



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

**STUDIO DELLE RISPOSTE ANTIOSSIDANTI DI UN MOLLUSCO
ANTARTICO (*Adamussium colbecki*) IN SEGUITO AD ESPOSIZIONE A BPA**

Relatore:

Prof. Paola Irato

Correlatrici:

Dr.ssa Sara Pacchini

Dr.ssa Elisabetta Piva

Laureanda: Antonia Mamprin

Matricola: 2002513

Anno Accademico: 2022/2023

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. L'ANTARTIDE.....	1
1.2. L'INQUINAMENTO DA BPA.....	3
1.3. LE ROS E LO STRESS OSSIDATIVO.....	4
1.4. GLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI.....	7
1.4.1. LE SUPEROSSIDO DISMUTASI (SOD).....	7
1.4.2. LA CATALASI (CAT).....	8
1.4.3. LE GLUTATIONE PEROSSIDASI (GPx).....	9
2. SCOPO DELLA TESI.....	11
3. MATERIALI E METODI	12
3.1. L'ORGANISMO BIOINDICATORE UTILIZZATO E TRATTAMENTO.....	12
3.1.1. ADAMUSSIUM COLBECKI.....	13
3.2. OMOGENEIZZAZIONE DEI TESSUTI.....	14
3.3. DOSAGGIO PROTEICO (Lowry et al., 1951).....	15
3.4. SAGGIO PER L'ATTIVITÀ DELLE SOD (MilliporeSigma kit, 2018).....	16
3.5. SAGGIO PER L'ATTIVITÀ DELLA CAT (Aebi, 1984).....	17
3.6. SAGGIO PER L'ATTIVITÀ DELLE Se-GPx (Livingstone et al., 1992).....	18
3.7. ANALISI STATISTICA	18
4. RISULTATI	19
5. CONCLUSIONI.....	21
6. BIBLIOGRAFIA	24
7. SITOGRAFIA	28

1. INTRODUZIONE

1.1. L'ANTARTIDE

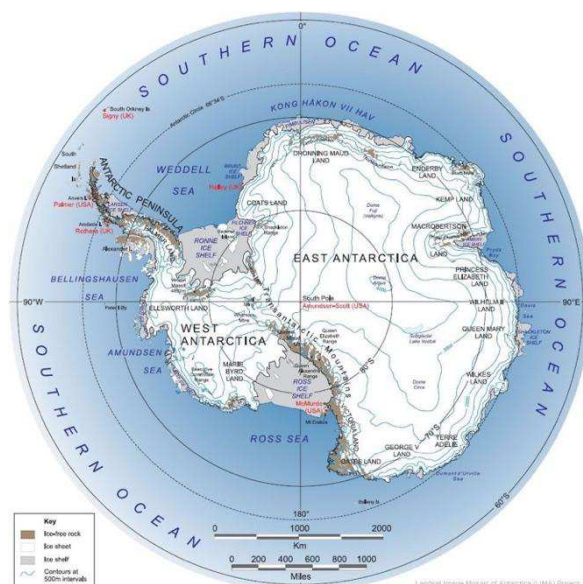


Figura 1.1: Cartina dell'Antartide (LIMA project, PNRA).

L'Antartide è l'ultimo continente selvaggio rimasto sulla terra ed è anche quello più estremo, non solo per le sue condizioni ambientali ma anche per sua la posizione, è localizzato infatti nell'emisfero australe precisamente al Polo Sud, all'interno del Circolo Polare Antartico (parallelo 66°33'Sud). Questo particolare continente mantiene la sua attuale posizione da 45 milioni di anni ed è isolato dalle terre emerse da ben 30 milioni di anni, quando si è distaccato dal Sud America. Per le sue peculiari caratteristiche è pressoché disabitato, ad eccezione del personale scientifico e tecnico che opera nelle stazioni di ricerca. La sua posizione isolata dal resto dei continenti lo rende relativamente distante dalle fonti di inquinamento antropico. Questa sua condizione è mantenuta grazie al Trattato Antartico del 1961 che stabilisce, con il Protocollo di Madrid, che l'area è interamente dedicata alla scienza e quindi nessuna attività potenzialmente dannosa all'ambiente può essere realizzata (S. Esteban et al., 2016). La sua forma sub-circolare è resa tale dalla Penisola Antartica che si estende da Nord a Sud, e dai due grandi golfi posti agli estremi, il Mare di Well e il Mare di Ross (Figura 1.1). La calotta polare è divisa in due parti dal meridiano di Greenwich (0° di longitudine), Antartide Occidentale e Antartide Orientale, le quali si riuniscono ai piedi della Catena Transantartica (PNRA, 2019). Il clima in Antartide è influenzato principalmente dai seguenti fattori: la posizione geografica, cause astronomiche (distanza dal sole), copertura di ghiaccio e la media altitudine. È il continente più freddo del pianeta per la lunga notte polare in inverno, la bassa inclinazione dei raggi solari durante l'estate e la permanente presenza di ghiaccio che si estende per il 98% della sua superficie e per una profondità che va dai 2 ai 4 km e riflette la maggior parte dell'energia solare incidente. La temperatura diminuisce spostandosi dalle coste fino all'interno del continente, negli altopiani la temperatura media dell'estate australe è di -50°C e nelle coste è -4°C, in inverno arrivano a -70°C ad alte altitudini,

con un record di -89.5°C misurato nella stazione di Vostok nel 1983, e vicino al mare a -25°C (**Bargagli, 2005**). Nel corso dell'estate australe, quando riceve la luce del Sole, gran parte delle aree ad ovest della penisola antartica sono libere dal ghiaccio e dalla neve diventando degli ambienti desertici e freddi con comunità sparse di microrganismi e microinvertebrati. La vita si trova soprattutto nelle aree costiere dove l'acqua del mare tampona le basse temperature creando un clima più mite e umido, idoneo per lo sviluppo anche di rare piante da fiore native. L'ambiente marino è molto ricco di specie, a partire da invertebrati come spugne, tunicati, echinodermi fino a pesci, molti dei quali appartengono all'ordine dei Nototenoidei (**Bargagli, 2008**). Sono ambienti termicamente stabili, le temperature variano tra i $-1,9^{\circ}\text{C}$ e fino a oltre i 4°C nei siti più variabili, invece la variazione stagionale della luce porta a grandi cambiamenti nella copertura del ghiaccio marino con conseguente fioritura estiva di fitoplancton breve ma molto intensa (**Convey e Peck, 2019**).

Nonostante le "barriere" naturali descritte in precedenza, la maggior parte dei contaminanti persistenti come metalli, pesticidi e altri inquinanti ambientali sono trasportati dagli altri continenti dell'emisfero meridionale e si trovano nell'aria, nella neve, nei muschi, nei licheni e negli organismi marini, in quantità inferiori rispetto alle specie affini nei continenti antropizzati, ad eccezione dell'accumulo di Hg e Cd in uccelli marini come albatros e petrelli delle nevi. Sebbene con il Trattato Antartico si stabiliscano obblighi per la protezione dell'ambiente, tutte le attività umane, il riscaldamento globale, la crescita della popolazione e lo sviluppo industriale nei paesi in via di sviluppo stanno portando ad un aumento dell'impatto dei contaminanti antropogenici sugli ecosistemi antartici (**Bargagli, 2008**).



Figura 1.2: Logo del Programma Nazionale di Ricerche in Antartide.

L'Antartide è l'unico continente che non si trova sotto la giurisdizione di un singolo stato. La regione è governata da ben 53 stati che hanno firmato il Trattato sull'Antartide del 1961. La distribuzione delle aree protette proposta dai singoli stati si basa sull'ubicazione delle stazioni di ricerca, influenzata a sua volta da fattori geopolitici nazionali. Dei $14.000.000 \text{ km}^2$ dell'Antartide, solo lo $0,18\%$ (circa 25.200 km^2) è privo di ghiacci e agibile per la colonizzazione da parte dell'uomo (**Hughes e Grant, 2017**).

Il Programma Nazionale di Ricerche in Antartide (PNRA) (figura 1.2) intrapreso nel 1985, sostiene la ricerca italiana nel continente Antartico, per approfondire le conoscenze del sistema climatico e monitorare i cambiamenti climatici in atto negli ultimi decenni, garantendo il mantenimento delle infrastrutture per la ricerca. Il PNRA che sostiene il Trattato Antartico a partire dal 1981, è un progetto finanziato dal MUR (Ministero dell'Università e della Ricerca). Le infrastrutture di Ricerca Italiane

sono: la stazione Mario Zucchelli, situata nell'area di Baia Terra Nova, e la stazione Concordia, gestita con un accordo intergovernativo da Italia e Francia; infine da pochi anni è presente anche una nave rompighiaccio italiana nominata Laura Bassi per le ricerche oceanografiche (PNRA, 2019).

1.2. L'INQUINAMENTO DA BPA

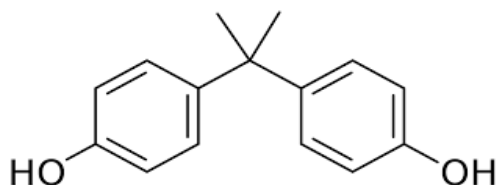


Figura 1.3: struttura molecolare del BPA.

Il BPA (bisfenolo-A) (Figura 1.3) è una molecola organica sintetica costituita da due anelli fenolici legati tra loro da un alcano, e il suo nome completo è 2,2-(4,4'- diidrossifenil) propano. È diffusamente impiegato nella produzione di plastiche in policarbonato e resine epossidiche utilizzate per bottiglie di plastica, biberon, cellulari, contenitori di alimenti, scontrini e molto altro. Il suo grande utilizzo è dovuto alle sue ottime proprietà di trasparenza, resistenza termica e meccanica. È stato il chimico russo Aleksandr Dianin nel 1891 a renderlo noto e in seguito fu sintetizzato da T. Zincke nel 1905. Da quel momento in poi è diventato uno dei composti chimici più utilizzati e prodotti nel mondo, e tutt'ora ne vengono sintetizzate tonnellate all'anno (Baralla et al., 2021). L'utilizzo di BPA nei contenitori alimentari è sotto controllo dell'Unione europea ai sensi del regolamento 10/2011/UE, dal gennaio 2011 la Commissione ne ha vietato l'uso per la produzione dei biberon in policarbonato. In seguito, nel 2015, sono stati introdotti limiti più stringenti sulla quantità di BPA nei materiali a uso alimentare ed è stato dichiarato che la carta termica, quindi scontrini, è la seconda principale fonte di questo contaminante (EFSA, 2015). Questo ha portato alla ricerca di composti alternativi come il bisfenolo S. o il bisfenolo F. che ritroviamo nei prodotti etichettati con la scritta "senza BPA". Questi monomeri vengono sintetizzati tramite una reazione di condensazione del fenolo con un altro reagente, scelto a seconda di quello che si vuole ottenere. Nel caso del BPA viene fatto reagire con acetone, oppure esafluoroacetone, formaldeide o triossido di zolfo per ottenere gli altri analoghi (Thoene et al., 2018). Il BPA appartiene alla categoria 1 della lista di priorità degli interferenti endocrini per la fauna selvatica e la salute umana. È stato inserito nell'elenco delle sostanze in fase di revisione per l'identificazione di sostanze prioritarie o sostanze pericolose prioritarie stabilito dalla direttiva 2008/105/CE sugli standard di qualità ambientale nel campo della politica delle acque (Esteban et al., 2016). Questa sua peculiare caratteristica di interferente endocrino, ossia sostanza esogena che altera la funzionalità del sistema endocrino, si riscontra soprattutto durante lo sviluppo del feto e in età infantile. In particolare il BPA può essere ingerito o inalato quando i materiali rilasciano piccole tracce nei cibi o se scaldati ad alte temperature (ISSalute, 2018).

Inoltre, questa sostanza va ad intaccare diversi organi, andando ad alterare lo sviluppo dei sistemi riproduttivo, nervoso ed immunitario, provocando cancro, malattie cardiovascolari e stress ossidativo.

Il BPA ed altri contaminanti emergenti, sono stati ritrovati in diversi comparti ambientali come corpi idrici, suolo e aria, a seconda di quanto riportato da diversi studi. La sua presenza in aria è associata alle particelle sospese, e questo influenza la sua persistenza e il ruolo del particolato atmosferico nel loro trasporto e deposizione. Inoltre le particelle dell'aria possono essere ingerite o inalate dalle persone e nuocere alla loro salute. Le fonti principali di emissione di BPA che lo rilasciano in atmosfera sono incendi incontrollati di rifiuti domestici, cavi e impianti elettrici. I siti di riciclaggio di rifiuti elettrici sono sempre più in aumento, soprattutto nei paesi in via di sviluppo e contribuiscono significativamente al rilascio di BPA. In atmosfera i bisfenoli hanno una vita relativamente breve, possono essere facilmente degradati per reazione con i radicali idrossilici oppure essere rimossi sotto forma di particelle per deposizione umida o secca (**Vasiljevic e Harner, 2021**).

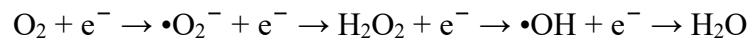
La sua circolazione nell'ambiente acquatico è legata principalmente agli scarichi delle acque reflue delle attività industriali, impianti di trattamento delle acque reflue e processi di combustione. Nello studio di Esteban e colleghi effettuato tra il 2012 e il 2013 sono stati analizzati diversi siti nella regione della Penisola Nord Antartica, la quale si assume soffra significativamente dell'impatto antropico. Si sono monitorati diversi inquinanti e il BPA è stato trovato in uno dei campioni, a dimostrazione che anche questo contaminante emergente ha raggiunto il remoto continente Antartico (**Esteban et al., 2016**). La sua presenza in Antartide è documentata anche da un altro studio, che ha raccolto più di 260 campioni di aerosol atmosferici in tutto il mondo, tra cui le zone polari. Il BPA è stato rilevato in particelle submicroniche (PM_{0,7}) presso la stazione antartica Syowa, si ipotizza il suo arrivo dai continenti meridionali tramite il trasporto troposferico a lungo raggio su larga scala e in quantità minore anche da fonti locali come le stazioni scientifiche internazionali (**Fu e Kawamura, 2010**). È un composto relativamente solubile in acqua a temperatura ambiente e ha una bassa tensione di vapore, per questo non volatilizza facilmente. Il freddo estremo dell'Antartide può ritardare i processi di degradazione microbica e fotolitica, portando a prolungare la sua presenza nel mezzo acquatico e quindi aumentare la sua esposizione nella catena alimentare. È bioaccumulabile ad alte dosi e si suppone che inizialmente non persista nell'ambiente. La Commissione Europea ha finora stabilito che non vi sono evidenze sul rischio effettivo per l'ambiente acquatico, ma la valutazione è in continua revisione (**Esteban et al., 2016**).

Nel caso dei molluschi, che sono organismi target di questo elaborato di tesi, il BPA riesce ad entrare nell'organismo tramite l'apparato boccale per filtrazione dell'acqua contaminata, inalato dall'ambiente acquatico tramite le branchie e anche tramite assorbimento dermale, quindi può essere rilevato nei liquidi e nei tessuti biologici (**Baralla et al., 2021**).

1.3. LE ROS E LO STRESS OSSIDATIVO

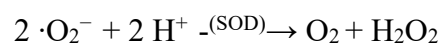
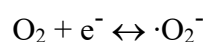
L'ossigeno è una molecola essenziale per il metabolismo degli organismi aerobi, poiché è utilizzato per la produzione di energia tramite la fosforilazione ossidativa. Infatti, le cellule lo utilizzano come accettore finale di elettroni nella catena respiratoria per sintetizzare ATP a livello mitocondriale.

Durante questo processo, la maggior parte dell'ossigeno (circa il 90%) è ridotto ad acqua dalla citocromo ossidasi (**Lushchak e Bagnyukova, 2006**):



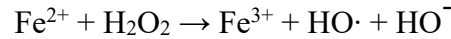
L'ossigeno è quindi fondamentale per la vita di questi organismi, tuttavia può risultare anche pericoloso, poiché la catena respiratoria può interrompersi a vari livelli, non riducendo completamente l'ossigeno ad acqua, ma producendo specie reattive intermedie: le ROS (*Reactive Oxygen Species*). È stato calcolato che in condizioni normali circa il 3% dell'ossigeno usato dalla cellula viene impropriamente convertito in questi intermedi indesiderati (**Santovito et al., 2005**). Al contrario le ROS a concentrazioni moderate possono portare a dei benefici, sono coinvolte nella difesa contro agenti infettivi, mantengono “un'equilibrio redox” e funzionano come antitumorali (**Valko et al., 2007**). Le ROS comprendono sia specie radicaliche che non radicaliche. Le prime sono l'anione superossido ($\cdot\text{O}_2^-$), il radicale idrossile ($\cdot\text{OH}$), il radicale perossile ($\cdot\text{RO}_2$), il radicale alcossile ($\text{RO}\cdot$), il radicale idroperossile ($\text{HO}_2\cdot$) e l'ossigeno singoletto ($^*\text{O}_2$), le seconde comprendono solo il perossido di idrogeno (H_2O_2), comunemente detta acqua ossigenata. La reattività e le caratteristiche di queste specie variano sensibilmente, infatti non sono considerati reattivi in soluzione acquosa né $\cdot\text{O}_2^-$ né H_2O_2 , invece $\cdot\text{OH}$ reagisce facilmente e in maniera indiscriminata con qualsiasi molecola organica. Un aumento di produzione di ROS può avvenire per fenomeni naturali come le radiazioni UV, condizioni di apnea o iperossia, ma anche per la presenza di xenobiotici come contaminanti organici, diossine, metalli pesanti e contaminanti dell'aria (**Livingstone, 2001**). I radicali liberi sono molecole o frammenti molecolari costituiti da uno o più elettroni spaiati in orbitali atomici o molecolari, possono essere carichi o non carichi. Non tutti i radicali liberi sono altamente reattivi, l'ossigeno molecolare che è un diradiale, generalmente non è reattivo, tuttavia reagisce con la maggior parte dei radicali:

- L'ossigeno singoletto ($^*\text{O}_2$) si forma a partire dall'ossigeno molecolare, che ha due elettroni spaiati ma presenti in orbitali di antilegame π^* e hanno spin paralleli, con l'aggiunta di energia come la radiazione elettromagnetica, lo spin di uno dei due elettroni si inverte producendo la forma più reattiva, il singoletto nello stato eccitato ($^*\text{O}_2$). Questo radicale ha la capacità di reagire con una serie di molecole biologiche.
- L'anione superossido ($\cdot\text{O}_2^-$) si forma a partire dall'ossigeno tramite processi metabolici o in seguito a irradiazione fisica, viene considerato la ROS primaria perché da esso si formano tutti gli altri. La sua formazione avviene principalmente all'interno dei mitocondri, quando durante la trasduzione dell'energia lungo la catena di trasporto degli elettroni, alcuni fuoriescono verso l'ossigeno formando il radicale. Questo radicale non passa facilmente le membrane cellulari ed è tenuto a livelli bassi solo dall'enzima superossido dismutasi (SOD).

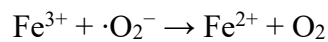
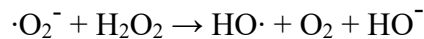


- Il radicale più reattivo e aggressivo di tutti è l'idrossile ($\cdot\text{OH}$), che si genera principalmente tramite due meccanismi: fissazione omolitica di molecole d'acqua a partire da radiazioni ionizzanti o scomposizione del perossido di idrogeno con metalli.

Nella reazione di Fenton è il ferro (Fe^{2+}) che partecipa come catalizzatore con H_2O_2 :



- Invece nella reazione di Haber-Weiss sempre catalizzata da ferro o rame, il perossido reagisce con lo ione $\cdot\text{O}_2^-$ e il Fe^{3+} viene ridotto a Fe^{2+} :



Il radicale ossidrile attacca tutti i componenti della molecola di DNA, dalle basi azotate allo zucchero desossiribosio. Un danno permanente al DNA porta a mutagenesi, cancerogenesi e all'invecchiamento.

- Il radicale perossilico ($\text{ROO}\cdot$), che si forma dalla reazione dell'ossigeno molecolare con un elettrone spaiato di un radicale alchilico, è molto più stabile sia dei radicali del carbonio che dei radicali alcossili ($\text{RO}\cdot$). Essi riescono a propagarsi a distanze modeste nei sistemi biologici.
- Il perossido di idrogeno (H_2O_2) deriva dalla riduzione di due elettroni dell'ossigeno molecolare, è prodotto dai perossisomi come conseguenza delle diverse funzioni metaboliche che consumano ossigeno, dall'azione dell'enzima superossido dismutasi quando agisce sull'anione superossido ($\cdot\text{O}_2^-$) e viene poi utilizzato per ossidare diverse molecole. In condizioni fisiologiche c'è un equilibrio nella sua produzione e decomposizione da parte degli enzimi. Quando vengono danneggiati e gli enzimi non sono più regolati correttamente, il perossido che si trova in eccesso viene riversato nel citosol della cellula. Inoltre può penetrare facilmente nelle membrane e reagire con i metalli di transizione redox-attivi per generare il radicale ossidrile (come nelle reazioni precedentemente illustrate) (**Siraki et al., 2018**).

All'interno dei sistemi biologici, in condizioni fisiologiche, è necessario che sia mantenuto un equilibrio intracellulare tra le attività dei sistemi antiossidanti (enzimatici e non) e la produzione di specie reattive dell'ossigeno. Questo equilibrio, detto equilibrio redox, permette alla cellula di funzionare correttamente e dunque agli organismi di vivere (**Valko et al., 2007**). Lo stress ossidativo si manifesta quando questo equilibrio viene perso, ossia quando c'è un'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che non riesce ad essere contro-bilanciata dalla difesa dei sistemi antiossidanti. Se si viene a perdere questo equilibrio redox, si può andare incontro a cambiamenti molecolari, perossidazione dei lipidi di membrana, alterazioni delle funzioni cellulari, che possono a loro volta causare danni cellulari, a livello del DNA, inattivazione degli enzimi e conseguente danno tissutale (**Siraki et al., 2018**) e può portare inoltre a processi di apoptosi o necrosi.

Lo stress ossidativo oltre all'invecchiamento può formare una serie di patologie, tra cui cancro, aterosclerosi, malattia cardiovascolari, diabete, Alzheimer, lesioni epatiche e difese immunitarie compromesse (**Shankar e Mehendale, 2014**).

1.4. GLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI

Gli organismi aerobi hanno evoluto delle strategie metaboliche per proteggere le cellule dal potenziale effetto dannoso di un eccesso di ROS. Il sistema di difesa antiossidante è costituito infatti da una serie di molecole che svolgono un'azione scavenger e quindi detossificante nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno. Esistono sia antiossidanti non enzimatici, come il glutatione, le vitamine E, A, e C, l'urato (o acido urico), i carotenoidi e le metallotioneine, sia antiossidanti enzimatici, alcuni dei quali verranno descritti nei paragrafi seguenti.

1.4.1. LE SUPEROSSIDO DISMUTASI (SOD)

Per SOD si intende una famiglia di metalloproteine costituita da quattro diversi gruppi: SOD contenenti rame e zinco (Cu,Zn-SOD), SOD contenenti manganese (Mn-SOD), SOD contenenti ferro (Fe-SOD) e SOD contenenti nichel (Ni-SOD). Questi metallo-enzimi sono onnipresenti negli organismi aerobi e proteggono quest'ultimi dagli effetti nocivi dell'anione $\cdot\text{O}_2^-$ catalizzando in maniera efficace la sua dismutazione in O_2 e H_2O_2 tramite un meccanismo ciclico di trasferimento di elettroni di ossidoriduzione (figura 1.4). In particolare la reazione di dismutazione avviene in due passaggi, prima la forma ossidata degli ioni centrali metallici viene ridotta con formazione di ossigeno, in seguito avviene l'ossidazione dello ione metallico e di uno dei due $\cdot\text{O}_2^-$ con rilascio di H_2O_2 (**Mao et al., 2008**).

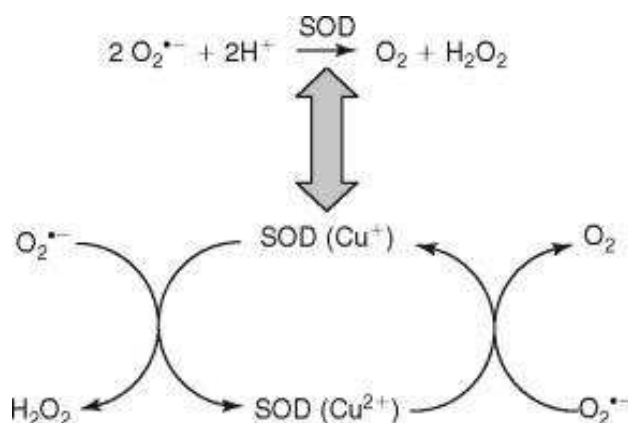


Figura 1.4: Illustrazione schematica della dismutazione catalizzata da Cu,Zn-SOD.

Le superossido dismutasi rappresentano la prima e più importante linea di sistemi di difesa enzimatica antiossidante contro le ROS. Nei mammiferi sono state individuate tre isoforme: la SOD1 e la SOD3

che hanno Cu e Zn come ioni metallici nel loro centro catalitico, la SOD1 è stata trovata nel citoplasma, nei compartimenti nucleari e nei lisosomi delle cellule ed è presente come un dimerico (due unità), invece la SOD3 è localizzata nei compartimenti extracellulari e si presenta come omotetramero (quattro subunità). La SOD2 (Figura 1.5) ha invece il Mn come cofattore, è stata riscontrata nei mitocondri delle cellule aerobiche ed esiste come omotetramero. È stato dimostrato inoltre che la SOD2 compie un importante ruolo nel promuovere la differenziazione cellulare e la genesi del tumore e nella protezione contro la tossicità polmonare indotta dall'iperossia (**Zelko et al., 2002**).

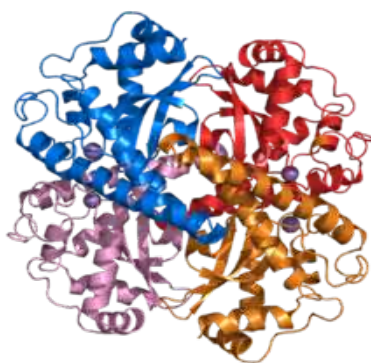


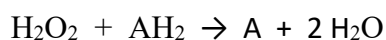
Figura 1.5: Struttura della SOD2 umana

1.4.2. LA CATALASI (CAT)

La catalasi (CAT) appartiene alla classe delle ossidoreduttasi, è un enzima omotetramericico (contiene quattro gruppi eme ferrici) che è in grado di detossificare dal perossido di idrogeno in maniera catalitica con la seguente reazione:



Oppure in maniera perossidatica con un donatore di idrogeno:



Questo enzima è una delle proteine più presenti all'interno dei perossisomi delle cellule dei mammiferi, si può trovare in quantità minore nel citosol e nel nucleo (**Fransen et al., 2012**). Negli organismi aerobici è uno degli enzimi antiossidanti più rilevanti ed è stato isolato sia in organismi eucariotici che procariotici. La carenza o il malfunzionamento della catalasi è connessa a molte malattie come il diabete mellito, la vitiligine, le malattie cardiovascolari, la malattia di Wilson, l'ipertensione e molte altre. In natura esistono tre diversi tipi di catalasi. Il più diffuso è l'enzima monofunzionale costituito da gruppi eme, presente in tutti gli organismi aerobici. Poi c'è un secondo gruppo di catalasi-perossidasi bifunzionale, meno presente in natura e infine una terza classe è costituita da catalasi con Mn a cui manca il gruppo eme (Figura 1.6).

La proteina è stata cristallizzata per la prima volta da Sumner e Dounce dal fegato di un bovino nel 1937, successivamente nel 1984 fu purificata da un batterio aerobico, il *Microccus lysodeikticus* (Nandi et al., 2019).

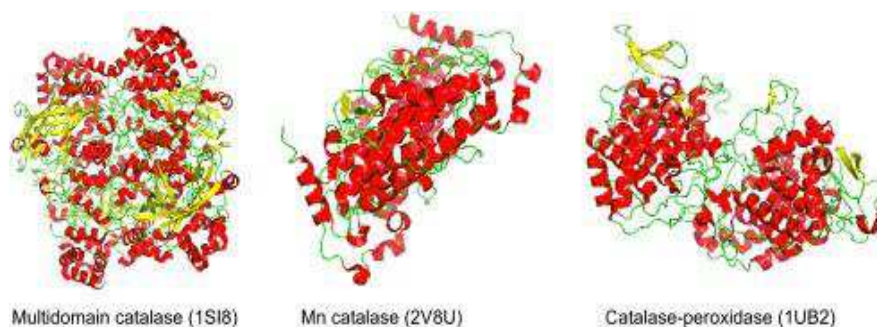
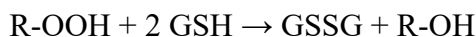
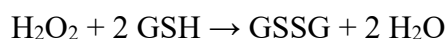


Figura 1.6: Le tre diverse forme di catalasi nei viventi.

1.4.3. LE GLUTATIONE PEROSSIDASI (GPx)

Le glutazione perossidasi (GPx) appartengono a una famiglia di metalloproteine filogeneticamente correlate. Nei vertebrati ne sono state identificate 8 isoforme. Le GPx dalla 1 alla 4 sono selenoproteine, presentano una selenocisteina (Sec) nel centro catalitico della molecola. La GPx6 è una selenoproteina solo negli esseri umani e le restanti (GPx5-7-8) contengono una cisteina (Cys) invece di una selenocisteina. Il centro catalitico delle GPx è una tetraide di amminoacidi composta da Sec o Cys, glutammina (Gln), triptofano (Trp) e asparagina (Asn). Questo assetto amminoacidico è mantenuto in quasi tutti i membri della famiglia. Le GPx catalizzano la riduzione di H₂O₂ o di idroperossidi organici rispettivamente in acqua o negli alcoli (R-OH) corrispondenti, e utilizzano il glutatione (GSH) come riducente (Brigelius Flohé e Maiorino, 2013), solo però le GPx selenio dipendenti (Se-GPx) catalizzano la riduzione di perossidi sia organici che inorganici, invece quello non Se-dipendenti agiscono solo sui perossidi organici. Di seguito le reazioni generiche per le GPx:



(Livingstone et al., 1992)

La GPx1 è localizzata nei globuli rossi, nel fegato, nei polmoni e nei reni, e a livello cellulare nel citosol, nucleo e mitocondri. È stata la prima ad essere identificata e come omotetramero reagisce con H₂O₂ e con gli idroperossidi organici solubili e a basso peso molecolare. La GPx2 che è strettamente correlata alla 1, si trova nell'intestino, incluso l'epitelio dell'esofago e il fegato negli umani, si dice che agisca come una barriera all'assorbimento degli idroperossidi derivanti dal cibo ingerito. Si accumula nel citosol e nel nucleo delle cellule. La GPx3 anch'essa molto simile alla 1, la

troviamo in rene, plasma, polmone, placenta, cuore e pochi altri, e la sua localizzazione subcellulare è il citosol. La GPx4 si trova sempre in diversi organi, nel nucleo, nel citosol e nei mitocondri delle cellule, è un monomero e non presenta la configurazione a tetramero, caratterizzata come proteina inibitrice della perossidazione lipidica, perché in grado di ridurre idroperossidi complessi come quelli dei fosfolipidi o del colesterolo anche inseriti in membrane. La GPx5 è secreta nell'epididimo e si trova anche nelle cellule epiteliali. Invece la GPx6 è presente nell'epitelio olfattivo. Le GPx 7 e 8 sono quelle meno conosciute per la loro recente scoperta. Nei vegetali e negli invertebrati queste proteine sono state classificate come un altro gruppo di perossiredossine perché non utilizzano il GSH come riducente ma le tioredossine (Trx) (Margis et al., 2008).

2. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni c'è sempre più sensibilità riguardo ai cambiamenti climatici e alla distribuzione globale di contaminanti ambientali, e diventa sempre più importante capire quali sono le conseguenze di questi fenomeni sugli ecosistemi e sulle loro comunità biotiche.

Nel continente Antartico lo studio di questi fenomeni è molto interessante, poiché gli organismi vivono in un ambiente molto particolare, caratterizzato da temperature molto basse ($-1,9^{\circ}\text{C}$) e bassa salinità, condizioni che rendono elevata la concentrazione di ossigeno nell'acqua e nei fluidi corporei. Una pressione parziale dell'ossigeno maggiore porta ad una maggiore probabilità di produzione delle ROS. Anche altri fenomeni come la presenza di ghiaccio, i cambiamenti stagionali nell'intensità della luce e la disponibilità di cibo possono influenzare la formazione e la successiva rimozione delle ROS. Questa tesi si colloca all'interno di un progetto del PNRA che prende il nome di AntaGPS, ossia *Antarctica as a Global Pollution Sensor*. Questo progetto, ideato nel 2018, si pone come obiettivo il biomonitoraggio di inquinanti tradizionali ed emergenti, la valutazione dei loro effetti e il loro andamento nel tempo. L'Antartide, continente isolato e incontaminato, mostra in maniera più marcata gli effetti dei contaminanti ambientali sull'ecosistema e la biodiversità, e gli organismi endemici, sensibili ai cambiamenti ambientali, possono essere così utilizzati come bioindicatori ambientali.

Il bivalve *Adamussium colbecki* presenta infatti queste caratteristiche essendo un organismo endemico dell'Antartide e avendo una distribuzione circumpolare ampia. Filtra grandi quantità di acqua per le sue esigenze nutrizionali e respiratorie, quindi può bioaccumulare nei propri tessuti i contaminanti disciolti in mare. Secondo molti studi, la tossicità indotta dagli inquinanti (come il BPA) è associata ad un maggiore rischio di stress ossidativo, al quale l'organismo spesso risponde attivando o amplificando il suo sistema di difesa antiossidante, tramite molecole scavenger ed enzimi antiossidanti. È così possibile dare una valutazione sull'influenza di questi inquinanti sulla fisiologia degli organismi, basandosi sulle risposte biochimiche associate ai loro sistemi antiossidanti (**Regoli et al., 1997**).

È stato riportato che i bivalvi, rispetto ad altri organismi acquatici, hanno una minore capacità di metabolizzare i composti organici. Inoltre, questi molluschi, essendo predati da pesci, stelle marine e crostacei, costituiscono un importante anello nella catena alimentare. L'assimilazione dei contaminanti da parte dei bivalvi dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche dei composti, ad esempio le sostanze più lipofile sono più compatibili con il tratto digerente, mentre quelle meno lipofile con le branchie a contatto diretto con l'acqua (**Baralla et al., 2021**). Attualmente, a nostra conoscenza, non sono presenti molti studi in letteratura che documentino le risposte antiossidanti o comunque l'effetto che l'accumulo di BPA potrebbe provocare in questi organismi antartici, quindi rimangono aperte diverse possibilità di indagine in merito.

Lo scopo di questo studio è stato di verificare le risposte fisiologiche, in termini di attività degli enzimi antiossidanti (SOD; CAT; GPX), di *Adamussium colbecki* in seguito ad esposizione per 10 giorni a $25\ \mu\text{g/l}$ di BPA. Le risposte indotte dal trattamento negli individui del gruppo sperimentale sono state confrontate con le risposte individuate negli individui appartenenti ad un gruppo di controllo. I tessuti analizzati sono le branchie e le ghiandole digestive. In particolare, le ghiandole digestive sono il primo sito di assorbimento degli xenobiotici naturali e antropogenici (**Livingstone, 1991**) e le branchie, tessuto deputato alla respirazione, sono in continuo contatto con l'acqua di mare contenente i contaminanti ambientali.

3. MATERIALI E METODI

3.1. L'ORGANISMO BIOINDICATORE UTILIZZATO E TRATTAMENTO

Gli organismi utilizzati per queste analisi appartenenti ad una specie di mollusco antartico (*Adamussium colbecki*), sono stati pescati nei pressi della stazione italiana Mario Zucchelli, nella Baia di Terra Nova dinnanzi al Mare di Ross (74°42'S, 164°7'E), durante la XXXVII spedizione italiana in Antartide (periodo 2021-2022). Gli esemplari, una volta portati nei laboratori della stazione di ricerca (Figura 3.1), sono stati posti in acquari aerati e termostati a 0°C per 4 giorni in modo tale da permettere loro di acclimatarsi in seguito allo stress subito con la cattura. Sono state poi allestite due vasche in cui gli organismi sono rimasti per 10 giorni: una rappresentava il gruppo di controllo, quindi molluschi mantenuti in condizioni naturali, e l'altra rappresentava il gruppo sperimentale con molluschi esposti ad una dose di 25 µg/l di BPA. Alla fine di questo periodo di esposizione, gli organismi sono stati sacrificati e dissezionati, separando i tessuti molli dal guscio e andando ad isolare i tessuti o gli organi di interesse. I campioni raccolti sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C, in attesa di essere trasportati in Italia per le successive analisi di laboratorio.

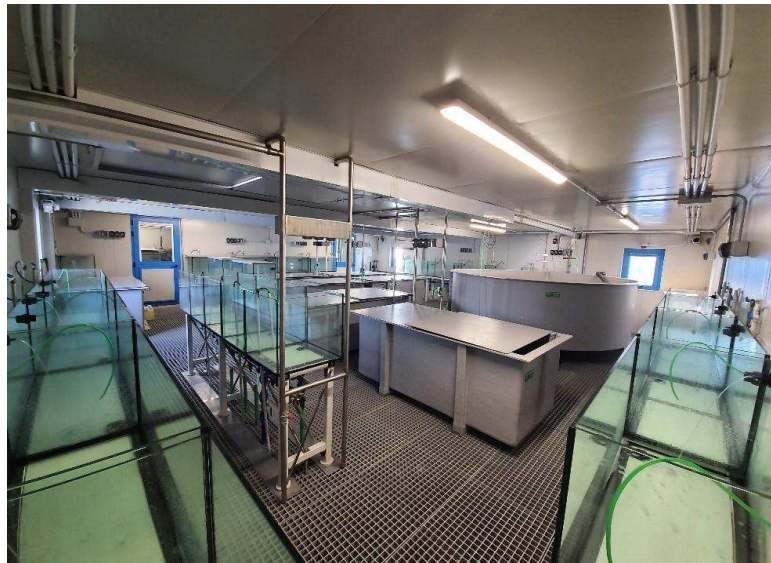


Figura 3.1: Laboratorio acquario della stazione di ricerca italiana Mario Zucchelli (foto del PNRA).

3.1.1. ADAMUSSIUM COLBECKI



Figura 3.2: Morfologia esterna di un individuo di *Adamussium colbecki* (G. Moro et al., 2019).

CLASSIFICAZIONE

Regno: Animalia

Phylum: Mollusca

Classe: Bivalvia

Ordine: Pectinoidea

Famiglia: Pectinidae

Genere: *Adamussium*

Specie: *Adamussium colbecki* (Smith, 1902)

Adamussium colbecki (figura 3.2) è l'unico bivalve appartenente all'ordine Pectinida nell'Oceano Antartico. La sua presenza si riduce alla sola piattaforma continentale Antartica, dove è il più comune tra i bivalvi endemici (Moro et al., 2019). È stato descritto per la prima volta da Smith nel 1902 nei pressi di Franklin Island, nel Mare di Ross.

Per le sue insolite dimensioni, per i valori di biomassa, densità e per la sua grande distribuzione è una specie adatta per lo studio sui cambiamenti climatici e sull'impatto dell'inquinamento. Questo mollusco è fortemente stenotermico, in alcuni studi ha mostrato un tasso di mortalità del 50% dopo 19 giorni di esposizione a 4°C, temperatura di tre gradi superiore di quella massima percepita in Antartide nei mesi dell'estate australe, inoltre mostra un notevole adattamento metabolico agli ambienti freddi (Moro et al., 2019). La distribuzione delle popolazioni di *Adamussium* lungo le coste Antartiche dipende da diversi fattori ambientali, come le caratteristiche dei fondali, la quantità di cibo fornita dalla colonna d'acqua e anche dalla quantità di predatori presenti, come stelle di mare e pesci. *A. colbecki* si trova su diversi tipi di substrati: in acque poco profonde si trovano attaccati a rocce e

invece in profondità si trovano liberi sui fondali sabbiosi, ghiaiosi e anche limosi, gli esemplari giovani si trovano principalmente ancorati agli adulti o su altri substrati come macroalghe o substrati artificiali. Le popolazioni a McMurdo e Wood Bay mostrano un'abbondanza significativa tra i 5 e 15 m di profondità invece all'interno della Baia di Terra Nova la biomassa principale si trova tra i 40 e i 70 m. Queste differenze dipendono dalla diversa persistenza del ghiaccio in queste aree, che è minore a Baia Terra Nova rispetto alle altre località. Diverso è anche il periodo di maturazione delle femmine, a McMurdo si verifica all'inizio della primavera australe invece a Terra Nova Bay si osserva all'inizio di febbraio (**Chiantore et al., 2001**).

A causa dei bassi livelli di minerali e di sostanza organica incorporabile nelle acque antartiche, il suo guscio è molto sottile e fragile, questo inoltre è la conseguenza di un'evoluzione avvenuta in ambienti con bassa energia idrodinamica (data dalla copertura di ghiaccio) e dall'assenza di predatori durofagi nella fauna antartica (**Dell'Acqua et al., 2019**). Nella conchiglia si possono distinguere degli anelli concentrici di crescita, utilizzati infatti per stimare l'età dell'individuo, correlati all'attività metabolica e all'alimentazione dell'individuo. Nello studio sulla distribuzione della popolazione di *Adamussium* sulle coste Antartiche, Chiantore et al. (2000) mise in luce la presenza notevole di individui adulti, appartenenti a diverse classi d'età, questa caratteristica mostra una popolazione stabile che predilige una selezione di tipo K, ossia un lento tasso di crescita e un'ottimizzazione delle risorse nel freddo ambiente antartico. Attorno ai 30-50 mm di lunghezza raggiungono la maturità sessuale e i giovani esemplari si distaccano dagli adulti per incrementare le loro dimensioni, questo momento è strettamente correlato alla fioritura del fitoplancton. Il ciclo riproduttivo è controllato da fattori endogeni ed esogeni, come condizioni ambientali e disponibilità di cibo, le femmine depongono uova di piccole dimensioni, e successivamente si sviluppano le larve planctofiche che si nutrono di materia organica e plancton batterico. Dagli studi riportati emerge che questo bivalve svolge un ruolo fondamentale nel flusso di materia organica lungo la colonna d'acqua, dal compartimento bentico a quello pelagico dell'ecosistema litorale antartico, questo per la sua grande abbondanza e biomassa, fattori che dipendono dalla disponibilità di cibo offerta dalla colonna d'acqua, correlata ai cambiamenti stagionali (**Chiantore et al., 2000**). È una specie dioica e si possono distinguere maschi e femmine dalla colorazione delle gonadi, sono color crema quelle maschili e invece arancioni quelle femminili (**Chiantore et al., 2002**). *A. colbecki* è una specie epifaunale che si nutre di sostanze in sospensione tramite filtrazione, filtra l'acqua tramite le branchie e trattiene le particelle e le sostanze nutritive in essa contenute, nella sua dieta predilige il fitoplancton, le diatomee e i foraminiferi. Il suo tasso medio di filtraggio è di $3 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ (**Stockton, 1984**).

3.2. OMOGENEIZZAZIONE DEI TESSUTI

Gli organi considerati erano riuniti in porzioni da circa 1-2 grammi ciascuno. I tessuti sono stati omogeneizzati meccanicamente in un volume di tampone di omogeneizzazione (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, contenente EDTA 1mM, saccarosio 0,5 M, KCl 0,15 M e DTT 1mM) pari a 4 volte il peso in grammi del campione (4-8 ml). Successivamente i tessuti sono stati sminuzzati meccanicamente con il Polytron e centrifugati a 20,000 rpm per 50 minuti alla temperatura di 4°C. Il supernatante ottenuto è stato prelevato e trasferito in provette Eppendorf. L'estratto cellulare è stato conservato a -80°C, previo congelamento in azoto liquido, ed è stato poi utilizzato per le successive analisi biochimiche.

3.3. DOSAGGIO PROTEICO (Lowry et al., 1951)

Il contenuto proteico dell'estratto cellulare viene determinato utilizzando il reagente fenolico *Folin-Ciocalteu* secondo la metodica di **Lowry et al. (1951)**. La concentrazione proteica di ciascun campione, espressa in mg/ml, viene calcolata mediante regressione lineare tra quantità note e crescenti di standard, ossia albumina sierica bovina (BSA), e relativi valori di assorbanza misurati a 750 nm.

I reagenti utilizzati sono di seguito elencati:

- Soluzione A: Na₂CO₃ 2% NaOH 0,1 M
- Soluzione B: CuSO₄ x 5 H₂O 0,5% in citrato di sodio 1%
- Soluzione C: 25 ml di soluzione A + 0,5 ml di soluzione B (rapporto 1 a 50)
- Soluzione D: 1,36 ml di H₂O + 1 ml FOLIN
- BSA
- Campioni
- Tampone di omogeneizzazione

Come prima cosa si costruisce la retta di taratura con quantità note e crescenti di BSA e H₂O milliQ per un volume totale di 200 µl in ogni provetta di vetro (secondo lo schema in Tabella 3.1).

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 ₂ O milliQ (µl)	200	200	195	195	190	190	180	180	170	170	160	160

Tabella 3.1: schema retta di taratura.

Tutte le provette sono preparate in doppio e per i due bianchi si sostituiscono le aliquote di BSA con eguali volumi di tampone di omogeneizzazione. Successivamente si aggiunge 1 ml di soluzione C e si lascia agire per 10 minuti. Poi si aggiungono 100 µl di soluzione D e si lascia ad incubare per 30 minuti. Infine, si determina l'assorbanza con lo spettrofotometro a 750 nm. Dopo aver ricavato l'equazione della retta di taratura, si ripete il protocollo in doppio per i campioni, sostituendo al BSA 4 µl di campione ed aggiungendo quindi 196 µl di H₂O milliQ e si determinano le assorbanze. Per ogni doppio si calcola la media delle assorbanze e in seguito si sottrae alle medie dei campioni la media del bianco. La concentrazione delle proteine in mg/ml si trova con la seguente formula:

$$\frac{\text{mg di proteine}}{\text{ml}} = \frac{y - a}{b} \times \frac{0,001}{\text{ml campione}}$$

Dove

y: è l'assorbanza nella retta di taratura che ha equazione $y = bx + a$, e x è la concentrazione di proteine da determinare.

- a: intercetta della retta di taratura.
 b: coefficiente angolare della retta di taratura.
 0,001: fattore di conversione da μg a mg .

3.4. SAGGIO PER L'ATTIVITÀ DELLE SOD (MilliporeSigma kit, 2018)

Il Saggio per determinare l'attività delle SOD è un test indiretto e si basa sull'abilità dell'enzima di eliminare $\cdot\text{O}_2^-$ e inoltre di inibire la reazione causata dall'anione.

Il kit consente il dosaggio delle SOD utilizzando il sale di tetrazolio **WST-1** altamente idrosolubile che produce un colorante idrosolubile, il **formazan WST-1**, in seguito alla riduzione con un radicale superossido ($\cdot\text{O}_2^-$), come illustrato nella figura 3.3:

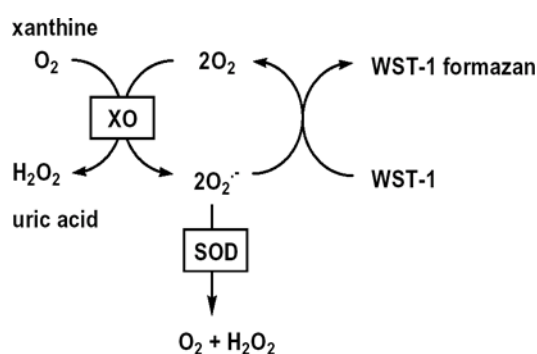


Figura 3.3: principio di funzionamento del kit per la SOD.

Componenti del kit:

- WST Soluzione operativa
- Soluzione enzimatica
- Tampone di omogeneizzazione
- Tampone di diluizione

Il saggio viene fatto in triplo per campioni e bianchi. La piastra per eseguire il kit si allestisce utilizzando le seguenti quantità di reagenti (Tabella 3.2):

	Campione	Bianco 1	Bianco 2	Bianco 3
Soluzione con campione	20 μl	---	20 μl	---
Tampone di omogeneizzazione	---	20 μl		20 μl
WST Soluzione operativa	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl
Soluzione enzimatica	20 μl	20 μl	---	---
Tampone di diluizione	---	---	20 μl	20 μl

Tabella 3.2: schema delle soluzioni e delle quantità da utilizzare nella piastra.

La piastra viene poi incubata a 37°C per 20 minuti e successivamente si determina l'assorbanza a 450 nm utilizzando un lettore di micropiastre. L'assorbanza è proporzionale alla quantità di anione superossido, l'attività della SOD, come attività inibitrice, viene quantificata misurando il decremento di assorbanza del **formazan WST-1**.

L'attività della SOD è calcolata come % di inibizione tramite la seguente equazione:

$$\text{Attività SOD (tasso di inibizione \%)} = \frac{(A_{\text{Bianco 1}} - A_{\text{Bianco 3}}) - (A_{\text{Campione}} - A_{\text{Bianco 2}})}{(A_{\text{Bianco 1}} - A_{\text{Bianco 3}})} \times 100\%$$

Il valore ottenuto dell'attività è stato poi normalizzato con il contenuto di proteine totali nel campione, precedentemente calcolato, con la seguente formula:

$$\frac{\frac{U \text{ SOD}}{ml}}{mg \text{ di proteine}} = \frac{U \text{ SOD}}{mg \text{ di proteine}}$$

3.5. SAGGIO PER L'ATTIVITA' DELLA CAT (Aebi, 1984)

L'attività della catalasi è stata quantificata tramite la metodica di Aebi (1984), la quale misura la diminuzione di assorbanza a 240 nm con uno spettrofotometro (UV), derivata dalla dismutazione del perossido di idrogeno. Il saggio viene eseguito in doppio per ogni campione e per il bianco. Per i campioni si utilizza il tampone fosfato a pH 7,5 (50 mM), e il campione per un volume totale di 2 ml, per i bianchi si sostituisce al campione un pari volume di tampone di omogeneizzazione. Prima di inserire la cuvetta nell'apposito vano si aggiunge velocemente 1 ml di H₂O₂ (50 mM). La cinetica enzimatica viene misurata ogni 5 secondi per 1 minuto a temperatura ambiente. Tutto il procedimento è stato eseguito per 5 campioni di branchie e 5 campioni di ghiandole digestive.

L'attività enzimatica si è calcolata per unità di volume, secondo la seguente formula:

$$U \frac{CAT}{ml} = \left[\frac{(A_i - A_f)}{40} \right] \times \left(\frac{V_{\text{totale}}}{V_{\text{campione}}} \right) \times 1000$$

Si definisce Unità catalasica quella quantità di enzima che in un minuto provoca l'ossidazione di 1 mmole di H₂O₂

A_i e A_f sono rispettivamente l'assorbanza media iniziale e finale, 40 è il coefficiente di estinzione millimolare di H₂O₂ (ε), 0,833 è il tempo di intercorrenza tra la prima e l'ultima misura di assorbanza (in minuti), e infine 1000 è il fattore di conversione per passare da mmoli a μmoli.

I valori ottenuti vengono poi normalizzati rispetto al contenuto proteico totale del campione:

$$\frac{\frac{U \text{ CAT}}{ml}}{mg \text{ di proteine}} = \frac{U \text{ CAT}}{mg \text{ di proteine}}$$

3.6. SAGGIO PER L'ATTIVITÀ DELLE Se-GPx (Livingstone et al., 1992)

La metodica utilizzata in questo saggio è quella di Livingstone et al. (1992), che valuta l'attività delle GPx Se-dip utilizzando H₂O₂ come substrato che viene consumato.

Viene misurata la velocità di ossidazione del NADPH operata dall'eccesso di glutatione reduttasi (GR) per la riduzione del GSSG a GSH. La cinetica enzimatica è seguita ogni minuto per 5 min a temperatura ambiente, leggendo l'assorbanza a 340 nm.

È stata utilizzata una stock solution con 0,0062 g di NADPH (0,15 mM), 0,019 g di GSH (2,5 mM), 0,002 g di NaN₃ (1,25 mM) e 52,5 µl di GSH-reduttasi in tampone fosfato (125 mM, pH 7.5). Il bianco è stato effettuato con 800 µl di stock solution e 100 µl di tampone di omogeneizzazione, per misurare i campioni invece si sostituisce il tampone con 100 µl di campione per le branchie e 10 µl per le ghiandole, più 90 µl di H₂O milliQ per un totale di 100 µl. Prima di misurare l'assorbanza con lo spettrofotometro si aggiungono 100 µl di H₂O₂ che è il substrato per le GPx selenio-dipendenti.

L'attività enzimatica della GPx (U GPX) è pari alle nmol di NADPH ossidato al minuto per unità di volume e viene calcolata con la seguente formula:

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

Il valore ottenuto dell'attività è stato poi normalizzato con il contenuto di proteine totali nel campione, precedentemente calcolato, con la seguente formula:

$$\frac{\frac{U \text{ GPx}}{ml}}{mg \text{ di proteine}} = \frac{U \text{ GPx}}{mg \text{ di proteine}}$$

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 della varianza a una via (ANOVA), seguita dal test di Student-Newman-Keuls nel caso il livello di p < 0,05.

4. RISULTATI

I risultati ottenuti non evidenziano in seguito al trattamento alcuna differenza statisticamente significativa nell'attività delle SOD in entrambi gli organi, anche se nelle branchie apparentemente sembra esserci una minore attività. L'attività delle SOD (Figura 4.1) appare inoltre maggiore nelle branchie rispetto alle ghiandole digestive sia nei controlli che nei trattati con BPA. In particolare, nel gruppo dei controlli l'attività delle SOD è maggiore di 10 volte rispetto alle ghiandole, nel gruppo dei trattati di 7 volte.

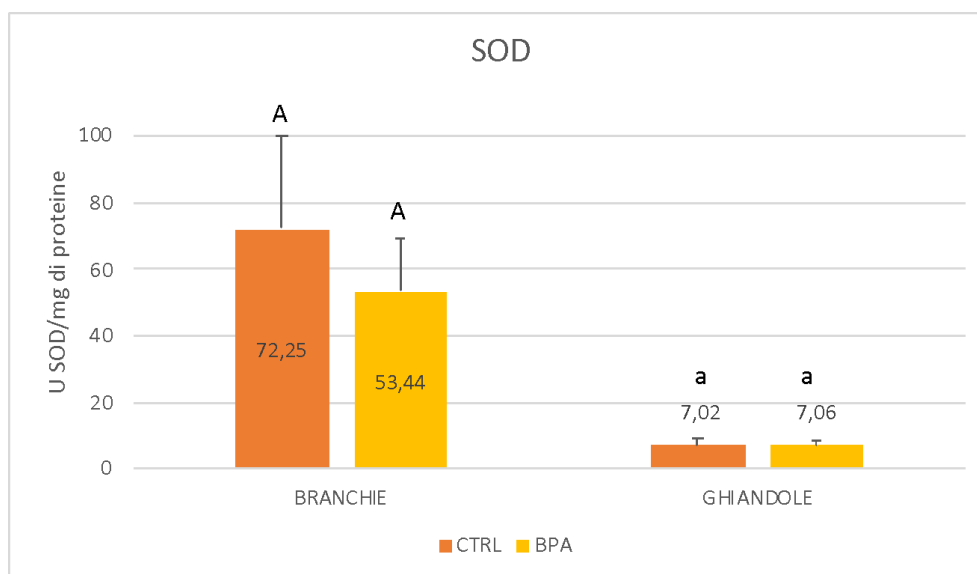


Figura 4.1: Attività delle superossido dismutasi nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di *A. colbecki*, confronto tra gruppo di controllo e gruppo esposto a BPA. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $p < 0.05$.

Dalla Figura 4.2 si può vedere che anche l'attività della catalasi (CAT) non è statisticamente diversa tra i due gruppi, controlli e trattati.

Sia nelle branchie che nelle ghiandole digestive, sembrerebbe esserci una lieve tendenza alla diminuzione dell'attività in seguito al trattamento con BPA.

La quantità di enzima è nettamente maggiore nelle ghiandole rispetto alle branchie ($p < 0.05$), e lo si riscontra sia nei controlli che negli organismi esposti all'inquinante. In particolare per il gruppo controlli l'attività della catalasi risulta più del doppio nelle ghiandole rispetto alle branchie, mentre nel gruppo degli organismi trattati con BPA risulta 3 volte maggiore.

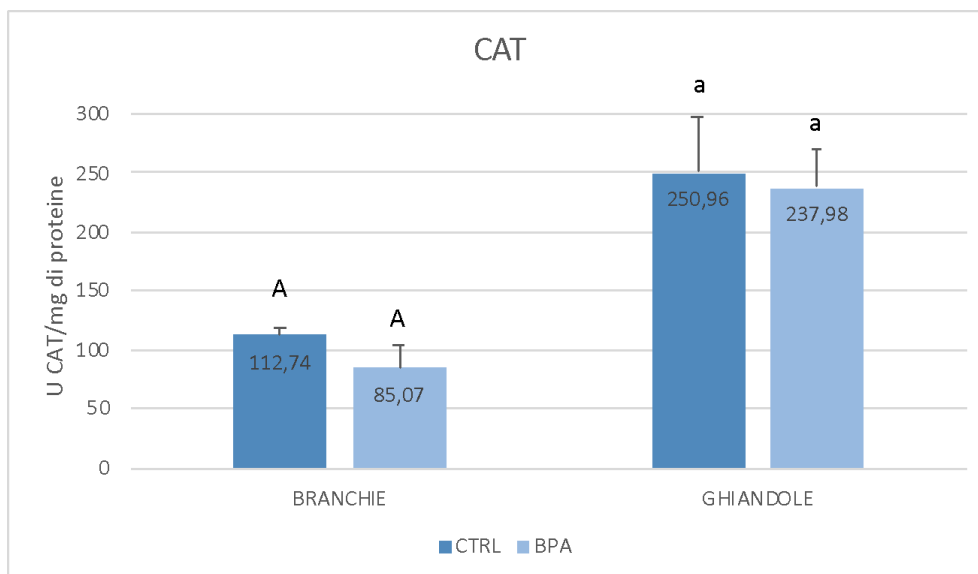


Figura 4.2. Attività della catalasi nei tessuti di branchie e ghiandole digestive in *A. colbecki*, confronto tra gruppo controllo e gruppo esposto a BPA. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $p < 0,05$.

La situazione appare diversa invece per le glutazione perossidasi (GPx), come illustrato dalla Figura 4.3. In entrambi gli organi l'attività delle GPx è aumentata in maniera statisticamente significativa ($p < 0,05$) in seguito al trattamento con BPA, nelle branchie il livello delle GPx è aumentato di circa 4 volte invece nelle ghiandole di ben 60 volte rispetto ai controlli.

In questo caso, come per la SOD, l'attività dell'enzima sembra in entrambi i gruppi sperimentali maggiore nelle branchie, ma la differenza con le ghiandole digestive non risulta statisticamente significativa.

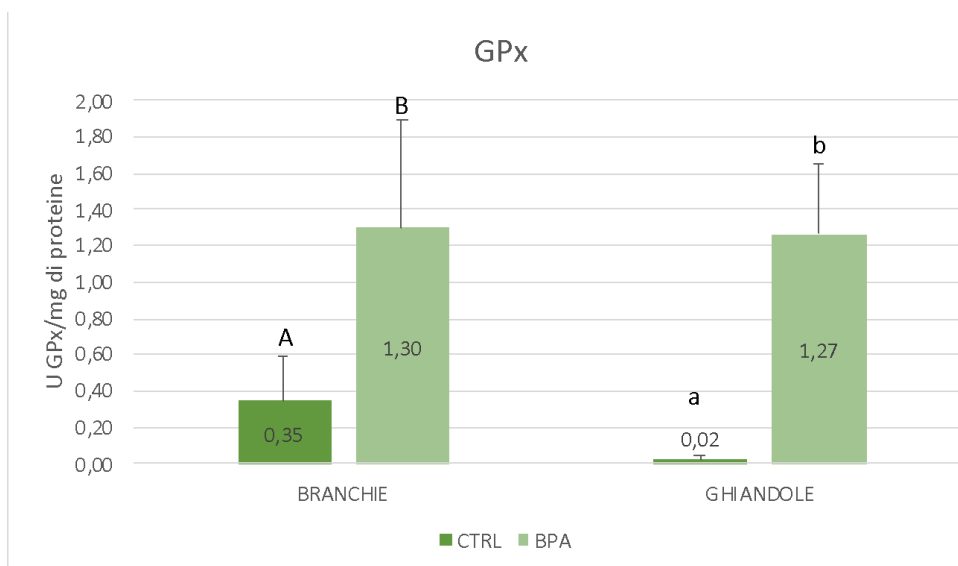


Figura 4.3: Attività delle glutazione perossidasi nei tessuti di branchie e ghiandole digestive di *A. colbecki*, confronto tra gruppo controllo e gruppo esposto a BPA. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $p < 0,05$.

5. CONCLUSIONI

È ormai ampiamente riconosciuto che il continente Antartico sta subendo gli effetti della contaminazione da inquinanti pericolosi di origine antropica. Pertanto, risulta fondamentale per la comunità scientifica implementare i programmi di monitoraggio, al fine di identificare bioindicatori ambientali che possano fungere da “sentinella” per prevenire danni all’ecosistema.

L’attività degli enzimi antiossidanti potrebbe rappresentare un buon biomarcatore per valutare gli effetti dell’inquinamento sugli organismi e in questo studio è stata utilizzata per indagare le risposte fisiologiche del mollusco antartico *Adamussium colbecki* indotte dall’esposizione a BPA.

Il BPA è considerato un interferente endocrino ambientale e numerosi ricercatori hanno scoperto che provoca anche stress ossidativo in molti tipi di cellule (**Huang et al., 2020; Sabry et al., 2022**).

L’elevata tolleranza al calore e le proprietà durevoli del BPA hanno consentito a questa sostanza di essere ampiamente utilizzata nella produzione di vari prodotti di uso quotidiano. A causa del suo uso diffuso e della sua natura ubiquitaria, è ormai confermata la vasta diffusione del BPA, tale da permettergli di raggiungere anche il continente più isolato, l’Antartide.

I risultati di questo studio indicano che il trattamento con BPA non ha prodotto effetti sull’attività delle SOD. Le ipotesi possono essere 2: 1) o il BPA non produce effettivamente tossicità oppure 2) l’attività dell’enzima è compromessa nonostante l’aumento delle ROS. Questa seconda ipotesi è supportata dallo studio di **Peng et al. (2028)** dove è stato riscontrato che il BPA diminuiva i livelli delle attività antiossidanti negli invertebrati, con un tempo di esposizione maggiore di 3 giorni. Questa ipotesi potrebbe venire confermata da eventuali successive analisi atte ad identificare la quantità delle ROS nei campioni analizzati. Se le ROS aumentano ma l’organismo non riesce a rispondere adeguatamente con il suo sistema di difesa antiossidante, si manifesta una condizione di stress ossidativo. Quest’ultimo si potrebbe verificare con studi futuri misurando alcuni indicatori del danno cellulare come la perossidazione lipidica (ossia il contenuto di malondialdeide che si forma dall’ossidazione dei fosfolipidi di membrana) oppure misurando il danno a livello delle proteine o il danno al DNA.

Lo stesso discorso può essere ipotizzato per la CAT.

Alla luce dei risultati ottenuti si può affermare invece che l’inquinante ha indotto un aumento dell’attività delle Se-GPx, sia nelle branchie che nelle ghiandole digestive degli organismi trattati. In questo caso si può pensare che il BPA abbia provocato un aumento delle ROS e in particolare un aumento del perossido di idrogeno, substrato su cui agisce questa famiglia di enzimi per contrastare lo stress ossidativo. Per avere una conferma di questi dati sarebbe necessario fare ulteriori analisi, ad esempio misurando l’espressione genetica degli enzimi antiossidanti e vedere anche quali isoforme sono maggiormente espresse. Dal momento che alcuni enzimi sono espressi nei mitocondri e altri nel citosol, si potrebbe anche capire quale reparto della cellula viene maggiormente colpito dalla tossicità indotta dal BPA.

Si può pensare dunque che le Se-GPx abbiano risposto in maniera adeguata all’aumento del perossido di idrogeno e invece che la catalasi sia stata in qualche modo danneggiata, poiché agisce sulla stessa ROS. Per avere una conferma di questa ipotesi si dovrebbe fare il rapporto tra le ROS e l’attività dell’enzima, per capire se c’è stress ossidativo e quindi per vedere se effettivamente l’enzima ha controbilanciato l’aumento di ROS. Si può inoltre affermare che il perossido di idrogeno eliminato dalle GPx non sia prodotto dall’azione della SOD, per la sua bassa attività, ma che derivi piuttosto da altre fonti.

Un'attività maggiore di SOD nelle branchie rispetto alla ghiandola digestiva è un risultato aspettato, poiché questo tessuto, deputato alla funzione respiratoria è esposto ad una quantità maggiore di O₂ rispetto alle ghiandole digestive, e probabilmente necessita di attivare maggiormente le SOD per catalizzare la dismutazione dell'anione superossido ($\cdot\text{O}_2^-$) che si forma a partire da O₂ con l'acquisizione di un elettrone. Si può inoltre presumere che le branchie del mollusco richiedano un sistema di difesa antiossidante più efficace, dal momento che l'estrazione di ossigeno dall'acqua di mare avviene sulla superficie branchiale, dove vengono filtrati grandi volumi d'acqua per garantire un adeguato apporto di ossigeno **(Regoli et al., 1997)**.

Apparentemente sembrerebbe non avere senso una maggiore attività di SOD e una minore attività di CAT nelle branchie, poiché quest'ultima agisce sul perossido di idrogeno che è prodotto dalla SOD tramite dismutazione dell'anione perossido. Bisogna tenere in considerazione però, come detto in precedenza, che ci sono altre vie di produzione di H₂O₂ e anche altre vie di detossificazione di questa ROS. Ad esempio ci sono enzimi in grado di produrre il H₂O₂, come le aminossidasi che catalizzano la reazione con acqua e ossigeno molecolare **(Viarengo, 1995)**. C'è inoltre un'altra famiglia di enzimi in grado di eliminare H₂O₂, ossia le perossiredossine che però non sono state prese in esame nel presente studio. Inoltre va tenuta in considerazione la presenza anche di tutta una serie di molecole non enzimatiche che hanno funzione di scavenger, come le metalloproteine, vitamina A, C e i carotenoidi, anch'essi parte del sistema di difesa antiossidante. La catalasi inoltre si trova soprattutto nei perossisomi, organello con attività ossidasica che produce H₂O₂, e nel quale infatti non si trova la SOD, ma la si trova in mitocondri e citosol. Non è infatti mai stato dimostrato che gli enzimi antiossidanti lavorino sempre in maniera concatenata, ossia che l'attività di uno sia strettamente correlato all'attività dell'altro.

Una maggiore attività di catalasi nelle ghiandole rispetto alle branchie potrebbe essere una condizione fisiologica del mollusco, infatti anche nel gruppo di controllo è maggiore nella ghiandola. Inoltre come già suggerito da studi precedenti **(Santovito et al., 2012)**, il fegato è anche l'organo con la maggior attività catalasica, che nei molluschi corrisponde all'epatopancreas o ghiandola digestiva, ed è l'organo principalmente deputato alla detossificazione e alla difesa dell'organismo.

Sarebbe interessante comparare le attività degli enzimi di questo mollusco antartico con quelle di altri molluschi provenienti da habitat completamente diversi, come è stato fatto nello studio di Regoli e colleghi (1997). In questo studio hanno riscontrato una maggiore attività di CAT in *Adamussium* rispetto a due molluschi Mediterranei: *Mytilus galloprovincialis* e *Pecten jacobaeus*, sia in condizioni stressanti che non stressanti. Gli studiosi hanno così rinvenuto che questi elevati livelli di CAT in *Adamussium* rappresentino un importante adattamento alle condizioni ambientali in cui vive il mollusco antartico, caratterizzate soprattutto dall'elevata solubilità dell'ossigeno nell'acqua fredda del mare.

L'azione dei diversi enzimi può essere tessuto-specifica, ossia alcuni enzimi espletano la loro azione in un organo piuttosto che in un altro. Inoltre dobbiamo considerare che le attività enzimatiche sono influenzate sicuramente dalle variazioni di ossigeno disciolto in acqua, ma anche da fattori stagionali legati allo stato fisiologico degli animali. Questi fattori includono il periodo riproduttivo e l'assunzione di cibo. In particolare, la disponibilità di cibo induce consumo di ossigeno e generazione di ossiradicali nelle cellule, che sono compensati da un aumento dell'induzione di enzimi antiossidanti **(Viarengo et al., 1991)**.

I risultati emersi in questo studio preliminare sull'attività degli enzimi antiossidanti di *Adamussium colbecki* in seguito ad esposizione a BPA, hanno fatto emergere risposte interessanti e diverse tra i due organi analizzati e tra i diversi enzimi considerati, evidenziando la necessità di compiere ulteriori indagini. Le risposte antiossidanti di *Adamussium colbecki* potrebbero rappresentare un utile strumento per valutare l'impatto biologico degli inquinanti negli ecosistemi antartici e studi più approfonditi sono necessari per prevenire l'impatto delle attività umane anche in questo continente.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aebi H.** "[13] Catalasi in vitro." *Metodi in Enzimologia*, vol. 105, Stampa accademica, 1984, pp. 121–26.
- Baralla E., V. Pasciu, M.V. Varoni, M. Nieddu, R. Demuro, e M. P. Demontis. 2021.** «Bisphenols' Occurrence in Bivalves as Sentinel of Environmental Contamination». *Science of The Total Environment* 785 (settembre): 147263.
- Bargagli R. 2008.** «Environmental Contamination in Antarctic Ecosystems». *Science of The Total Environment* 400 (1–3): 212–26.
- Brigelius-Flohé R. e M. Maiorino. 2013.** «Glutathione Peroxidases». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (5): 3289–3303.
- Chiantore M., R. Cattaneo-Vietti, P. Povero e G. Albertelli. 2000.** «The Population Structure and Ecology of the Antarctic Scallop *Adamussium colbecki* in Terra Nova Bay». In *Ross Sea Ecology*, a cura di Francesco Maria Faranda, Letterio Guglielmo, e Adrianna Ianora, 563–73. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Chiantore M., R. Cattaneo-Vietti, P.A. Berkman, M. Nigro, M. Vacchi, S. Schiaparelli e G. Albertelli. 2001.** «Antarctic Scallop (*Adamussium colbecki*) Spatial Population Variability along the Victoria Land Coast, Antarctica». *Polar Biology* 24 (2): 139–43.
- Chiantore M., R. Cattaneo-Vietti, Laura E., M. Guidetti e M. Antonini. 2002.** «Reproduction and Condition of the Scallop *Adamussium colbecki* (Smith 1902), the Sea-Urchin *Stereochinus neumayeri* (Meissner 1900) and the Sea-Star *Odontaster validus* Koehler 1911 at Terra Nova Bay (Ross Sea): Different Strategies Related to Inter-Annual Variations in Food Availability». *Polar Biology* 25 (4): 251–55.
- Convey P., e L.S. Peck. 2019.** «Antarctic Environmental Change and Biological Responses». *Science Advances* 5 (11): eaaz0888.
- Dell'Acqua O., M. Trębala, M. Chiantore e S.-P. Hannula. 2019.** «Robustness of *Adamussium colbecki* Shell to Ocean Acidification in a Short-Term Exposure». *Marine Environmental Research* 149 (agosto): 90–99.
- Esteban, S., L. Moreno-Merino, R. Matellanes, M. Catalá, M. Gorga, M. Petrovic, M. López De Alda, et al. 2016.** «Presence of Endocrine Disruptors in Freshwater in the Northern Antarctic Peninsula Region». *Environmental Research* 147 (maggio): 179–92.

- Fransen M., M. Nordgren, Bo Wang e Oksana Apanasets. 2012.** «Role of Peroxisomes in ROS/RNS-Metabolism: Implications for Human Disease». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822 (9): 1363–73.
- Fu Pingqing e Kimitaka Kawamura. 2010.** «Ubiquity of Bisphenol A in the Atmosphere». *Environmental Pollution* 158 (10): 3138–43.
- H. Mingquan, S. Liu, L. Fu, X. Jiang e M. Yang. 2020.** «Bisphenol A and Its Analogues Bisphenol S, Bisphenol F and Bisphenol AF Induce Oxidative Stress and Biomacromolecular Damage in Human Granulosa KGN Cells». *Chemosphere* 253 (agosto): 126-707.
- Hughes K.A. e S. M. Grant. 2017.** «The Spatial Distribution of Antarctica’s Protected Areas: A Product of Pragmatism, Geopolitics or Conservation Need?». *Environmental Science & Policy* 72 (giugno): 41–51.
- Livingstone, D. R., F. Lips, P. Garcia Martinez e R. K. Pipe. 1992.** «Antioxidant Enzymes in the Digestive Gland of the Common Mussel *Mytilus edulis*». *Marine Biology* 112 (2): 265–76.
- Livingstone D.R. 2001.** «Contaminant-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms». *Marine Pollution Bulletin* 42 (8): 656–66.
- Livingstone D.R. 1991.** Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Vol. 7, ed. R. Gilles, pp. 45±185. Springer, Berlin.
- Lowry O. H., NiraJ. Rosebrough, A. Lewis Farr e Rose J. Randall. 1951.** «Protein measurement with the folin phenol reagent». *Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–75.
- Lushchak V.I. e Tetyana V. Bagnyukova. 2006.** «Effects of Different Environmental Oxygen Levels on Free Radical Processes in Fish». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 144 (3): 283–89.
- Mao Lanqun, Yang T. e Takeo Ohsaka. 2008.** «CHAPTER 6 - Superoxide electrochemical sensors and biosensors: principles, development and applications». In *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*, a cura di Xueji Zhang, Huangxian Ju, e Joseph Wang, 145–85. San Diego: Academic Press.
- Margis R., Christophe D., F. K. Teixeira e M. Margis-Pinheiro. 2008.** «Glutathione Peroxidase Family - an Evolutionary Overview: Evolutionary Overview of Glutathione Peroxidases». *FEBS Journal* 275 (15): 3959–70.
- Moro G., F. Buonocore, M. Barucca, F. Spazzali, A. Canapa, A. Pallavicini, G. Scapigliati e M. Gerdol. 2019.** «The First Transcriptomic Resource for the Antarctic Scallop *Adamussium colbecki*». *Marine Genomics* 44 (aprile): 61–64.

- Nandi A., L.-J. Yan, C. K. Jana e N. Das. 2019.** «Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 (novembre): 1–19.
- Regoli F., M. Nigro, E. Bertoli, G. Principato e E. Orlando. 1997.** «Defenses against Oxidative Stress in the Antarctic Scallop *Adamussium colbecki* and Effects of Acute Exposure to Metals». In *Interactions and Adaptation Strategies of Marine Organisms*, a cura di A. D. Naumov, H. Hummel, A. A. Sukhotin, e J. S. Ryland, 139–44. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Regoli, F., G. B. Principato, E. Bertoli, M. Nigro e E. Orlando. 1997.** «Biochemical Characterization of the Antioxidant System in the Scallop *Adamussium colbecki*, a Sentinel Organism for Monitoring the Antarctic Environment». *Polar Biology* 17 (3): 251–58.
- Sabry, R., M. Nguyen, S. Younes e L.A. Favetta. 2022.** «BPA and Its Analogs Increase Oxidative Stress Levels in in Vitro Cultured Granulosa Cells by Altering Anti-Oxidant Enzymes Expression». *Molecular and Cellular Endocrinology* 545 (aprile): 111574.
- Santovito G., E. Piccinni, A. Cassini, P. Irato e V. Albergoni. 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): 321–29.
- Santovito G., Piccinni E., Boldrin F. e Iato P. (2012).** “Comparative study on metal homeostasis and detoxification in two Antarctic teleosts”. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 155: 580-586.
- Shankar, K., e H.M. Mehendale. 2014.** «Oxidative Stress». In *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, a cura di Philip Wexler, 735–37. Oxford: Academic Press.
- Siraki A.G., L-O Klotz, e J.P. Kehrler. 2018.** «1.14 - Free Radicals and Reactive Oxygen Species☆». In *Comprehensive Toxicology (Third Edition)*, a cura di Charlene A. McQueen, 262–94. Oxford: Elsevier.
- Stockton W. L. 1984.** «The Biology and Ecology of the Epifaunal Scallop *Adamussium colbecki* on the West Side of McMurdo Sound, Antarctica». *Marine Biology* 78 (2): 171–78.
- Thoene M., L. Rytel, N. Nowicka e J. Wojtkiewicz. 2018.** «The State of Bisphenol Research in the Lesser Developed Countries of the EU: A Mini-Review». *Toxicology Research* 7 (3): 371–80.
- Valko M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T.D. Cronin, Milan M. e J. Telser. 2007.** «Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44–84.

- Vasiljevic T. e T. Harner. 2021.** «Bisphenol A and Its Analogues in Outdoor and Indoor Air: Properties, Sources and Global Levels». *Science of The Total Environment* 789 (ottobre): 148013.
- Viarengo A., L. Canesi, P. Garcia Martinez, L.D. Peters e D.R. Livingstone†. 1995.** «Pro-Oxidant Processes and Antioxidant Defence Systems in the Tissues of the Antarctic Scallop (*Adamussium colbecki*) Compared with the Mediterranean Scallop (*Pecten jacobaeus*)». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 111 (1): 119–26.
- Viarengo A., L. Canesi, M. Pertica e D.R. Livingstone. 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): 187–90.
- Zelko I.N., T. J Mariani e R. J. Folz. 2002.** «Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression». *Free Radical Biology and Medicine* 33 (3): 337–49.

7. SITOGRAFIA

- European Food Safety Authority, EFSA sito ufficiale dell'UE <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/bisphenol> ; accesso in rete 19/08/2023.
- Istituto Superiore di Sanità <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/b/bisfenolo-a#rischi-per-la-salute> ; accesso in rete 04/09/2023.
- Programma Nazionale di Ricerca in Antartide, PNRA (2019) <https://www.pnra.aq/> ; accesso in rete 01/09/2023.