e unica per lo studio di evoluzione e meccanismi di adattamento degli organismi endemici.

Grazie all'upwelling¹ di nutrienti, l'Oceano del sud è l'oceano biologicamente più produttivo al mondo, seppur limitato dalla scarsa disponibilità di micronutrienti, quali ad esempio il ferro (ad esclusione delle isole sparse nella zona di passaggio dell'ACC). Il biota antartico attuale che ne risulta è secondo soltanto alle barriere coralline in termini di biodiversità e biomassa. **(Clarke & Johnston, 2003)**

La ricchezza di nutrienti stimola la crescita di fitoplancton che, tramite fotosintesi, sequestrano CO₂ all'atmosfera, immagazzinata poi in acque più profonde o fondali marini attraverso l'affondare di materia organica in decomposizione. In assenza di questo processo e della dissoluzione di CO₂, favorita in acque fredde discendenti, l'accumulo di questo gas in atmosfera sarebbe molto più rapido **(Convey et al., 2009)**.

¹ "Risalita in superficie delle acque profonde oceaniche, fredde e ricche di nutrienti, dovuta a movimenti verticali indotti da spostamenti divergenti subiti dalle acque superficiali in ragione dell'azione dei venti e della rotazione della Terra". <https://www.treccani.it/vocabolario/upwelling/>

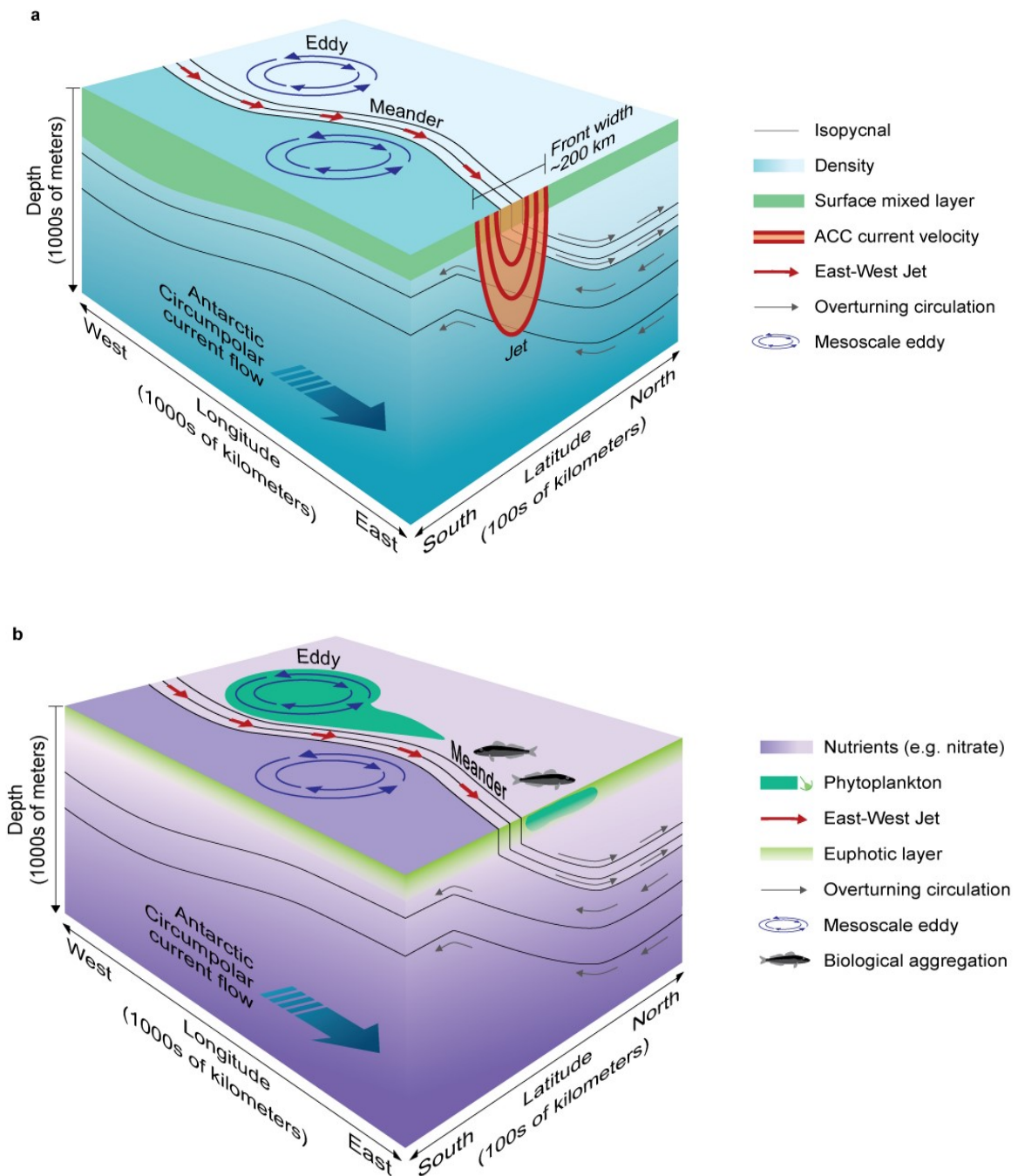


Figura 1.2 Illustrazioni di fronti di Corrente Circumpolare Antartica. Schema che evidenzia caratteristiche **a** fisiche e **b** biogeochimiche di un fronte di ACC idealizzato. Nella regione frontale vi sono isopincali ravvicinate discorrenti marcatamente verso la superficie. Forti correnti oceaniche geostrofiche, conosciute come “jets”, sono associate al fronte di densità per via della relazione termica con i venti. Il fronte separa regioni con alta e bassa densità (a), e alte e basse concentrazioni di nutrienti (b), dato che il “jet” tende ad inibire scambio trans - frontale. La forzatura del “jet” ed il trasporto verso il fondale di nutrienti quali il ferro, hanno un effetto deformante e allungante su un idealizzato conglomerato di clorofilla (b), e processi di upwelling/subduzione di acque, associati alla circolazione capovolgente, sono indicati con sottili frecce (Chapman et al., 2020).

1.1.3 BIODIVERSITÀ

A causa delle condizioni ambientali estreme, il biotopo terrestre dell'Antartide è uno dei meno popolati e biologicamente differenziati sul pianeta.

Non si può tuttavia dire lo stesso per l'ambiente marino, che si rivela popolato e produttivo, sia nel compartimento pelagico che in quello bentonico. A confronto con la fauna terrestre, qui la vita è caratterizzata da un abbondante numero di individui, pur contando un numero esiguo di specie, dovuto ad alcune caratteristiche dell'acqua marina antartica:

- Elevata stabilità termica (temperatura costante tra -1°C e -2°C);
- salinità media attorno al 34-35‰, variabile però stagionalmente con i cicli di congelamento e scongelamento marino;
- abbondanza di ossigeno ed anidride carbonica disciolti, favorita dalle basse temperature dell'acqua;
- abbondanza di nutrienti;
- trasparenza dell'acqua, che permette una penetrazione profonda dei raggi solari. **(Pacchini, 2022)**

Nel 2017 il Mare di Ross, area in cui sono stati prelevati i campioni analizzati in questo elaborato, è stata nominata l'area marina protetta più estesa al mondo. Quest'area costituisce l'ecosistema più grande del continente antartico, con attributi unici ed un livello di biodiversità più elevato rispetto ad altre aree polari. La caratteristica fondamentale che la rende tale è la sua conformazione fisica: rimane isolata dal resto dell'Oceano del sud perché le sue acque si mischiano poco con acque esterne, garantendo così che pesci e larve presenti non si disperdano o mischino con altri organismi. **(Marrone et al., 2021)**

Un ulteriore elemento chiave dell'ecosistema marino antartico consiste nel ciclo annuale di gelo e disgelo del ghiaccio marino, che controlla salinità, disponibilità di luce, produzione primaria e quindi nutrimento di organismi che ne dipendono.

La Convergenza antartica fa sì che nelle aree costiere le specie endemiche rappresentino l'85% del totale; tuttavia, in acque profonde, le specie endemiche rappresentano soltanto il 25%, in ragione del fatto che qui gli strati più profondi non impediscono il movimento di acque e le condizioni fisico-chimiche risultano quindi più omogenee. **(Azzolini et al., 2006)**

Dato che l'Antartide si è separata da altri continenti circa 40 milioni di anni fa, gli organismi che la abitano hanno avuto modo di evolvere meccanismi fisiologici e biochimici per sopravvivere e proliferare nel freddo, eventi che hanno generato così una fauna fortemente endemica e specializzata, caratteristiche testimoniate ad esempio dalla forte stenotermia di alcuni organismi marini.

1.2 IL PROGETTO DI RICERCA

La distanza e l'isolamento geografico dell'Antartide rispetto agli altri continenti, non la rende immune al dannoso impatto antropico sull'ecosistema. Il Fronte polare antartico limita fortemente lo scambio di inquinanti via mare. La dinamica principale di arrivo di inquinanti rilevati nella zona è rappresentata da advezione atmosferica a lungo raggio, che porta con sé sostanze rilasciate in altri continenti, come Australia o America. Data la modesta emissione interna e il consistente trasporto dall'esterno di inquinanti, l'Antartide si rivela un sensore eccellente per andamenti di inquinamento globale, dunque un sito ideale per studi eco-tossicologici rappresentativi. **(Marrone et al., 2021)**

Per via dell'isolamento geografico, la concentrazione di un inquinante in diversi livelli trofici può riflettere le dinamiche trofiche lungo la catena alimentare locale. Il bioaccumulo e la biomagnificazione di determinati inquinanti possono potenzialmente minacciare la salute di organismi ad elevati livelli trofici **(Gao et al., 2020)**.

Studiare l'eco-fisiologia di singoli organismi e monitorare le risposte della rete trofica a cambiamenti globali in corso risulta necessario al fine di sviluppare dei modelli di trasformazione dell'ecosistema antartico e di progettazione di misure di mitigazione e protezione **(Pacchini S., 2022)**.

L'analisi dell'organismo bioindicatore *Adamussium colbecki*, atta a misurare e analizzare le risposte fisiologiche date dal sistema antiossidante in ghiandole digestive e branchie, si inserisce nel più ampio progetto "AntaGPS", acronimo che sta per "Antartica as a global pollution sensor: aquatic and terrestrial organisms as bio-indicators and meta-analysis of pollutant trends". **(PNRA, 2019)**

Fa parte dei diversi progetti che si inseriscono nel programma del PNRA, ovvero il "Programma Nazionale di Ricerche in Antartide":

Dal 1985 il programma ha il compito di promuovere e supportare la ricerca nazionale in Antartide, garantendo il mantenimento di adeguate infrastrutture per la ricerca (in Antartide e in Italia) e il finanziamento di attività selezionate attraverso bandi competitivi. L'attuale governance del PNRA, che è un programma nazionale in carico al Ministero della Istruzione, Università e ricerca Scientifica (MIUR) vede impegnati con diversi ruoli e diversi compiti il Consiglio nazionale delle ricerche (CNR), l'Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA); e una Commissione scientifica nazionale per l'Antartide (CSNA) insediata presso il Ministero **(PNRA, 2019)**.

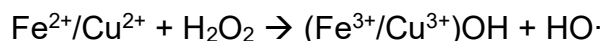
Il programma prevede la ricerca in situ in due stazioni: la stazione Concordia, gestita in collaborazione con ricercatori francesi, aperta tutto l'anno e situata sul plateau antartico (75°06' S, 123°21' E), a 3233m.s.l.m.; la stazione Mario Zucchelli, situata a Baia Terra Nova, sul mare di Ross (74°42' S, 164°07' E), a 15m.s.l.m., operativa durante l'estate australe.

1.2.1 ESPOSIZIONE A CADMIO

Il cadmio è un metallo pesante, la cui forma ionica (Cd^{2+}) rappresenta la più comune in ambiente. È solitamente presente in suoli, acque e aria e occorre naturalmente in ambiente. Vi sono però svariate fonti antropologiche di emissione, quali industrie minerarie, di produzione di leghe metalliche e di plastiche. Tutte le forme di tabacco inoltre, quando fumate, emettono cadmio (**Wu et al., 2016**).

Nel mare di Ross, fenomeni locali di upwelling fanno sì che vi sia un arricchimento naturale e una elevata biodisponibilità di cadmio, il quale viene accumulato nei tessuti di invertebrati e pesci antartici, in quantità tipicamente dalle 10 alle 50 volte superiori a quelle accumulate in specie simili viventi in climi più temperati (**Benedetti et al., 2016**).

Il metallo ostacola l'attività di enzimi sulfidrilici e interagisce con altri ligandi cellulari, destabilizzando così vie di reazione della fosforilazione ossidativa. Il cadmio non genera radicali liberi di per sé, ma favorisce meccanismi cellulari generanti ROS. Il meccanismo soggiacente al rilascio di radicali liberi sta nell'abilità del Cd^{2+} di sostituirsi a ferro e rame in svariate proteine di membrana e citoplasmatiche. Il conseguente aumento di ferro e rame, liberi nella cellula, stimola il rilascio di radicali idrossili tramite reazione di Fenton (**Wu et al., 2016**):



Il cadmio si lega a metallotioneine, proteine atte alla detossificazione di metalli e allo scavenging² di ROS, ossia specie reattive dell'ossigeno.

All'interno del nucleo cellulare si trovano fattori di risposta ai metalli, detti MRE (Metal Response Element), sequenze regolatrici di circa 15 paia di basi, situate in maggior numero sui geni codificanti per le metallotioneine e per gli enzimi antiossidanti, come ad esempio la SOD.

Il meccanismo di attivazione dei MRE non è ancora del tutto chiaro, si ipotizza però l'azione di un fattore di trascrizione, MTF-1 (Metal Transcription Factor), che, in condizioni normali, si trova nel citoplasma in forma inattiva.

Le metallotioneine sono delle zinco – proteine, presentano perciò tutti i siti di legame occupati da ioni Zn^{2+} . Quando entra nel citoplasma un altro tipo di metallo, come ad esempio il cadmio, che presenta affinità maggiore con la proteina, quest'ultimo spiazzava lo zinco dal suo sito di legame. Lo zinco così liberato andrà a legarsi al MTF -1, che entra nel nucleo e si lega alle

² Scavenger: In biochimica, sostanza in grado di trasformare i radicali dell'ossigeno in composti non radicalici, privi di reattività e quindi di tossicità.
<https://www.treccani.it/enciclopedia/scavenger/>

sequenze MRE, generando l'input di trascrizione che favorisce l'incremento della sintesi di metallotioneine ed enzimi antiossidanti, che a sua volta causa un aumento di attività enzimatica.

1.2.2 COSA SONO LE ROS?

Le ROS (Reactive Oxygen Species) sono specie reattive all'ossigeno che possono risultare dannose nei confronti di vari componenti cellulari. Le ROS includono, ad esempio, il radicale superossido ($O_2^{\cdot-}$), il perossido d'idrogeno (H_2O_2), il radicale ossidrile ($\cdot OH$), radicali perossidici ($ROO\cdot$) e il radicale idroperossido ($HOO\cdot$), oltre a diverse altre specie organiche e inorganiche. Data la loro composizione chimica, sono in grado di innescare svariati meccanismi di risposta biologici. Ogni ROS presenta proprietà chimiche intrinseche diverse, le quali dettano la sua reattività e i suoi bersagli biologici "preferiti". Il radicale superossido è prodotto nel metabolismo ossidativo dalla riduzione uni-elettronica di O_2 molecolare. È convertito rapidamente da enzimi superossido dismutasi (SODs) in H_2O_2 , composto che a sua volta può interferire nella segnalazione cellulare, in quanto interagisce con tioli contenuti in alcune proteine. Il perossido di idrogeno induce l'attivazione delle glutatione perossidasi (GPX) e delle perossiredossine (Prdx), che sono scavenger proprio di questa ROS. In presenza di ioni ferrosi o rameosi, H_2O_2 può trasformarsi in radicale ossidrile, che è molto reattivo e causa ossidazione di lipidi, proteine e DNA, provocando numerosi danni a livello cellulare. **(Glasauer et al., 2013)**

Lo studio dei radicali liberi è di crescente interesse nella biologia degli organismi marini, dato che numerosi studi hanno correlato l'esposizione di organismi a sostanze xenobiotiche o fattori di stress di tipo ambientale con la formazione accelerata delle ROS nelle cellule. In ambienti polari, le risposte dei sistemi antiossidanti degli organismi marini potrebbero essere dei bioindicatori rilevanti per la previsione degli effetti causati dalle attività umane. Altresì la caratterizzazione di tali risposte in specie chiave, come *A. colbecki*, può dare indicazioni riguardo il potenziale danno causato dalla diffusione di sostanze inquinanti in questi ambienti tanto straordinari quanto delicati. **(Regoli et al., 2002).**

2 SCOPO DELL'ELABORATO

Obiettivo del presente elaborato è quello analizzare le eventuali risposte del sistema antiossidante di *Adamussium colbecki* indotte dall'esposizione a livelli controllati di cadmio.

In particolare, ci si è focalizzati sull'analisi delle attività enzimatiche dell'enzima catalasi (CAT) e delle glutatione perossidasi (GPX) totali e selenio dipendenti, che sono due componenti principali del complesso sistema antiossidante di questo bivalve.

È stato condotto uno studio, atto a investigare il contenuto di metalli disciolti e sospesi nella colonna d'acqua del mare di Weddell, raccogliendo campioni di neve dal ghiaccio marino. In questa ricerca risulta che la media di concentrazione per il cadmio è 0,5-0,8 nM: considerevolmente più elevata che in altri oceani. Le relazioni tra i metalli in tracce e i nutrienti rilevati mostrano una scarsa correlazione statistica, in contrasto con quanto riscontrato in altri oceani. Ciò presuppone che cadmio, rame e zinco non siano direttamente collegati al ciclo di bioproduzione. Tuttavia, i rapporti di metalli in tracce di nutrienti trovati supportano la teoria secondo cui il Mare di Weddell è la fonte ultima per la generazione dei rapporti di metalli in tracce di nutrienti nell'Oceano Pacifico (**Westerlund et al., 1991**).

Considerando la natura circoscritta delle acque superficiali antartiche, è ragionevole supporre che anche nella zona d'interesse della nostra ricerca vi sia una concentrazione di cadmio naturalmente più elevata rispetto ad altri oceani. Si presume dunque che gli organismi endemici siano già adattati a vivere in presenza di una concentrazione di metalli nelle acque che supera quella di altri oceani. Ciononostante, il nostro studio tenta di indagare possibili reazioni fisiologiche di questo bivalve in presenza di concentrazioni più elevate di cadmio, possibile prospettiva di futuro inquinamento delle acque antartiche.

Alla luce di precedenti studi, l'ipotesi è che il trattamento (di durata 10 giorni) con una dose di Cd pari a 10 µg/l induca nei tessuti branchiali e nelle ghiandole digestive di *A. colbecki* un aumento dell'attività enzimatica antiossidante, rispetto ai campioni di controllo non trattati con il metallo.

La scelta di considerare i tessuti deputati a scambio gassoso e osmoregolazione (branchie) e al metabolismo dei nutrienti (ghiandola digestiva) dell'organismo bersaglio è motivata dalla particolare funzione di questi due organi: le branchie costituiscono infatti il primo sito di contatto tra eventuali xenobiotici provenienti dall'ambiente marino e il mollusco stesso. Inoltre, sono esposte maggiormente al danno ossidativo dovuto allo scambio di ossigeno tra ambiente esterno e interno. La ghiandola digestiva invece è un noto sito di accumulo delle sostanze tossiche e di

detossificazione delle stesse e dunque probabilmente sottoposto anche a stress ossidativo causato dall'esposizione all'inquinante.

3 MATERIALI E METODI

3.1 ADAMUSSIUM COLBECKI



A. Colbecki è un bivalve antartico a lenta crescita, che può arrivare fino a 13 anni di età. Questo mollusco è considerato una specie chiave in Antartide, sia per via del suo ruolo nel riciclo di nutrienti, che per quello di intermediario tra i sistemi pelagico e bentonico a livello litorale

(Chiantore et al., 2001).

È caratterizzato da grandi dimensioni, una distribuzione circumpolare ed elevati valori di biomassa in comunità bentoniche sublitorali

(Cattaneo-Vietti et al., 1997).

Studi eseguiti in passato riportano marcato bioaccumulo di xenobiotici e metalli pesanti nel bivalve, ed evidenziano il suo potenziale come organismo bioindicatore **(Focardi et al., 1993; Viarengo et al., 1993).**

3.2 OMOGENEIZZAZIONE dei TESSUTI

Per poter effettuare le analisi enzimatiche, è stato innanzitutto necessario omogeneizzare i tessuti.

Si prepara un tampone di omogeneizzazione, nel quale i tessuti verranno omogeneizzati meccanicamente, in un volume di tampone pari a 4 volte il peso in grammi del campione stesso.

Il tampone è composto da:

- Tris HCl 10 mM, a pH 7,6;
- 1,4-Ditio-treitolo (DTT) 1 mM;
- KCl 0,15 M;
- Saccarosio 0,5 M.

Una volta omogeneizzati, i campioni sono stati centrifugati in centrifuga Beckmann per 50 minuti a 20.000 rpm e temperatura di 4°C.

Infine, si sono prelevati i supernatanti e si sono trasferiti in provette Eppendorf, congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

3.3 DOSAGGIO PROTEICO SECONDO LOWRY ET AL.

Il dosaggio proteico viene effettuato con l'obiettivo di determinare la quantità proteica totale contenuta in ogni campione, in modo tale da poterla rapportare in un secondo momento all'attività enzimatica di singoli enzimi rilevata mediante appositi saggi.

Il contenuto proteico viene determinato utilizzando il reagente fenolico Folin-Ciocalteu, che consente di determinarne una quantità compresa tra 5 e 100 μg in 0,2 ml di campione opportunamente diluito. La concentrazione proteica può essere calcolata per ciascun campione mediante regressione lineare tra quantità note e crescenti di standard, ed espressa in mg/ml in tampone di omogeneizzazione (**Lowry et al., 1951**).

Strumenti e Reagenti:

- **SOLUZIONE A:** Na_2CO_3 2% + NaOH 0,1 M;
- **SOLUZIONE B:** $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% in citrato di sodio 1%;
- **SOLUZIONE C:** 25 ml di soluzione A + 0,5 ml di soluzione B (rapporto 1 a 50), preparata sul momento;
- **SOLUZIONE D:** 1,36 ml di H_2O + 1 ml FOLIN, preparata sul momento;
- **ALBUMINA** (ampolle da 1 ml, contenenti 1 mg di albumina/ml in NaCl 0,15 M);
- **Tampone di omogeneizzazione:** Tris-HCl 10 mM pH 7,6; DTT 1 mM; KCl 0,15 M; Saccarosio 0,5 M;

Per calibrare lo strumento, prima di procedere con i bianchi, si effettua un autozero con acqua milliQ.

Sono state preparate 12 provette per costruire la retta di taratura, utilizzando aliquote crescenti di albumina in quantità nota. In ogni provetta è stato poi aggiunto un volume di H_2O tale da ottenere un volume totale di 200 μl . Per i bianchi l'albumina viene tralasciata. Nel nostro caso sono stati allestiti due bianchi.

La retta di taratura ottenuta è stata ricavata dalle seguenti diluzioni:

N° Provette	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALBUMINA (μl)	0	0	5	5	10	10	20	20	30	30	40	40
H_2O milliQ (μl)	200	200	195	195	190	190	180	180	170	170	160	160

A tutte le provette viene aggiunto 1 ml di soluzione C, agitando successivamente le stesse con il vortex.

Dopo 10 minuti, si aggiungono 100 µl di soluzione D, agitando nuovamente con il vortex e avendo cura di limitare l'esposizione dei campioni alla luce.

Si attendono 30 minuti, al termine dei quali si legge l'assorbanza dei campioni a 750 nm di lunghezza d'onda sullo spettrofotometro.

La procedura descritta verrà poi ripetuta allo stesso modo, sostituendo all'albumina quantità adeguate di campione. I campioni di branchia e ghiandola digestiva di *Adamussium colbecki* sono stati diluiti mettendo 4 µl di campione in 196 µl di H₂O milliQ. Si allestisce un numero di provette tale da avere ogni campione in doppio. Anche questa volta, per fare i bianchi, anch'essi in doppio, si sostituisce il campione con un volume identico di tampone di omogeneizzazione.

Nel nostro caso sono stati preparati due bianchi, uno per le provette contenenti tessuto branchiale, uno per quelle contenenti ghiandola digestiva.

La retta di taratura ha equazione $y = bx + a$, dove y rappresenta l'assorbanza media del campione (nota) ed x la concentrazione di proteine da determinare.

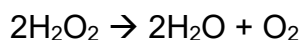
Si calcola la media del bianco, che viene sottratta alla media di ogni campione. Il risultato ottenuto viene diviso per il volume di campione utilizzato, ottenendo così una concentrazione in µg/ml. Si converte infine il risultato in mg/ml dividendo per mille:

$$\text{mg di proteine/ml} = 0,001((y-a)/b) / \text{ml di campione}$$

Il saggio delle proteine totali viene effettuato in parallelo ad ogni saggio enzimatico specifico, per normalizzare la quantità di enzima rispetto alle proteine totali contenute nel campione. Se il rapporto tra Unità enzimatiche/ml e mg di proteine totali/ml è più elevato nei campioni trattati, si sta assistendo ad una risposta antiossidante da parte del tessuto analizzato.

3.4 SAGGIO DELLA CATALASI (CAT)

La catalasi è una proteina contenente 4 gruppi Fe – eme, che catalizza la reazione redox tra 2 molecole di perossido di idrogeno, utilizzato come substrato. Una di queste funge da donatore e l'altra da accettore di elettroni, nella seguente reazione:



È una proteina ubiquitaria in sistemi biologici: tutte le cellule animali e vegetali la contengono, come anche alcuni organismi anaerobi.

Il metodo utilizzato per la determinazione della catalasi è quello di Aebi (1984).

Il principio sottostante la metodica sta nel fatto che la decomposizione dell'H₂O₂, secondo la reazione descritta, può essere misurata tramite la graduale diminuzione d'assorbanza determinata con uno spettrofotometro a 240 nm di lunghezza d'onda, corrispondente al picco di assorbimento del perossido d'idrogeno. La differenza di assorbanza in un intervallo temporale prestabilito costituisce una misura indiretta dell'attività catalasica.

Strumenti e Reagenti:

- Tampone di omogeneizzazione (uguale a quello usato per il dosaggio delle proteine);
- Tampone fosfato Na₂HPO₄ – NaH₂PO₄ 50 mM pH 7,5;
- H₂O₂ 50 mM.

Anche in questo caso si procede eseguendo l'analisi in doppio. Il volume messo in cuvetta è costituito da 2 ml totali di campione e tampone fosfato, con proporzioni differenti in base al tessuto analizzato, assieme a 1 ml di H₂O₂, aggiunto per ultimo.

I bianchi vengono sempre preparati sostituendo il campione con pari volume di tampone di omogeneizzazione.

Il perossido di idrogeno va aggiunto per ultimo, poiché inizierà a reagire istantaneamente con il campione in cuvetta.

Si imposta il programma in modo che lo strumento legga l'assorbanza ogni 10 secondi per 60 secondi, per verificare che il decremento della stessa sia lineare.

Per calibrare lo strumento, prima di procedere con i bianchi, si effettua un autozero con acqua milliQ.

Si definisce Unità di catalasi l'ammontare di enzima che in un minuto provoca l'ossidazione di 1 mmol di H₂O₂:

$$U \text{ CAT/ml} = [(A_i - A_f) / 40] / 1 \times (V \text{ totale} / V \text{ campione}) \times 1000$$

dove:

- A_i = media assorbanza iniziale
- A_f = media assorbanza finale
- 40 = coefficiente di estinzione millimolare di H₂O₂
- 1 = tempo intercorrente tra la prima e l'ultima misura di assorbanza (in minuti)
- 1000 = fattore di conversione da mmoli a μmoli

I valori finali vengono normalizzati rispetto al contenuto proteico:

$$(U \text{ CAT/ml}) / (\text{mg di proteine/ml}) = U \text{ CAT/mg di proteine}$$

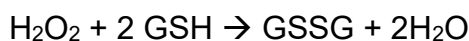
3.5 SAGGIO DELLA GLUTATIONE PEROSSIDASI (GPX)

Le GPX sono una famiglia di metalloproteine, caratterizzate principalmente dalla presenza di selenio nel sito attivo. Si dividono in GPX selenio dipendenti (GPX 1, 2, 3, 4, 6) e non – selenio dipendenti (GPX 5, 7, 8).

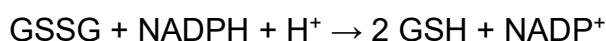
Gli enzimi selenio dipendenti di questa famiglia possono catalizzare la riduzione di perossidi organici e inorganici, come l' H_2O_2 . Gli enzimi non - selenio dipendenti invece sono in grado di catalizzare soltanto la riduzione di perossidi organici (R – OOH).

Sono stati fatti due saggi per determinare, nel primo caso, l'attività delle GPX selenio dipendenti, nell'altro caso quelle totali contenute nel campione.

Questi enzimi catalizzano la riduzione di perossidi o idroperossidi ad acqua o alcoli corrispondenti, utilizzando il glutatione ridotto (GSH) come substrato elettrone-donatore:



La GSSG ripristina a sua volta il suo stato redox utilizzando l'acido nucleico NAPH come donatore di elettroni:



Per lo scopo illustrato sono state preparate tre soluzioni:

- **Soluzione stock**, composta da NAPH 0,15 mM, GSH 2,5mM, NaN_3 1,25 mM e GSH riduttasi in tampone fosfato 125 mM a pH 7,5;
- **Soluzione di H_2O_2** : soluzione al 0,03% in volume, utilizzata come substrato per le Se - GPX;
- **Soluzione di Cumene idroperossido (CHP)**: soluzione al 5,6% in volume, utilizzata come substrato per le GPX totali.

Dopo aver fatto un autozero con acqua ultrapura, sono stati effettuati due bianchi in doppio, uno per branchie e uno per ghiandole, utilizzando stock solution e tampone di omogeneizzazione.

Viene effettuata una lettura di assorbanza ogni 60 secondi, per la durata totale di 300 secondi, a una lunghezza d'onda di 340 nm. Anche in questo caso a scopo di verificare il decremento lineare di assorbanza, che indica il progredire dell'ossidazione dell' H_2O_2 , catalizzata dalle GPX.

Per le branchie si sono utilizzati 100 μ l di campione, mentre per le ghiandole digestive 10 μ l di campione, portati a 100 μ l con acqua milliQ.

Infine, si aggiungono 100 μ l del substrato opportuno per l'analisi: H_2O_2 per le Se - GPX, CHP per le GPX totali.

Si calcola la differenza tra assorbanza finale e assorbanza iniziale. Viene poi calcolata la media delle repliche di ogni misurazione in doppio, da ognuna delle quali si sottrae la media dei bianchi.

Viene calcolata la l'attività enzimatica per unità di volume delle GPX in questione: un'Unità enzimatica di GPX corrisponde alle nanomoli di NADPH ossidato al minuto. La formula utilizzata è la seguente:

$$U \text{ GPX/ml} = [(A_i - A_f) \Delta t / 6,22] \times 1000 / V \text{ campione}$$

Infine, si normalizza il valore ottenuto con la concentrazione di proteine (mg/ml) totali determinate nel campione.

3.6 ANALISI STATISTICA

I valori ottenuti sono riportati come media \pm deviazione standard. Per verificare che i risultati ottenuti siano statisticamente significativi, è stata effettuata l'analisi utilizzando il t-test, messo a disposizione dal programma DOSbox 0.74-3.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 ATTIVITÀ DELLA CATALASI

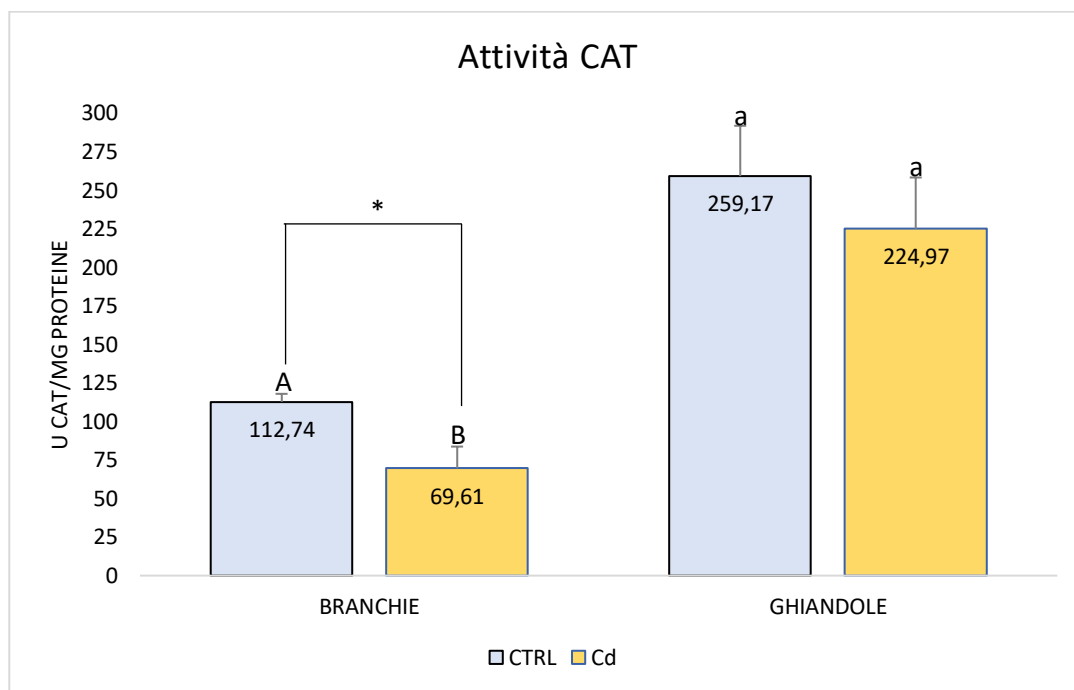


Figura 4.1: Attività della catalasi nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di *A. colbecki*, confronto tra gruppo di controllo e gruppo esposto a Cd. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $p < 0.05$.

Dal grafico (figura 4.1) si denota che l'attività catalasica è decisamente superiore nelle ghiandole digestive rispetto alle branchie, sia in individui di controllo che in individui trattati con l'inquinante. In particolare, in individui di controllo, nelle ghiandole, è pari a circa il 230% di quella delle branchie; in individui trattati con cadmio invece l'attività nelle ghiandole è circa il 320% di quella delle branchie. In analisi precedenti, effettuate in altri laboratori, è risultato che l'organo più soggetto a bioaccumulo in *Adamussium colbecki* è la ghiandola digestiva, possibile motivo per cui in essa si rileva la maggior attività di catalasi rispetto alle branchie.

Dall'analisi emerge una differenza statisticamente significativa tra individui di controllo e individui trattati solamente nelle branchie. In particolare, l'attività della catalasi nei campioni trattati con Cd risulta circa il 160% più bassa rispetto ai controlli delle branchie. Il risultato ottenuto è inaspettato, poiché si era ipotizzato un aumento di attività dell'enzima dovuto allo stress ossidativo, causato dall'esposizione al cadmio.

L'attività diminuita della catalasi potrebbe essere ricondotta a una possibile interferenza del cadmio nella sintesi e/o nell'attività di questo enzima.

Si potrebbe ipotizzare un'eventuale risposta più marcata di altre componenti del sistema antiossidante, presenti nelle branchie, a seguito

dell'esposizione all'inquinante. Come verrà a breve dimostrato, altri enzimi, quali ad esempio le GPX, analogamente alla catalasi, agiscono su un substrato di H₂O₂ in caso di stress ossidativo.

4.2 ATTIVITÀ DELLE Se - GPX

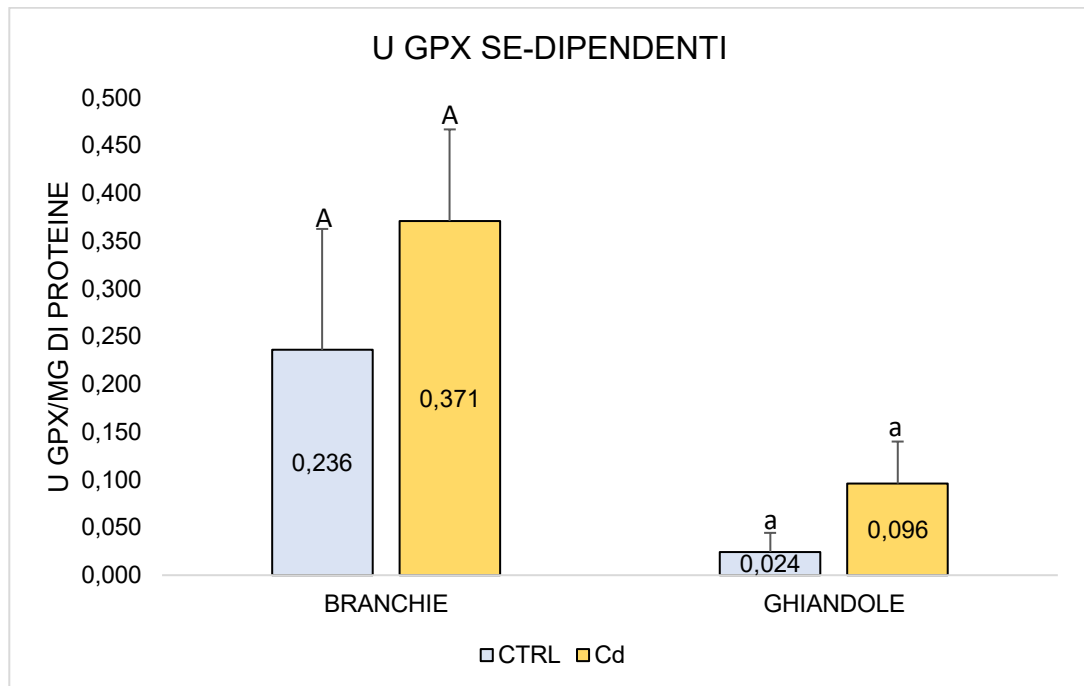


Figura 4.2: Attività delle glutatione-perossidasi selenio dipendenti nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di *A. colbecki*, confronto tra gruppo di controllo e gruppo esposto a Cd. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $p < 0.05$.

Dal grafico in *figura 4.2* si evince che per le Se - GPX si osserva un aumento dell'attività enzimatica nei gruppi trattati rispetto ai controlli, anche se questa differenza non è statisticamente significativa, probabilmente a causa dell'esiguo numero di campioni e dell'elevata variabilità individuale. Sarà pertanto necessario incrementare il numero di individui analizzati per verificare se la supposta differenza tra controlli e trattati possa essere statisticamente significativa.

In particolare, nel caso delle branchie, l'attività di campioni trattati in media è pari circa al 160% dell'attività dei campioni di controllo. Nelle ghiandole digestive l'attività dei campioni trattati in media è pari al 400% di quella dei campioni non trattati.

Si può ipotizzare che le Se - GPX siano enzimi che rispondono efficacemente allo stress ossidativo indotto da cadmio, molto più nelle branchie che nelle ghiandole digestive del mollusco. In riferimento all'ipotesi fatta per la catalasi, è possibile che, a livello branchiale, questi

enzimi siano un compenso alla ridotta attività della catalasi evidenziata poc'anzi.

4.3 ATTIVITÀ DELLE GPX TOTALI

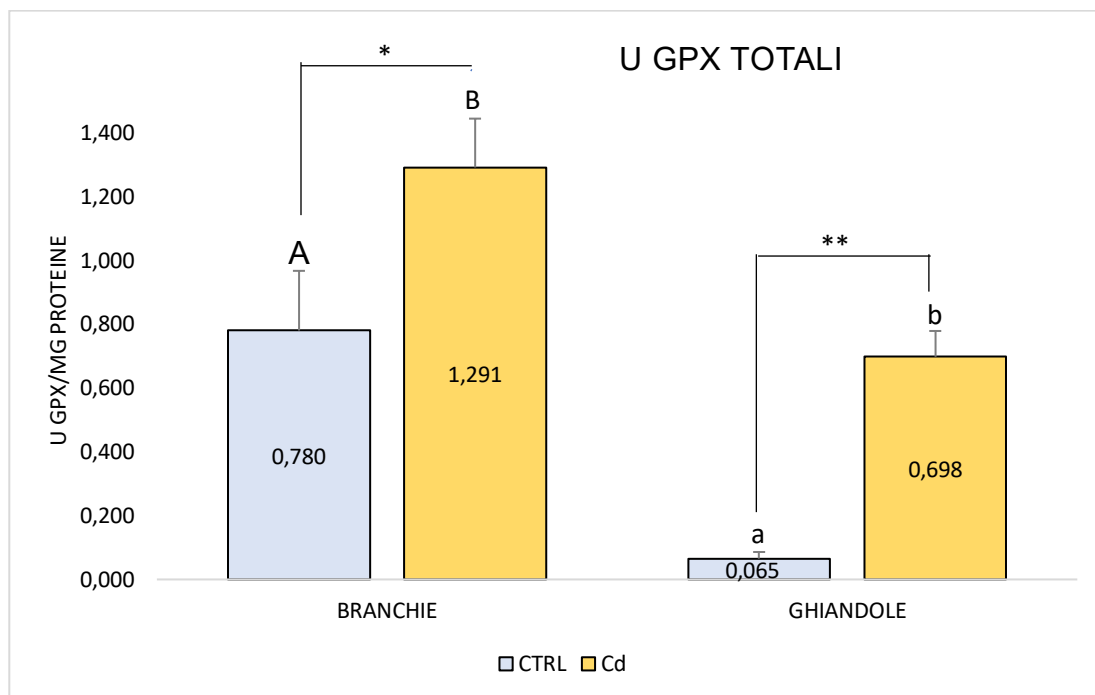


Figura 4.3: Attività delle glutazione-perossidasi totali nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di *A. colbecki*, confronto tra gruppo di controllo e gruppo esposto a Cd. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $p < 0.05$.

La figura 4.3 illustra l'attività delle glutazione perossidasi totali: si evince che è presente una differenza statistica tra controlli e trattati e tra i due tessuti esaminati. In particolare, l'attività enzimatica risulta in media essere aumentata del 165% in branchie trattate rispetto ai controlli e del 1070% circa nelle ghiandole trattate con cadmio rispetto ai controlli.

Si può notare che l'attività enzimatica nei controlli delle branchie è il 1200% di quella riscontrata nelle ghiandole, mentre l'attività nel tessuto branchiale esposto a Cd è circa il 185% di quella riscontrata nelle ghiandole.

Dato che le GPX non Se – dipendenti sono in grado di catalizzare solamente reazioni atte a trasformare perossidi organici in corrispondenti alcoli, si può ipotizzare che l'esposizione a cadmio del mollusco provochi in questi tessuti particolare stress ossidativo dovuto a perossidi organici, fattore non analizzato in questo elaborato.

4.4 CONFRONTO TRA GPX TOTALI E Se - GPX

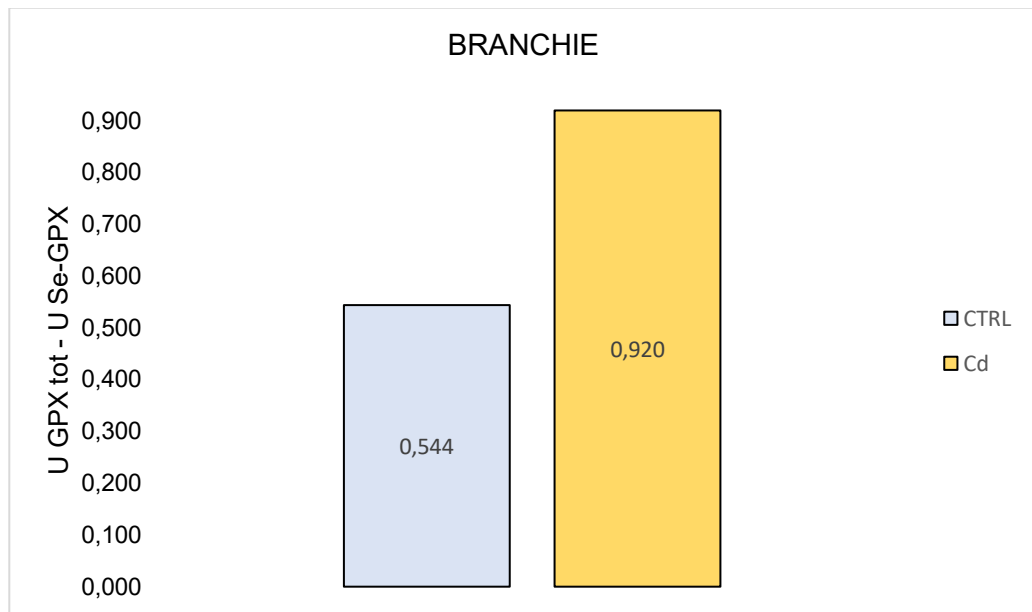


Figura 4.4: confronto di incrementi d'attività di GPX totali e Se - GPX in controlli e in branchie trattate con Cd.

Dalla figura 4.4 si denota che l'attività enzimatica media, nel saggio delle GPX totali, subisce un incremento di +230% nei campioni di controllo, rispetto al suo valore medio registrato per le Se – GPX.

Nei campioni di branchie trattate con l'inquinante si registra un aumento dell'attività enzimatica di +247% rispetto al suo valore medio registrato per le Se – GPX.

Gli incrementi relativi risultano dunque molto simili.

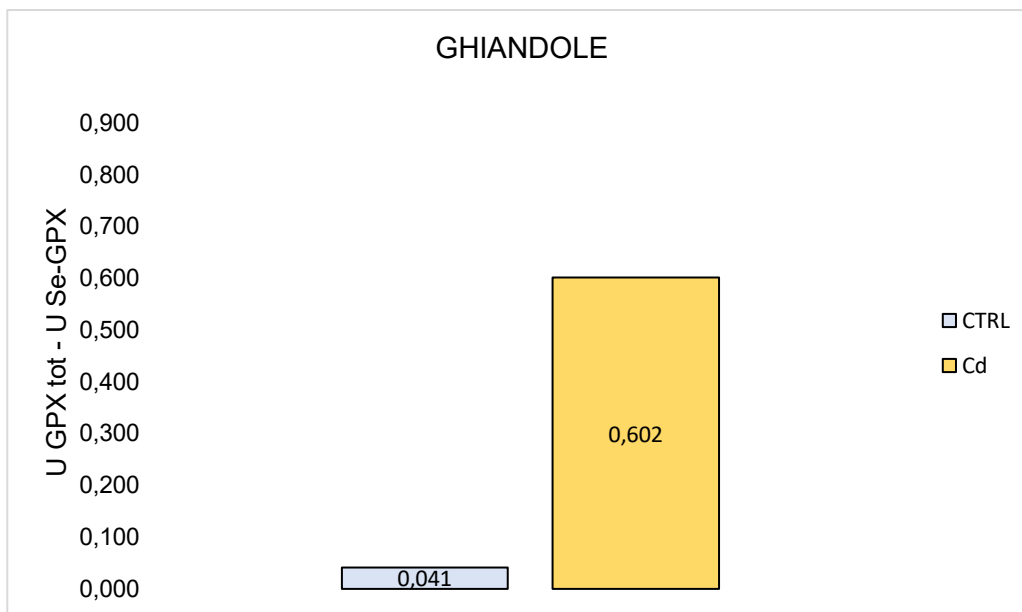


Figura 4.5: confronto di incrementi d'attività di GPX totali e Se - GPX in controlli e ghiandole trattate con Cd.

Dalla figura 4.5 si denota che l'attività enzimatica media, nel saggio delle GPX totali, subisce un incremento di +109% circa, rispetto al suo valore medio registrato per le Se – GPX.

Nei campioni di ghiandole trattate con l'inquinante si registra un aumento dell'attività enzimatica di +627% circa, rispetto al suo valore medio registrato per le Se – GPX.

Il dato sottolinea la differenza statisticamente significativa rilevata nei campioni di ghiandole trattati con l'inquinante, rispetto a quelli di controllo.

5. CONCLUSIONI

Il continente antartico, e gli organismi che lo popolano, sono un biotopo ancora fin troppo scarsamente conosciuto. Nonostante ciò, è evidente come questo ambiente sia una fonte di riferimento preziosa di dati riguardanti la dispersione di inquinanti, del loro bioaccumulo e dell'effetto che potrebbero avere sugli organismi viventi. Questi dati possono darci indicazioni chiare in merito alle conseguenze drammatiche che l'impatto antropico potrebbe avere su questa zona e su tutto il globo. Tuttavia, proprio a causa di tale impatto, che è fattore trainante del cambiamento climatico, le specie e le caratteristiche non ancora scoperte di questo continente rischiano di rimanere tali.

Le analisi dei tessuti trattati della specie chiave *A. Colbecki* hanno rivelato, in parte, la sua capacità di adattamento a condizioni ossidative stressanti, grazie alle quali questo organismo riesce a sopravvivere in un ambiente estremo come il fondale marino antartico.

Il quadro dei sistemi antiossidanti è molto ampio e complesso e le analisi fornite danno spazio solamente ad una visione fortemente parziale degli effetti indotti in *A. colbecki* a seguito di esposizione a cadmio.

Ulteriori ricerche saranno necessarie per comprendere fino a che punto si può spingere la resistenza al bioaccumulo di questa specie e quali modifiche fisiologiche ne possano conseguire.

Una prospettiva futura interessante, ad esempio, potrebbe essere data dall'analisi dell'accumulo di RNA, atta a valutare l'espressione genica trascrizionale degli enzimi antiossidanti CAT e GPX, oltre che dell'attività della proteina stessa, come si è fatto in questo studio.

BIBLIOGRAFIA

Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, Issue C, pp. 121–126). Academic press.

Azzolini R. et al. (2006). 1985 – 2005, Venti anni di ricerche italiane in Antartide. PNRA.

Chapman, C. C., Lea, M.-A., Meyer, A., Sallée, J.-B., & Hindell, M. (2020). Defining Southern Ocean fronts and their influence on biological and physical processes in a changing climate. *Nature Climate Change*, 10(3), 209–219.

Chiantore, M., Cattaneo-Vietti, R., Berkman, P. A., Nigro, M., Vacchi, M., Schiaparelli, S., & Albertelli, G. (2001). Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) spatial population variability along the Victoria Land Coast, Antarctica. *Polar Biology*, 24(2), 139–143.

Clarke, A., & Johnston, N. M. (2003). Antarctic marine benthic diversity. *Oceanography and marine biology*, 41, 47-114.

Convey, P., Bindschadler, R., Di Prisco, G., Fahrbach, E., Gutt, J., Hodgson, D. A., Mayewski, P. A., Summerhayes, C. P., Turner, J., & the ACCE Consortium. (2009). Antarctic climate change and the environment. *Antarctic Science*, 21(6), 541–563.

Focardi, S., Bargagli, R., Corsolini, S. (1993). Organochlorines in antarctic marine food chain at Terra Nova Bay (Ross Sea). *Korean J. Polar Res.*, 4 (2), 73–77.

Glasauer, Andrea, and Navdeep S. Chandel. (2013). “ROS.” *Current Biology*, 23 (3), R100–02.

Lowry, Oliver, H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. L. & Randall, Rose, J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.

Marrone, A., La Russa, D., Brunelli, E., Santovito, G., La Russa, M. F., Barca, D., & Pellegrino, D. (2021). Antarctic Fish as a Global Pollution Sensor: Metals Biomonitoring in a Twelve-Year Period. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 794946.

Pacchini, S. (2022). Are Antarctic fish adapted to face global changes? A study on antioxidant enzymes gene expression in two species from Ross Sea, in environmental natural conditions or exposed to PFOA pollution [Master's thesis]. Università di Padova.

Westerlund S., Ohman P. (1991). Cadmium, copper, nickel, lead and zinc in the water column of the Weddel Sea, Antarctica. *Geochim. Cosmochim. Acta.* (55), 5127-5146.

Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., & Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), 8244–8259.

Viarengo, A., Canesi, L., Mazzucotelli, A., Ponzano, E. (1993). Cu, Zn and Cd content in different tissues of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: role of metallothionein in heavy metal homeostasis and detoxication. *Mar. Ecol. Prog.* (95), 163–168.

SITOGRAFIA

Colacino, M. (1996). *Il Clima*. <https://mna.it/content/collana-antartide>.
Ultimo accesso: 21/11/2023

PROGRAMMA NAZIONALE DI RICERCHE IN ANTARTIDE, PNRA (2019). *Chi siamo. Ricerca. Spedizioni. Stazione Mario Zucchelli. Antartide. Atmosfera e Clima. Cambiamento globale. Biodiversità e adattamento*. <https://www.pnra.aq/>. Ultimo accesso: 02/12/2023