

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

---

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA  
XIX Ciclo  
BIO/10

Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi"  
Sezione di Biochimica Veterinaria

***Organismi acquatici e ambiente:  
meccanismi biochimici di interazione,  
risposta e adattamento***

Tesi di dottorato della  
Dott.ssa Patrizia Bandiera

Coordinatore  
Chiar.mo Prof. Giorgio Lenaz

Relatore:  
Chiar.ma Prof.ssa Anna Rosa Borgatti

Correlatori:  
Dott.ssa Alessandra Pagliarani  
Dott.ssa Fabiana Trombetti  
Dott.ssa Vittoria Ventrella

---

Anno Accademico 2006-2007

# INDICE

Abstract .....	1
----------------	---

## PARTE INTRODUTTIVA

Premessa alla parte introduttiva.....	5
---------------------------------------	---

### 1. I Molluschi Bivalvi

1.1 Caratteristiche generali e impiego come indicatori ambientali.....	7
1.2 Molluschi bivalvi utilizzati: <i>Tapes philippinarum</i> e <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	12

### 2. Meccanismi biochimici cellulari di interazione con l'ambiente

2.1 Regolazione ionica e attività ATPasiche Na-dipendenti.....	15
2.1a Na,K-ATPasi.....	20
2.1b Na-ATPasi.....	27
2.2 Fosforilazione ossidativa mitocondriale.....	32
2.2a ATP sintasi/ATPasi.....	38

### 3. Inquinanti ambientali

3.1 Azoto ammoniacale .....	43
3.1a Caratteristiche chimico-fisiche .....	43
3.1b Esposizione e accumulo .....	44
3.1c Tossicità .....	47
3.2 Composti organostannici .....	52
3.2a Caratteristiche chimico-fisiche .....	52
3.2b Applicazioni e esposizione .....	54
3.2c Tossicità .....	60

## PARTE SPERIMENTALE

Premessa alla parte sperimentale .....	67
--	----

### 1. Materiali e metodi

1.1 Disegno sperimentale .....	69
--------------------------------	----

1.2	Sperimentazione <i>in vitro</i> .....	70
1.2a	Interazione delle ATPasi Na-dipendenti con $\text{NH}_4^+$ .....	70
1.2b	Risposta delle attività enzimatiche ai composti organostannici .....	71
1.3	Sperimentazione in ambiente controllato .....	73
1.3a	Modalità di conduzione della prova di esposizione al TBT, animali e campionamenti .....	73
1.3b	Analisi dell'acqua .....	75
1.3c	Analisi sui molluschi .....	78
1.3c1	Mortalità .....	78
1.3c2	Indice di condizione .....	78
1.3c3	Contenuto d'acqua .....	79
1.4	Preparazione delle frazioni mitocondriali e microsomiali .....	79
1.5	Determinazione del contenuto di proteina .....	81
1.6	Valutazione delle attività ATPasiche .....	81
1.6a	Attività ATPasiche Na-dipendenti .....	81
1.6a1	Determinazione delle attività enzimatiche .....	81
1.6a2	Prove <i>in vitro</i> di interazione con $\text{NH}_4^+$ .....	83
	Sostituibilità dei cationi attivanti .....	83
	Sensibilità all'ouabaina .....	83
1.6a3	Prove <i>in vitro</i> di interazione con composti organostannici .....	83
	Interazione con i composti organostannici .....	83
	Ditioli e inibizione enzimatica da TBT .....	84
1.6b	Attività ATPasica mitocondriale Mg-dipendente .....	84
1.6b1	Caratterizzazione dell'attività ATPasica .....	84
1.6b2	Determinazione dell'attività enzimatica .....	84
1.6b3	Prove <i>in vitro</i> di interazione con il TBT .....	85
	Interazione con il TBT .....	85
	Ditioli e inibizione enzimatica da TBT .....	85
1.6c	Principio del metodo colorimetrico adottato .....	86
1.7	Statistica .....	86
<b>2.</b>	<b>Risultati</b>	
2.1	Sperimentazione <i>in vitro</i> .....	89
2.1a	Interazione delle ATPasi Na-dipendenti con $\text{NH}_4^+$ .....	89
2.1a1	Sostituibilità dei cationi attivanti .....	89
2.1a2	Sensibilità all'ouabaina .....	92

2.1b	Risposta delle attività enzimatiche ai composti organostannici .....	95
2.1b1	Attività ATPasiche Na-dipendenti .....	95
	Interazione con composti organostannici .....	95
	Ditioli e inibizione enzimatica da TBT .....	100
2.1b2	Attività ATPasica mitocondriale Mg-dipendente .....	103
	Caratterizzazione dell'attività enzimatica .....	103
	Interazione con il TBT .....	111
	Ditioli e inibizione enzimatica da TBT .....	116
2.2	Sperimentazione in ambiente controllato .....	119
2.2a	Analisi sui Molluschi .....	119
	Mortalità .....	119
	Peso, indice di condizione e contenuto d'acqua .....	119
	Risposta delle attività ATPasiche .....	120
<b>3.</b>	<b>Discussione</b>	
	Interazione delle ATPasi Na-dipendenti con $\text{NH}_4^+$ .....	123
	Risposta delle attività enzimatiche ai composti organostannici .....	125
<b>4.</b>	<b>Conclusioni</b> .....	133
<b>5.</b>	<b>Bibliografia</b> .....	139

## Abstract

The research is focused on the relationship between some  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase activities of plasma- and mitochondrial membranes from tissues of cultured marine bivalve molluscs and potentially stressful environmental conditions, such as the exposure to contaminants both of natural origin (ammonia nitrogen, the main contaminant of aquaculture plants) and of anthropic source (alkyltins).

The two filter-feeding bivalve species selected colonize different habitats: the common mussel *Mytilus galloprovincialis* binds to hard substrates and the Philippine clam *Tapes philippinarum* burrows into sea bottom sandy beds. The choice of typical species of coastal waters, extremely suitable for environmental studies due to their features of poor motility, resistance to transport and great filtering efficiency, may constitute a model to evaluate responses to contaminants of membrane-bound enzyme activities involved in key biochemical mechanisms, namely cell ionic regulation and mitochondrial energy production.

*In vitro* and *in vivo* approaches have been pursued. *In vitro* assays were carried out by adding the contaminants ( $NH_4Cl$  and alkyltins) directly to the ATPase reaction media. *In vivo* experiments were carried out by exposing mussels to various tributyl tin (TBT) concentrations under controlled conditions in aquaria. ATPase activities were determined spectrophotometrically according to the principles of the method of Fiske and Subbarow (1925). The main results obtained are detailed below.

In *Tapes philippinarum* the interaction of  $NH_4^+$ , the main form of ammonia nitrogen at physiological and seawater pHs, with the Na,K-ATPase and the ouabain-insensitive Na-ATPase was investigated *in vitro* on gill and mantle microsomal membranes. The proven replacement by  $NH_4^+$  of  $K^+$  in the activation of the Na,K-ATPase and of  $Na^+$  in the activation of the ouabain-insensitive ATPase displayed similar enzyme affinity for the substituted cation. on the one hand this finding may represent one of the possible mechanisms of ammonia toxicity and, on the other, it supports the hypothesis that  $NH_4^+$  can be transported across the plasma membrane through the two ATPases. In this case both microsomal ATPases may be involved and co-operate, at least under peculiar circumstances, to nitrogen excretion and ammonia detoxification mechanisms in bivalve molluscs. The two ATPase activities stimulated by  $NH_4^+$  maintained their typical response to the glycoside ouabain, specific inhibitor of the Na,K-ATPase, being the  $Na^+$ +  $NH_4^+$ -activated ATPase even more susceptible to the inhibitor and the ouabain-insensitive ATPase activity activated indifferently by  $Na^+$  or  $NH_4^+$  unaffected by up to  $10^{-2}$  M ouabain.

*In vitro* assays were carried out to evaluate the response of the two Na-dependent ATPases to organotins in clams and mussels and to investigate the interaction of TBT with mussel mitochondrial oligomycin-sensitive Mg-ATPase. Since no literature data were available, the optimal assay conditions and oligomycin sensitivity of mussel mitochondrial MgATPase were determined. In *T. philippinarum* the ouabain-insensitive Na-ATPase was found to be refractory to TBT both in the gills and in the mantle, whereas the Na,K-ATPase was progressively inhibited by increasing TBT doses; the enzyme inhibition was more pronounced in the gills than in the mantle. In both tissues of *M. galloprovincialis* the Na,K-ATPase inhibition by alkyltins decreased in the order TBT>DBT(dibutyltin)>>MBT(monobutyltin)=TeET(tetraethyltin) (no effect). Mussel Na-ATPase confirmed its refractoriness to TBT and derivatives both in the gills and in the mantle. These results indicate that the Na,K-ATPase inhibition decreases as the number of alkyl chains bound to tin decreases; however a certain polarity of the organotin molecule is required to yield Na,K-ATPase inhibition, since no enzyme inhibition occurred in the presence of tetraalkyl-substituted derivatives such as TeET. Assays carried out in the presence of the dithioerythritol (DTE) pointed out that the sulphhydrylic agent is capable to prevent the Na,K-ATPase inhibition by TBT, thus suggesting that the inhibitor may link to -SH groups of the enzyme complex. Finally, the different effect of alkyltins on the two Na-dependent ATPases may constitute a further tool to differentiate between the two enzyme activities. These results add to the wealth of literature data describing different responses of the two enzyme activities to endogenous and exogenous modulators.

Mussel mitochondrial Mg-ATPase was also found to be *in vitro* inhibited by TBT both in the gills and in the mantle: the enzyme inhibition followed non competitive kinetics. The failed effect of DTE pointed out that in this case the interaction of TBT with the enzyme complex is probably different from that with the Na,K-ATPase. The results are consistent with literature data showing that alkyltin may interact with enzyme structures with different mechanisms.

Mussel exposure to different TBT sublethal doses in aquaria was carried out for 120 hours. Two samplings (after 24 and 120 hrs) were performed in order to evaluate a short-term response of gill and mantle Na,K-ATPase, ouabain-insensitive Na-ATPase and Mg-ATPase activities. The *in vivo* response to the contaminants of the enzyme activities under study was shown to be partially different from that pointed out in the *in vitro* assays. Mitochondrial Mg-ATPase activity appeared to be activated in TBT-exposed mussels with respect to control ones, thus confirming the complexity of

evaluating *in vivo* responses of the enzyme activities to contaminants, due to possible interactions of toxicants with molluscan metabolism.

Concluding, the whole of data point out that microsomal and mitochondrial ATPase activities of bivalve molluscs are generally responsive to environmental contaminants and suggest that in some cases membrane-bound enzyme activities may represent the molecular target of their toxicity. Since the Na,K-ATPase, the Na-ATPase and the Mg-ATPase activities are poorly studied in marine bivalves, this research may contribute to enlarge knowledge in this quite unexplored field.

*Keywords:* Organotins, ammonia nitrogen, membrane-bound ATPases, mollusc

## Premessa alla parte introduttiva

Nell'ambito di uno studio sulle interazioni tra organismi acquatici e ambiente, l'ambiente marino costituisce un mondo particolarmente attraente e variegato per la complessità di problematiche biologiche e biochimiche emergenti, la varietà di habitat e di specie animali. La scelta di alcune specie di molluschi bivalvi come "materiale biologico" su cui valutare le modificazioni di parametri biochimici indotte da contaminanti ambientali in concentrazioni subletali, e in particolare le interazioni delle specie chimiche oggetto di studio con attività ATPasiche di membrana, è stata suggerita dalle loro caratteristiche biologiche che li rendono particolarmente adatti e quindi ampiamente utilizzati per studi ecotossicologici. Vongole (*Tapes philippinarum*) e mitili (*Mytilus galloprovincialis*), comunemente allevati nell'Adriatico settentrionale, sono infatti grandi filtratori e accumulatori di contaminanti, poco mobili e quindi in grado di riflettere le condizioni dell'ambiente che li circonda; sono altresì facilmente reperibili, resistenti al trasporto, alla stabulazione in acquari e all'esposizione a contaminanti. Le attività enzimatiche di membrana possono risentire dell'effetto di contaminanti ambientali attraverso vari meccanismi. E' ampiamente noto infatti che l'incorporazione dei contaminanti nelle membrane biologiche, processo diversamente possibile a seconda della lipofilità della specie chimica interessata, può modulare le attività enzimatiche di membrana, tramite modificazioni conformazionali indotte da variazioni dello stato fisico di membrana. A questo meccanismo si possono aggiungere interazioni dirette dei contaminanti con le strutture enzimatiche, comprendendo nel termine interazioni un'ampia varietà di legami possibili, a seconda della natura chimica del contaminante e della struttura enzimatica interessata.

Nella presente ricerca è stato affrontato lo studio delle interazioni dello ione ammonio, la forma prevalente a pH fisiologici e nell'acqua di mare dell'azoto ammoniacale, che rappresenta il contaminante principale in acquacoltura, con le due ATPasi Na-dipendenti presenti nella membrana plasmatica, sfruttando il fatto che in questi molluschi la classica Na,K-ATPasi è affiancata da una Na-ATPasi insensibile all'ouabaina che mostra attività enzimatica simile o addirittura superiore, nel mitilo, alla prima. Questa caratteristica delle specie prescelte consente di effettuare un confronto dell'effetto di contaminanti "in parallelo" per le due ATPasi e quindi di evidenziare eventuali differenze di risposta all'azione di questi composti, che tra l'altro possono aggiungere un ulteriore tassello alla definizione dei ruoli di queste attività enzimatiche negli animali acquatici, aspetto ancora scarsamente studiato, e alla distinzione funzionale delle due attività ATPasiche.

Oltre all'ammonio, contaminante che possiamo definire "naturale" in quanto prodotto, tra l'altro, dall'escrezione azotata della stragrande maggioranza degli animali acquatici, sono stati presi in considerazione alcuni composti organostannici, i contaminanti più pericolosi immessi deliberatamente dall'uomo nell'ambiente. Dalla seconda metà del secolo scorso in avanti i composti organici dello stagno, in particolare stagno tributile (TBT) e derivati, hanno trovato molteplici applicazioni. Tra queste, soprattutto il loro largo impiego come biocidi ha portato alla contaminazione dell'ambiente a livello globale. Nel considerare gli effetti di TBT e derivati sulle ATPasi Na-dipendenti e sulla Mg-ATPasi mitocondriale, riportata in letteratura come bersaglio del TBT, si è inteso contribuire a chiarire alcuni dei possibili meccanismi attraverso cui si esplica l'azione tossica di questo contaminante.

In sintesi, la ricerca svolta nei tre anni di dottorato, può essere vista nel suo complesso come un tentativo di contribuire a chiarire, tramite un approccio biochimico, alcuni meccanismi dell'azione tossica di contaminanti dell'ambiente marino a livello cellulare, in specie che, non solo possono rappresentare un sistema modello, ma sono di pregio alimentare e costituiscono i primi anelli della catena trofica. Ciò implica che effetti negativi di contaminanti in queste specie possono ripercuotersi lungo la catena trofica. Inoltre le problematiche affrontate sono ancora scarsamente studiate, almeno per quanto riguarda le ATPasi di membrana, e quindi l'approccio utilizzato potrebbe contribuire ad ampliare le conoscenze su alcuni meccanismi biochimici nei molluschi bivalvi

# **1. I Molluschi Bivalvi**

## **1.1 Caratteristiche generali e impiego come indicatori ambientali**

Il phylum dei Molluschi è un gruppo vasto ed eterogeneo, costituito da migliaia di specie molto diverse le une dalle altre, presenti in abbondanza in diversi habitat, soprattutto marini. I Molluschi hanno un forte impatto sull'ambiente in cui vivono, rappresentano infatti un importante anello delle catene alimentari rivestendo, a seconda della specie, diversi ruoli dagli erbivori ai predatori. Delle diverse classi che appartengono al phylum dei Molluschi, quella dei Bivalvi, o Lamellibranchi, riveste particolare interesse per studi di interazione organismo-ambiente acquatico in quanto comprende prevalentemente specie marine bentoniche o comunque generalmente sedentarie.

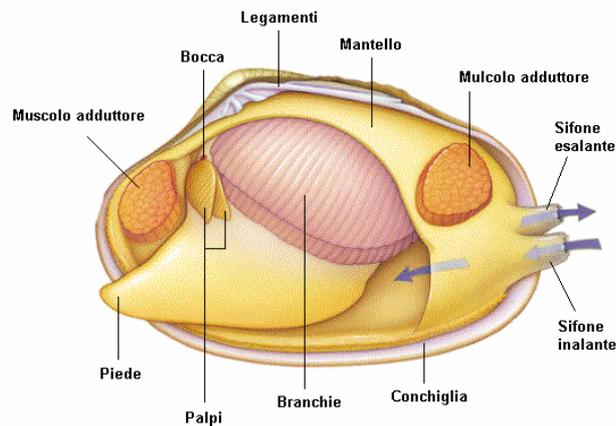
Buona parte delle specie vive in prossimità delle coste marine, anche se non mancano le specie d'acqua dolce e abissali che si spingono fino ai 5000 m di profondità. Molte specie sono adattate ad infossarsi più o meno profondamente nel substrato soffice (sabbioso o fangoso), o si sono adattate a scavare in substrati duri nascondendosi così dai predatori ed utilizzando come alimento i detriti del fondo o particelle sospese nell'acqua, altre specie invece vivono sulla superficie del substrato, ancorandosi ad esso (Baccetti 1994).

I Bivalvi sono caratterizzati dalla costante presenza di una conchiglia composta da due valve, da cui il nome; la conchiglia contiene il corpo compresso lateralmente, privo di capo e ricoperto ai lati dai due lembi del mantello che scendono dal dorso (Baccetti 1994). Le due valve si articolano tra loro in una zona detta cerniera, fiancheggiata da ciascun lato dall'umbone, area rilevata che costituisce la parte più vecchia di ciascuna valva. Sul margine dorsale si inserisce un legamento elastico, che tiene unite le valve laddove si articolano e, soprattutto, le mantiene divaricate. Le valve sono collegate dai muscoli adduttori, che, attraversando il corpo da una parte all'altra si inseriscono sulle parti anteriore e posteriore della loro porzione medio-dorsale. Essi agiscono in antagonismo con il legamento elastico e, contraendosi, determinano lo schiacciamento o lo stiramento del legamento e la chiusura delle valve. Tale posizione è normalmente mantenuta se l'animale è esposto temporaneamente all'aria, come avviene periodicamente nelle specie intertidali, o si trova in presenza di condizioni ambientali avverse da cui si difende isolandosi temporaneamente. La sopravvivenza in queste condizioni è possibile per periodi più o meno lunghi a seconda della specie, grazie alla loro capacità di effettuare un particolare metabolismo anaerobico. Mentre la chiusura

delle valve è attiva, dovuta alla contrazione dei muscoli adduttori, l'apertura della conchiglia è determinata passivamente dal legamento elastico, per cui dopo la morte gli animali rimangono generalmente con le valve aperte.

La presenza e lo sviluppo dei muscoli adduttori, valutabili anche dall'impronta sulla faccia interna della conchiglia, assume valore sistematico, come la disposizione ed il numero dei dentelli della cerniera (Cesari e Pellizzato 1990).

Il mantello è una duplicatura cutanea, più o meno estesa tra il sacco dei visceri ed il piede, che delimita la cavità palleale e produce all'esterno la conchiglia. I due lembi del mantello possono essere liberi o saldati tra loro in più punti lasciando tre aperture, una mediana dalla quale sporge il piede, e due posteriori per l'entrata e l'uscita dell'acqua (Figura 1.1a). Attorno alle due aperture posteriori il mantello può estendersi in due tubi detti sifone inalante ed esalante, che permettono il passaggio dell'acqua anche quando i lobi del mantello sono saldati per gran parte della loro estensione.



**Figura 1.1a:** Schema dell'anatomia di un Bivalve  
(Modificato da: <http://trc.ucdavis.edu/biosci10v/bis10v/week9/clam.gif>)

Il piede è un organo muscoloso che raggiunge il suo massimo sviluppo nei bivalvi escavatori; in altre specie è invece ridotto fino a mancare del tutto (Cesari e Pellizzato 1990). In svariati generi (ad esempio *Mytilus*), sulla linea medioventrale del piede si apre la ghiandola del bisso, la quale produce i filamenti del bisso, utilizzati dall'animale per ancorarsi a substrati solidi.

I Molluschi Bivalvi si nutrono di particelle in sospensione (sospensivori) o sul fondale (detritivori); tale alimento è costituito da fitoplancton e da microrganismi animali vivi o morti. Per utilizzare questo tipo di cibo i Bivalvi filtrano grandi volumi d'acqua che penetra all'interno della cavità palleale tramite il sifone inalante, passa attraverso le branchie, e viene espulsa all'esterno tramite il sifone esalante. In

condizioni normali un mitilo di media dimensione, filtra all'incirca da 4 a 5 litri di acqua all'ora, ed è in grado di trattenere il 90% delle particelle contenute in essa, che rientrano nella gamma delle dimensioni filtrabili (2-5 micron) (Mengoli 1998). La grande capacità di filtrazione di fatto li mette a contatto con un'enorme quantità d'acqua nell'unità di tempo e consente loro di concentrare e accumulare nei tessuti sostanze disciolte nell'acqua e quindi anche contaminanti eventualmente presenti; questa caratteristica rende i Bivalvi idonei per lo studio della presenza e dell'effetto di inquinanti ambientali.

Nei Lamellibranchi le branchie sono fortemente sviluppate a forma di lamella, e il muco che le ricopre trattiene le particelle presenti nell'acqua per cui in queste specie le branchie assumono un ruolo anche nella nutrizione. L'epitelio branchiale è provvisto di ciglia vibratili che, oltre a provocare correnti che permettono l'aspirazione dell'acqua attraverso il sifone inalante, convogliano le particelle nutritive nel solco alimentare, nel quale il cibo trattenuto viene inviato verso i palpi labiali e da qui alla bocca. L'azione selettiva delle ciglia dei palpi permette alle particelle dotate di potere nutritivo di passare alla bocca, mentre le particelle inorganiche (sabbia e detriti) vengono avviate verso il sifone esalante. Il volume d'acqua che attraversa la cavità pallale è utilizzata pure per la respirazione, anche se gli scambi di ossigeno e di anidride carbonica avvengono prevalentemente attraverso il mantello (Cesari e Pellizzato 1990).

Essendo buona parte dei Molluschi Bivalvi marini (vongole, mitili, ostriche) tradizionalmente utilizzati nell'alimentazione umana, alcuni aspetti morfologici e fisiologici sono stati studiati da lungo tempo. L'apparato escretore è stato descritto con sorprendente precisione fin dal secolo scorso e tuttora le conoscenze sulla fisiologia renale dei Molluschi Bivalvi non sono molto più avanzate di quelle di allora, anche per la difficoltà oggettiva di ottenere a vari intervalli di tempo, campioni di sangue e urina da animali sottoposti a iniezioni di soluzioni test per la funzionalità renale o esposti a soluzioni saline in condizioni controllate. Gli organi escretori sono costituiti da due nefridi foggiate a U di tipo metanefridiale (organo di Bojanus) e dalle ghiandole pericardiche (ghiandola di Keber) poste a lato del cuore, situate all'esterno o all'interno del pericardio a seconda della specie, e che in questo si aprono (Baccetti 1994). La formazione dell'urina consiste nella filtrazione del sangue da parte del cuore e delle ghiandole pericardiche. Il sale viene riassorbito quando l'urina passa attraverso i nefridi; l'urina quindi finisce nella cavità del mantello da cui fuoriesce (Martin 1983). Alle ghiandole pericardiche, oltre che una funzione di filtrazione, è pure attribuita funzione escrettrice per esocitosi (Morton 1992); tali ghiandole espellono i cataboliti azotati nel liquido pericardico, dove vengono fagocitati da amebociti (Mengoli 1998).

Come la maggior parte degli animali marini, i Molluschi Bivalvi sono essenzialmente ammoniotelici, ma oltre all'ammoniaca eliminano piccole quantità di ossido di trimetilammina, acido urico, urea e amminoacidi, in percentuali diverse a seconda della specie (Tabella 1.1a).

	NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Urea	Amminoacidi	Acido urico	Altro
<i>Donax variabilis</i>	74	0	24	0,8	1,2
<i>Mercenaria mercenaria</i>	66	0	29	3,8	1,2
<i>Crassostrea virginica</i>	68	7,7	20	3,0	1,3

**Tabella 1.1a** : Percentuale di cataboliti azotati escreti da diverse specie di Molluschi Bivalvi marini (Modificato da: Le Gal 1988)

La valutazione delle condizioni ambientali, per quanto riguarda la presenza di sostanze contaminanti, si può effettuare mediante svariate procedure, tra cui l'utilizzo di organismi che fungano da bioindicatori e sui quali nel tempo vengano valutati parametri biologici e biochimici (biomonitoraggio) (Focardi e Leonzio 2000).

Grazie alla loro capacità di accumulo di quantità misurabili di xenobiotici, i Molluschi Bivalvi comprendono specie spesso scelte come segnalatori ambientali (organismi indicatori o sentinella). Come già detto, questi animali sono filtratori e quindi pompano grandi volumi d'acqua concentrando molti elementi chimici nei loro tessuti; tali sostanze possono poi, in alcuni casi, venire propagate e amplificate attraverso la catena alimentare. Considerando poi che, in confronto a pesci e crostacei, i Bivalvi hanno un livello molto basso di attività dei sistemi enzimatici capaci di metabolizzare i contaminanti organici, le concentrazioni di tali inquinanti nei loro tessuti riproducono l'entità della contaminazione ambientale (Widdows e Donkin 1992).

I contaminanti possono indurre negli animali modificazioni misurabili nei normali processi molecolari o biochimici (alterazioni del DNA, modificazioni metaboliche ed enzimatiche); in queste specie, cosiddette sensibili, vengono individuati i biomarcatori (biomarkers) (Focardi e Leonzio 2000), che possono essere di esposizione, se consentono di individuare l'avvenuto contatto tra la molecola e il recettore biologico, o di effetto, quando segnalano l'effetto tossicologico dovuto alla presenza di uno o più inquinanti.

Nell'ambiente marino costiero, che per le sue caratteristiche è maggiormente suscettibile a variazioni di parametri ambientali e quindi anche ad alterazioni delle concentrazioni di nutrienti e contaminanti, i Bivalvi, qui ampiamente diffusi, sono stati spesso utilizzati in programmi di monitoraggio. Nelle aree ad elevato degrado ambientale, o comunque dove sia impossibile reperire organismi atti allo scopo, vengono utilizzate specie di facile reperibilità per le quali sono disponibili procedure standard di coltivazione ed esposizione (Marín et al. 2001). Ciò è possibile grazie alla loro facile trasportabilità, dovuta alla capacità di sopravvivere per periodi anche abbastanza prolungati (ore o giorni, a seconda della specie) fuori dall'acqua in condizioni di anaerobiosi. La valutazione della diffusione e dell'effetto di inquinanti derivanti da sorgenti puntiformi, o comunque in zone ristrette, pone la necessità di adottare specie a bassa motilità; ancora una volta i Molluschi Bivalvi, sessili o comunque sedentari, si prestano efficacemente a tale scopo. La loro caratteristica di essere sufficientemente longevi e di costituire popolazioni stabili e numerose consente di effettuare campionamenti successivi di ampi periodi di tempo (mesi o anni) tali da permettere la valutazione di effetti cronici. Il segnale manifestato dall'animale è generalmente precoce (ore o giorni) nel caso di risposte molecolari e ritardato (settimane, mesi o anni) per risposte cellulari e fisiologiche (Fossi 2000).

Occorre tener presente, tuttavia, che spesso, negli animali marini, esistono "fattori di disturbo" quali lo stato ormonale, l'età e il sesso dell'organismo che, sovrapponendosi, possono alterare le risposte (Fossi 2000). È pertanto necessaria una buona conoscenza del ciclo riproduttivo, dei fattori che lo regolano e delle caratteristiche biochimico-fisiologiche dell'animale, di cui occorre tener conto nell'interpretazione dei risultati. Il fatto che alcune specie di Bivalvi, soprattutto quelle più diffuse nei nostri mari, siano state particolarmente studiate sotto questo aspetto (Livingstone e Pipe 1992), li rende preziosi per valutare effetti ambientali.

## 1.2 Molluschi Bivalvi utilizzati: *Tapes philippinarum* e *Mytilus galloprovincialis*

I Molluschi Bivalvi utilizzati per questa ricerca sono *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) e *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Sebbene siano organismi molto differenti per quanto riguarda la morfologia, l'habitat e la distribuzione, ambedue le specie possiedono le caratteristiche idonee per essere utilizzate come organismi indicatori di condizioni ambientali. Inoltre entrambe le specie sono diffuse nei nostri mari e oggetto di acquicoltura rivestendo interesse alimentare.

*T. philippinarum* o vongola verace filippina è di origine nipponica con ampia distribuzione indopacifica dal Pakistan alle isole Curili dell'ex U.R.S.S.. Questa specie è stata poi introdotta a scopo di allevamento in Canada e U.S.A., e da qui in Europa alla fine degli anni '70 (Cesari e Pellizzato 1990). In Italia è stata introdotta per la prima volta nel marzo del 1983 nella laguna di Venezia. Oltre ad essere un'importantissima risorsa per molluschicoltura dell'alto e medio Adriatico questa specie ha raggiunto un'ampia distribuzione in Italia ed oggi è stabilmente insediata anche nel delta del Po e nella laguna di Marano, grazie al favorevole spostamento delle giovani larve per effetto delle correnti marine. In molte zone ha poi soppiantato la vongola verace indigena *Tapes decussatus* grazie alle sue caratteristiche di adattabilità e resistenza. Inoltre l'allevamento di questa specie, rispetto a quello di *T. decussatus*, è risultato più conveniente per la maggiore resistenza alle variazioni di temperatura e salinità, l'adattamento ad una maggiore gamma di substrati, e il tasso di crescita più elevato (Breber 1985).



**Figura 1.2a:** Esempio di *Tapes philippinarum*

La conchiglia è spessa e piuttosto tozza con scultura ben evidenziata con creste trasversali concentriche regolari più evidenti nella regione posteriore ed elementi radiali predominanti in quella anteriore. La colorazione esterna è molto variabile con fondo

giallognolo o nocciola chiaro generalmente con maculazioni brune più o meno fuse (Paesanti e Pellizzato 2000) (Figura 1.2a).

*T. philippinarum* predilige fondali sabbiosi o fangosi dove con il piede scava per affondarsi nel sedimento a profondità di circa 10 cm dal quale lascia emergere le aperture dei sifoni. È da tenere presente che la morfologia dei sifoni, uniti alla base, costituisce un carattere tassonomico distintivo rispetto a *T. decussatus*, che presenta invece i sifoni completamente separati. Il suo habitat ideale è costituito da zone di litorale in prossimità e sotto il livello medio del mare (definite rispettivamente come zona “intertidale” e “subtidale”), e che degradano dolcemente. Le zone più adatte alla vita e all’allevamento di questa specie sono localizzate al riparo dal forte moto ondoso e dai venti dominanti che possono destabilizzare il substrato; è importante la presenza di una leggera corrente costante che permetta un ricambio dell’acqua e l’apporto di nuovo alimento per cui risultano ideali le zone lagunari e le foci dei fiumi (Paesanti e Pellizzato 2000).

L’altra specie utilizzata nella presente ricerca, *Mytilus galloprovincialis*, è ritenuta autoctona delle coste del Mediterraneo e del Mar Nero, anche se oggi ha una vasta distribuzione nelle zone temperate di tutto il mondo (Brownes et al. 2006), essendo stata identificata nel sud della California, in Giappone, ad Hong Kong nella costa cinese fino alla Korea, in Australia, Nuova Zelanda, Tasmania e Sud Africa.



**Figura 1.2b:** Esemplare di *Mytilus galloprovincialis*

*M. galloprovincialis* è provvisto di una conchiglia nera all’esterno e internamente le valve sono madreperlacee; le due valve sono uguali e allungate, e negli individui tipici (come quello di Figura 1.2b) la parte verso l’umbone è appuntita mentre il margine posteriore è arrotondato.

*M. galloprovincialis* vive generalmente nella zona infralitorale, dal limite superiore della zona intertidale fino a profondità di qualche metro, attaccato a materiali duri (rocce o pali) o a substrati relativamente mobili in sospensione (corde) ai quali

aderisce per mezzo del bisso, a differenza di *T. philippinarum*; i mitili in questo modo tendono ad aggregarsi tra loro formando colonie anche molto numerose.

A causa delle loro zone di permanenza ambedue le specie possono essere esposte a variazioni anche notevoli di parametri chimici e fisici delle acque, quali temperatura, salinità, percentuale di ossigeno disciolto e a periodi più o meno lunghi di esposizione all'aria. I conseguenti problemi di disidratazione e scarsa ossigenazione vengono fisiologicamente aggirati tramite la chiusura ermetica delle valve e l'attivazione di strategie metaboliche anaerobiche che riguardano soprattutto aumento e diversificazione delle riserve energetiche utilizzabili durante l'anossia, presenza di vie metaboliche alternative e specifiche che portano alla produzione di numerosi prodotti finali e assicurano una aumentata resa energetica in ATP e riduzione dell'intensità metabolica che permette di ridurre al minimo i costi energetici. Delle due specie prese in esame *M. galloprovincialis* sembra essere più adattabile rispetto a *T. philippinarum* ad un metabolismo di tipo anaerobico in quanto quest'ultima, in condizioni di anossia, è meno efficiente nel ridurre l'attività metabolica attraverso la riduzione dell'enzima piruvato chinasi, enzima chiave nella regolazione del catabolismo glucidico. *M. galloprovincialis* sembra invece in grado di ridurre l'attività enzimatica più velocemente fin dalle prime ore di anossia, consentendo un maggior tempo di sopravvivenza (Missiroli 2000). L'esposizione all'aria di *T. philippinarum* ha evidenziato un accumulo di ammonio nell'emolinfa che potrebbe partecipare, come tampone, al bilanciamento acido-base durante queste condizioni (Ali e Nakamura 2000).

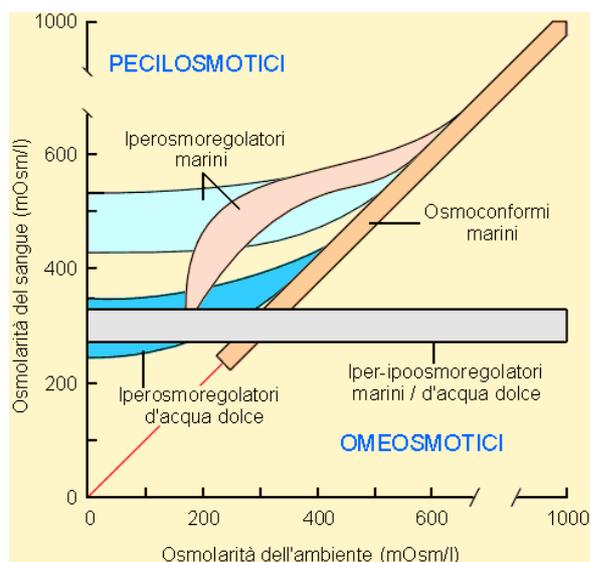
## **2. Meccanismi biochimici cellulari di interazione con l'ambiente**

### **2.1 Regolazione ionica e attività ATPasiche Na-dipendenti**

Gli organismi marini si trovano spesso a far fronte ad un ambiente mutevole che può essere facilmente perturbato da fattori intrinseci ed estrinseci. In particolare gli ambienti costieri dove vivono le specie animali coinvolte nella presente ricerca rappresentano zone di interfaccia tra aria, terra e acqua che interagiscono tra loro, influenzando sull'ambiente, ognuno con proprie sollecitazioni. Il rapporto tra i tre habitat cambia ciclicamente implicando variazioni con ritmo stagionale e circadiano; tra questi ultimi rientrano anche variazioni dello stato di emersione e immersione che riguardano le specie cosiddette intertidali.

Vi sono due tipi di regolazione ionica: extra- ed intracellulare. La regolazione ionica extracellulare riguarda il mantenimento della composizione ionica dei liquidi extracellulari al variare di quella dell'ambiente acquatico esterno.

Mentre tutti gli animali regolano il contenuto di soluti intracellulari, l'omeostasi ionica extracellulare, è attuata solo da organismi regolatori (Le Gal 1988). Questi comprendono la quasi totalità dei Vertebrati marini, che sono in grado di mantenere una concentrazione iono-osmotica dei liquidi extracellulari variabile tra 300 e 450 mOsm/L contro quella dell'ambiente esterno che è mediamente intorno a 1100 mOsm/L, almeno nei nostri mari. La regolazione ionica e quella osmotica possono essere attuate insieme come nei Teleostei, attraverso il controllo attivo della concentrazione di ioni inorganici. Negli Elasmobranchi invece, le due regolazioni sono attuate in modo separato: quella ionica attraverso l'espulsione attiva di ioni, quella osmotica grazie all'utilizzo di cataboliti azotati organici, come urea e ossido di trimetilammina, che permettono di mantenere bassa la concentrazione ionica (Figura 2.1a).



**Figura 2.1a:** Evoluzione dell'osmolarità del sangue in funzione di quella del mezzo esterno (Modificato da: Gilles 2000)

Le specie meno evolute, come la maggior parte degli Invertebrati, sono totalmente o in parte osmoconformi con l'ambiente relativamente ai fluidi extracellulari. I Molluschi Bivalvi marini sono considerati in generale pecilosmotici, ovvero presentano nei fluidi extracellulari una composizione ionica e una pressione osmotica simile all'acqua marina circostante, seguendone le variazioni di salinità (Prosser 1986) (Figura 2.1a, Tabella 2.1a).

	Genere	Concentrazione ionica (mM)						Osmolarità (mOsm)
		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+</sup>	Mg <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
Acqua di mare		470	10	10	55	570		1100
Molluschi	<i>Mytilus</i>	490	13	13	56	573	29	1148
Crostacei	<i>Carcinus</i>	525	13	14	21	502	17	1100
Teleostei	<i>Gadus</i>	174	6	7	3	150		308

**Tabella 2.1a:** Composizione del fluido extracellulare e sua osmolarità in animali marini (Willmer et al. 2003)

Pur essendo quindi osmoconformi, i Molluschi Bivalvi possono attuare alcune strategie per mantenere composizioni dei liquidi extracellulari in parte diverse rispetto a quelle dell'ambiente esterno; nei liquidi extracellulari si riscontra spesso infatti una maggiore concentrazione di ioni bicarbonato e potassio, e una minore concentrazione di solfato rispetto all'esterno. Tali variazioni, pur comportando un aumento trascurabile

della concentrazione ionica totale, determinano una maggiore pressione osmotica all'interno rispetto al mezzo esterno, tale da consentire al mollusco di assumere acqua, necessaria sia per mantenere un minimo flusso di urina, che per la secrezione di muco. Alcune specie di Bivalvi sono state inoltre dimostrate in grado di effettuare una certa regolazione ionica extracellulare, differente nell'ambito della stessa specie a seconda del tessuto. Il bivalve eurialino *Rangia cuneata* è in grado di mantenere i fluidi corporei iperosmotici rispetto al mezzo esterno: alla diminuzione della salinità ambientale aumenta nel mantello l'attività della Na,K-ATPasi, mentre nelle branchie non si ha alcuna risposta adattativa, evidenziando una diversa capacità di regolazione a seconda del tessuto (Saintsing e Towle 1978). Anche le vongole *Tapes philippinarum* e *Tapes decussatus* sono state dimostrate in grado di variare le proporzioni reciproche dei cationi  $\text{Na}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  in dipendenza sia della salinità esterna che di altri fattori riconducibili a variazioni stagionali. Queste specie sarebbero quindi in grado di attuare, anche se limitatamente, una certa regolazione ionosmotica, a differenza di altri Bivalvi marini in cui si osserva in generale diminuzione della concentrazione ionica totale al diminuire della salinità ambientale. Una strategia di tipo comportamentale per ritardare il riequilibrio con l'ambiente esterno quando gli animali vengono esposti a stress osmotico con intense variazioni di salinità ambientale consiste invece nella chiusura delle valve. In *Mytilus* ad esempio, la chiusura delle valve può mantenere una osmolalità costante dei fluidi extracellulari per circa 96 ore (Bayne 1976).

Per quanto riguarda la regolazione intracellulare, tutti gli animali hanno evoluto meccanismi in grado di far fronte a variazioni ambientali mantenendo costante la regolazione ionica. L'omeostasi cellulare, essenziale per tutti i processi vitali, è mantenuta grazie a meccanismi complessi, spesso modulati tramite sensori e secondi messaggeri che, attraverso una cascata di segnali, mettono in relazione l'ambiente esterno e le sue variazioni, con quello interno intracellulare. Tuttavia un diverso ambiente acquatico esterno si ripercuote sulla composizione ionica intracellulare. Come si può vedere dai dati esposti in Tabella 2.1b, il contenuto ionico intracellulare in diversi Molluschi di acqua dolce è sensibilmente inferiore rispetto a quelli di acqua salata, indicando così che la concentrazione di ioni inorganici tende ad aumentare all'aumentare della salinità ambientale.

Il catione intracellulare dominante negli animali è sempre il potassio, mentre il sodio è lo ione dominante in buona parte dei fluidi extracellulari: non stupisce quindi che l'enzima Na,K-ATPasi sia tra gli effettori più importanti di questa regolazione. Questo enzima, sfruttando l'energia ottenuta dalla scissione dell'ATP, mantiene all'interno della cellula elevato il livello del potassio e basso quello del sodio;

quest'ultimo è anche in parte regolato dal pH intracellulare tramite l'estruzione attiva di  $H^+$  e lo scambio in antiporto  $Na^+/H^+$ . Il pH stesso dipende da un complesso sistema di regolazione acido-base legato al livello di  $CO_2$  e di  $HCO_3^-$ . Sembra inoltre presente in molte specie animali una seconda attività ATPasica attivata da un solo catione monovalente, detta Na-ATPasi, che, parallelamente alla Na,K-ATPasi, sarebbe in grado di traslocare il sodio all'esterno della membrana plasmatica senza lo scambio con il  $K^+$  (Ventrella et al., 1992a 1987; Proverbio e Del Castillo 1981). Questo enzima sembra rivestire in molti invertebrati acquatici un ruolo fondamentale nella regolazione ionica. Per la maggior parte delle cellule gli ioni  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$  sono i componenti osmolitici principali del citoplasma e in grado di variare; le concentrazioni di tutti gli altri ioni si influenzano reciprocamente con meccanismi a feedback e di trasporto bilanciato e hanno livelli intracellulari allo stato libero relativamente bassi e costanti nel tempo (Willmer et al. 2003).

Concentrazione ionica (mM)					
Genere	$Na^+$	$K^+$	$Cl^-$	$Ca^+$	
Acqua di mare					
<i>Mytilus</i>	79	152	94	7	Willmer et al. 2003
<i>Sepia</i>	31	189	45	2	Willmer et al. 2003
<i>Perna</i>	126,6	160,1	153,4	n.d	Stucchi Zucchi & Salamao 1998
Acqua dolce					
Willmer et al. 2003					
<i>Anodonta</i>	6,6	18,4	3,9	11,5	Le Gal 1988
<i>Dreissena</i>	7,8	8,4	2,0	n.d	Dietz et al. 1997

**Tabella 2.1b:** Concentrazioni intracellulari dei principali ioni in diversi generi di Molluschi. n.d.: non determinato

Il mantenimento dell'osmolalità intracellulare rispetto a variazioni di quella dell'ambiente esterno è dovuto tuttavia non solo alla presenza di ioni inorganici, ma anche e soprattutto alla presenza di osmoliti biocompatibili, ovvero composti organici a basso peso molecolare che, anche in discrete concentrazioni, non interferiscono con i normali processi cellulari come avverrebbe con gli ioni inorganici. Gli osmoliti biocompatibili sono anfoioni senza una carica netta, quindi in soluzione la variazione di concentrazione non influisce sulla carica netta del loro ambiente (Gilles 2000). Gli osmoliti biocompatibili, tra i quali taurina, betaina e diversi amminoacidi liberi, in particolare alanina e prolina, consentono l'adeguamento dell'osmolalità cellulare anche a salinità esterne elevate. Se lo stesso scopo dovesse essere conseguito con l'utilizzo di

ioni inorganici, questi dovrebbero essere in concentrazioni tali da alterare processi cellulari come l'attività enzimatica, modificando ad esempio la struttura enzimatica oppure parametri cinetici come  $V_m$  e  $K_m$ . Pertanto, in generale, negli invertebrati marini ad una variazione della salinità ambientale non si osserva tanto una variazione di idratazione dei tessuti, quanto principalmente una variazione della concentrazione intracellulare di osmoliti compatibili. In *Mytilus galloprovincialis* il decremento di salinità dal 38 al 19‰ porta, nel muscolo adduttore posteriore, ad una diminuzione della concentrazione dell'osmolita glicina-betaina del 69% (de Vooy e Geenevasen 2002). Questi composti sono intermedi di cicli metabolici comunemente presenti nella cellula; pertanto la loro concentrazione può essere variata in tempi brevi per effetto della modulazione delle reazioni metaboliche in cui sono coinvolti come reagenti o prodotti. In particolare in corrispondenza di una riduzione della salinità esterna si osserva una marcata diminuzione nella concentrazione di alcuni amminoacidi liberi, mentre in corrispondenza dell'aumentare della salinità si verifica un incremento della loro concentrazione. L'incremento e la diminuzione degli amminoacidi liberi all'interno della cellula è regolato sia da processi metabolici, sia attraverso la loro assimilazione dal mezzo esterno. La diminuzione di amminoacidi riguarda generalmente la formazione di prodotti finali del metabolismo quali taurina e betaina, mentre l'aumento, principalmente a carico di aspartato e glutammato, può anche essere di origine biosintetica (Prusch 1983). L'assorbimento attivo di amminoacidi liberi dal mezzo esterno in ambiente marino è possibile grazie al gradiente di sodio tra il compartimento intra- ed extracellulare mantenuto dalla Na,K-ATPasi (Kofman 1986). In *Mytilus edulis* si possono raggiungere concentrazioni cellulari di amminoacidi pari a  $10^6$  volte quelle presenti nell'acqua marina; la loro assunzione avviene per il 70-80% attraverso le branchie e per il resto attraverso il mantello, quindi gli amminoacidi sono trasferiti ai tessuti più interni (Wright 1985).

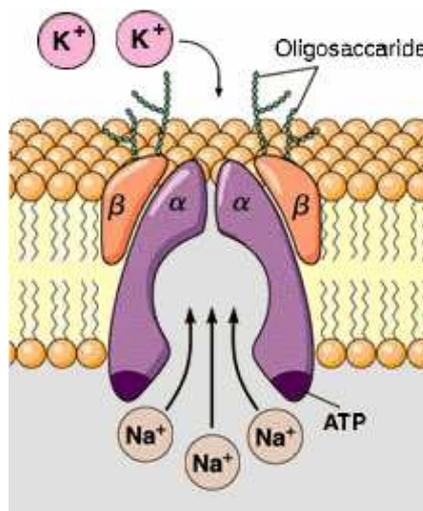
Vediamo ora più in dettaglio le due ATPasi di membrana Na,K-ATPasi e Na-ATPasi che sono state prese in considerazione in questa ricerca.

## 2.1a Na,K-ATPasi

Uno degli enzimi chiave nel trasporto ionico di membrana, essenziale per l'omeostasi cellulare in tutti gli organismi animali, è la Na,K-ATPasi (E.C. 3.6.1.3). Questo complesso enzimatico di membrana, scoperto da Skou nel 1957, è stato dallo stesso identificato con una vera e propria pompa ionica che trasporta  $\text{Na}^+$  all'esterno della cellula in scambio con  $\text{K}^+$ , ambedue gli ioni contro il proprio gradiente di concentrazione, fungendo così da antiporto, ed utilizzando l'energia liberata dall'idrolisi di ATP. Il complesso enzimatico è ubiquitario nella membrana plasmatica delle cellule animali e particolarmente abbondante in organi e tessuti deputati alla regolazione ionica e iono-osmotica che fungono da interfaccia tra l'ambiente intra- ed extracellulare. In cellule orientate, quali quelle epiteliali, la sua localizzazione è tipicamente basolaterale (Willmer et al. 2003).

La Na,K-ATPasi è una proteina integrale di membrana, che cioè attraversa da parte a parte la membrana plasmatica. Il complesso enzimatico attua lo scambio di  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  con un rapporto stechiometrico di  $3\text{Na}^+ / 2\text{K}^+ / 1 \text{ATP}$ . Il trasporto contro gradiente di  $\text{Na}^+$  verso l'esterno della cellula e di  $\text{K}^+$  verso l'interno permette alle cellule di mantenere un gradiente chimico ed elettrico, negativo all'interno, tra i due compartimenti separati dalla membrana plasmatica (Lingrel e Kuntzweiler 1994).

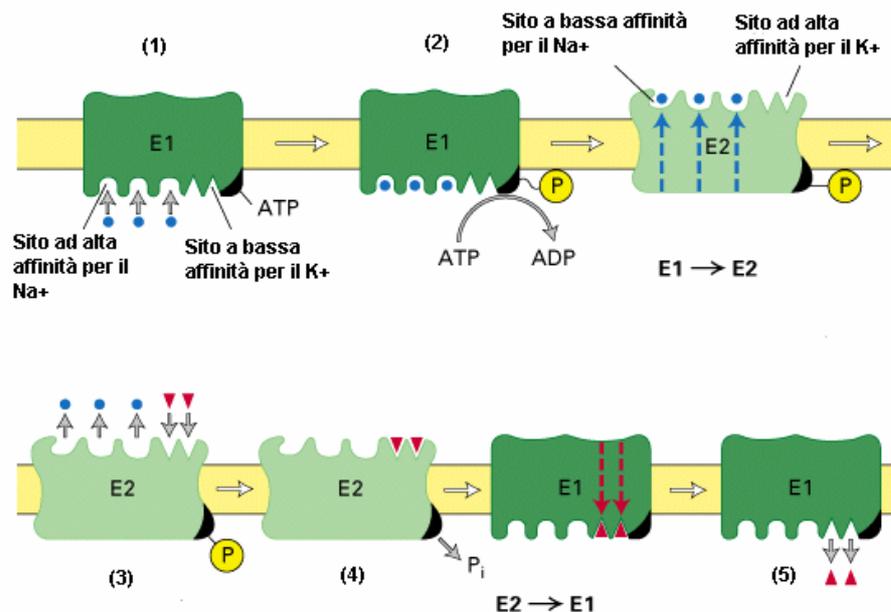
Il complesso risulta composto da due polipeptidi  $\alpha$  e  $\beta$  (Figura 2.1a): la subunità  $\alpha$  di circa 110 KDa attraversa la membrana plasmatica essendo per circa il 40% inserita nel doppio strato fosfolipidico (Lingrel e Kuntzweiler, 1994) e contiene i siti di legame per l'ATP, cationi e specifici inibitori (glicosidi cardiaci), mentre la subunità  $\beta$ , di circa 55 KDa, è una glicoproteina responsabile del trasporto e dell'assemblaggio della subunità  $\alpha$  alla membrana plasmatica (Glynn 1993; Sweadner 1989). Nonostante l'attività catalitica dell'enzima sia svolta essenzialmente dalla subunità  $\alpha$ , la subunità  $\beta$  è risultata essenziale per il corretto funzionamento della pompa in quanto il suo distacco da essa causa la perdita irreversibile dell'attività catalitica (Lopez et al. 2002).



**Figura 2.1b:** Struttura della Na,K-ATPasi  
(Modificato da: <http://egbeck.de/skripten/bs11-17.htm>)

Inizialmente un altro componente, chiamato subunità  $\gamma$ , era stato attribuito alla struttura dell'enzima; tuttavia recentemente è stato suggerito che tale subunità non faccia parte integrante del complesso enzimatico, ma svolga un ruolo modulatore in alcuni tessuti modificando l'affinità dell'enzima per l'ATP (Cortes et al. 2006; Therien e Blostein 2000). È ormai accertato che la Na,K-ATPasi è composta totalmente da uguale numero delle due subunità che costituiscono la struttura dimerica  $\alpha_2\beta_2$ ; il monomero  $\alpha\beta$  sembra infatti non avere attività come trasportatore ionico, ma soltanto attività ATPasica (Skou 1988). Per l'attività catalitica è necessaria una stretta associazione con i lipidi di membrana, in particolare con i fosfolipidi carichi negativamente a pH fisiologico quali fosfatidilserina e fosfatidilglicerolo. Ad ogni complesso  $\alpha_2\beta_2$  sono legate circa 50 molecole di fosfolipidi, di cui una sola a carattere acido, e circa 50 molecole di colesterolo; la delipidizzazione implica la perdita dell'attività enzimatica, peraltro ripristinata dall'aggiunta di fosfolipidi a carattere acido (Skou 1988). La stretta dipendenza dell'attività Na,K-ATPasica dall'intorno lipidico e dalla sua composizione sia in teste polari che in catene aciliche, che concorrono primariamente a determinare la fluidità di membrana, costituisce un aspetto caratteristico comune degli enzimi di membrana, la cui modulazione si esplica pertanto, oltre che attraverso regolatori diretti, anche tramite variazioni delle caratteristiche chimico-fisiche del microambiente di membrana in cui l'enzima stesso è inserito (Cornelius 2001). Particolare importanza, a questo riguardo, assumono i fattori che sono in grado di modificare la fluidità e lo spessore di membrana (Schuurmans Stekhoven e Bonting 1981).

Diverse isoforme sia della subunità  $\alpha$  ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4$ ) che della  $\beta$  ( $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ ) (Blanco 2000; Dunbar e Caplan 2000) sono state identificate nei Vertebrati: esse differiscono per composizione di amminoacidi, peso molecolare e anche modalità di interazione con i lipidi di membrana (Matsuda e Iwata 1986). Queste variazioni strutturali si rispecchiano in caratteristiche funzionali diverse dell'enzima, quali una diversa sensibilità agli ioni e agli inibitori caratteristici dell'enzima come l'ouabaina, che sembrano attribuibili principalmente alla diversa composizione in isoforme  $\alpha$ . Sono state osservate variazioni della percentuale di isoforme in uno stesso tessuto in base al periodo del ciclo vitale e in condizioni patologiche (Blanco e Mercer 1998). Pertanto la presenza di diverse isoforme potrebbe avere un ruolo fisiologico nella regolazione dell'attività enzimatica attuata anche mediante la diversa risposta a regolatori endogeni (Broude et al. 1989).



**Figura 2.1c:** Ciclo catalitico della Na,K-ATPasi

(Modificato da: [http://www.zoology.ubc.ca/~auld/bio350/lectures/ATPase\\_pumps.htm](http://www.zoology.ubc.ca/~auld/bio350/lectures/ATPase_pumps.htm))

La Na,K-ATPasi è una ATPasi di tipo P, ovvero forma un intermedio transitorio fosforilato durante il ciclo catalitico del trasporto ionico attivo, nel corso del quale l'enzima assume almeno due diverse conformazioni, dette  $E_1$  e  $E_2$ , che permettono il passaggio dei due ioni,  $Na^+$  e  $K^+$ , in senso opposto attraverso la membrana plasmatica. La reazione di trasporto viene schematizzata in diverse tappe (Figura 2.1c): inizialmente tre ioni  $Na^+$  si legano alla subunità  $\alpha$  che contiene il sito catalitico intracellulare ad alta affinità per  $Na^+$  (1), questo legame favorisce la fosforilazione dell'enzima, che si trova

nella conformazione  $E_1$ , da parte dell'ATP, con liberazione di ADP (2). Il sito di fosforilazione è la catena laterale di uno specifico residuo di aspartato della subunità  $\alpha$  (Jorgensen et al. 2003); questa tappa necessita di  $Mg^{2+}$ . La fosforilazione induce la conversione della conformazione  $E_1$  in  $E_2$  spostando i siti di legame verso il lato extracellulare della membrana. La forma  $E_2$  fosforilata ha bassa affinità per il  $Na^+$  e così i tre ioni vengono rilasciati all'esterno; al contrario, questa forma ha alta affinità per il  $K^+$ , per cui due ioni si legano ai siti appositi (3). Il legame con il  $K^+$  induce la defosforilazione dell'enzima (4) che non è più stabile nella forma  $E_2$  e quindi interconverte nella forma  $E_1$ , rilasciando  $Mg^{2+}$ . Secondo questo modello i due ioni di  $K^+$  vengono così liberati all'interno della membrana plasmatica, (5) completando il ciclo.

Anche se questo complesso enzimatico è stato originariamente scoperto da Skou in un mollusco, in particolare negli assoni giganti di calamaro, la sua presenza in tessuti non nervosi di Molluschi Bivalvi era fino a poco tempo fa scarsamente documentata. Attualmente invece la presenza dell'enzima in vari tessuti di Bivalvi è ampiamente riportata, sia in specie marine (Ventrella et al. 1992a; Howland e Faus 1985) che d'acqua dolce (Dietz e Findley 1979).

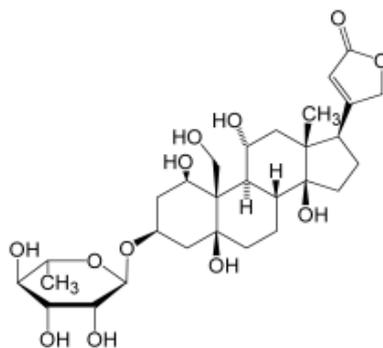
La Na,K-ATPasi rappresenta il maggior regolatore della concentrazione di  $Na^+$  citoplasmatica e come tale ha un importante ruolo nella regolazione del volume cellulare, del pH citoplasmatico e nel guidare una quantità di trasporti come quelli del glucosio o degli amminoacidi che dipendono dal gradiente di  $Na^+$  tra i due compartimenti intra- ed extracellulare (Therien e Blostein 2000). Inoltre l'attività dell'enzima contribuisce al mantenimento del gradiente chimico per gli ioni ai due lati della membrana e quindi all'instaurarsi di una differenza di potenziale transmembrana sempre negativa per il compartimento intracellulare rispetto all'esterno. Tale differenza di potenziale, che comunemente è di circa 50-80 mV, nei tessuti eccitabili è alla base della propagazione e dell'amplificazione dei segnali nei neuroni e nelle cellule muscolari, processi che si attuano attraverso transitorie variazioni del potenziale di membrana (Willmer 2003; Clausen et al. 1991).

La pompa del  $Na^+$  è il bersaglio di molti meccanismi di regolazione che vengono attivati in risposta alle necessità di cambiamenti cellulari. Variazioni di attività della pompa si hanno in risposta ad un ampio spettro di stimoli fisiologici, quali la propagazione dell'impulso nervoso, modificazioni dietetiche e delle condizioni fisiologiche, in situazioni patologiche o in presenza di contaminanti. Tali meccanismi sono molteplici e non del tutto chiariti; vengono qui considerati pertanto solo gli effetti di alcuni regolatori diretti, in particolare i cationi monovalenti e il substrato ATP, che risultano di maggior interesse nell'ambito di questa ricerca. Determinanti per l'attività

enzimatica delle pompe di membrana sono le concentrazioni dei substrati che possono agire sia come attivatori che come inibitori. L'effetto dei cationi  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  e dell'ATP sul complesso enzimatico si esplica attraverso le varie tappe del ciclo catalitico in cui questi effettori vengono via via legati e rilasciati. Il ciclo di trasporto ionico della Na,K-ATPasi viene attivato durante la fosforilazione della forma  $E_1$  da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e ATP, quando si trovano sul lato citoplasmatico; il  $\text{K}^+$  attiva invece, se presente dal lato extracellulare, la defosforilazione della forma  $E_2$  (Skou e Esmann 1992). In genere in molte cellule la concentrazione di ATP è saturante, tuttavia in certe condizioni l'ATP può scendere sotto il livello di saturazione, come ad esempio in alcuni tessuti di Molluschi tenuti in condizioni di anaerobiosi (Missiroli 2000), diventando così il fattore limitante per l'attività enzimatica. L'ATP può fungere inoltre da regolatore insieme all' $\text{Mg}^{2+}$ : il reale substrato utilizzato dalla Na,K-ATPasi è infatti considerato il complesso MgATP che ha più alta affinità per il sito catalitico della forma  $E_1$  dell'enzima, rispetto all'ATP libero. La pompa del  $\text{Na}^+$  presenta poi degli specifici siti di legame a bassa affinità per il  $\text{Mg}^{2+}$ : il catione legandosi regola l'attività enzimatica, favorendo il legame dell'ATP all'enzima in forma  $E_1$  e, diminuendo l'affinità dell'enzima per il  $\text{Na}^+$ , permettendo il passaggio alla forma  $E_2$  fosforilata (Jorgensen et al. 2003). Proprietà caratteristica della Na,K-ATPasi per la sua attivazione è la richiesta contemporanea nel mezzo di due diversi cationi monovalenti, in particolare di  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . La presenza di  $\text{Na}^+$  per il funzionamento della Na,K-ATPasi è essenziale non potendo questo essere sostituito da altri cationi. Tale essenzialità è stata confermata anche in Molluschi Bivalvi, in particolare in *M. galloprovincialis* (Ventrella et al. 1993), mentre soltanto nei Mammiferi si è osservata una debole attivazione dell'enzima da parte del  $\text{Li}^+$  in assenza di  $\text{Na}^+$ . Il  $\text{K}^+$  non è invece indispensabile all'attività dell'enzima in quanto può essere sostituito con efficacia paragonabile da altri cationi quali  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Rb}^+$  e  $\text{Cs}^+$  (Scheeberg e Apell 2001; Skou e Esmann 1992). Inoltre anche il rapporto dalle singole concentrazioni dei due cationi  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  influenza l'attività enzimatica (Trigari et al. 1985b).

Inibitori specifici della Na,K-ATPasi sono i cosiddetti glicosidi cardiaci. Queste sostanze sono composte da due parti: uno zucchero e uno steroide, detto aglicone, coinvolto direttamente nel legame con l'enzima. L'ouabaina (Figura 2.1d) è il più usato tra questi glicosidi ad azione farmacologica per la sua solubilità in acqua e la sua specificità quasi assoluta per la Na,K-ATPasi.

Tale inibitore si lega sul lato extracellulare dell'enzima alla subunità  $\alpha$ , creando legami sia con la regione N-terminale, sia con la regione C-terminale.



**Figura 2.1d:** Struttura della ouabaina  
(Da: <http://www.serva.de/products/data/77647.01.shtml>)

L'affinità dell'enzima per l'ouabaina dipende dalla conformazione della proteina in relazione alla diversa disposizione spaziale dei residui che legano il glicoside al cambiare della conformazione: la massima affinità si ha così nella forma E<sub>2</sub> fosforilata (Palais et al. 1996). Ciò sembra giustificato dal fatto che nella conformazione E<sub>2</sub> la regione N-terminale forma il sito di riconoscimento per il glicoside, mentre la regione C-terminale forma un canale per il K<sup>+</sup>; in questo modo il legame dell'ouabaina impedirebbe il legame del K<sup>+</sup> alla Na,K-ATPasi bloccandola nella forma E<sub>2</sub> fosforilata (Middelton et al. 2000). Si deve comunque ricordare che nei diversi tessuti e specie animali la sensibilità all'inibizione di ouabaina da parte della Na, K-ATPasi è estremamente variabile; in particolare nei pecilotermi è stata riportata una sensibilità inferiore a quella degli omeotermi, generalmente attribuita a caratteristiche diverse di fluidità della membrana, solitamente maggiore nei primi, per la maggiore insaturazione dei lipidi di membrana (Charnock et al. 1980). Il diverso potere di inibizione dell'ouabaina osservato nei vari tessuti viene attualmente attribuito anche a differenze nel contenuto percentuale di isoforme con diversa sensibilità all'inibitore (Broude et al. 1989).

Numerosi contaminanti sono stati dimostrati in grado di modificare l'attività della Na,K-ATPasi sia attraverso interazione diretta con la struttura enzimatica, quali ad esempio alcuni metalli pesanti (Pagliarani et al. 1996), sia alterando il microambiente dell'enzima (Gordon et al. 1980). Per gli scopi che questa ricerca si prefigge considereremo i possibili effetti su questa attività enzimatica di due contaminanti dell'ambiente marino: l'azoto ammoniacale e i composti organostannici. L'azoto ammoniacale NH<sub>3</sub>-N, contaminante di origine naturale, nelle sue due forme NH<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, è considerato il principale contaminante degli ambienti di allevamento (Chen e Lai 1992). In generale è stato riscontrato che la Na,K-ATPasi può essere attivata dalla presenza di NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, che da alcuni autori è stata attribuita alla capacità dello ione di

sostituire il  $K^+$  nel processo enzimatico (Masui et al. 2002; Randall e Tsui 2002; Pagliarani et al. 1996). Risultati simili in questo senso sono stati riportati in Mammiferi (Wall et al. 1999; Kurtz e Balaban 1986), Teleostei (Randall e Tsui 2002), Crostacei (Masui et al. 2002) e Molluschi Bivalvi (Ventrella 1992a; Borgatti et al. 1998). La sostituibilità del  $K^+$  con  $NH_4^+$  è stata ipotizzata essere direttamente responsabile della tossicità dell'ammoniaca alterando il gradiente ionico transmembrana inducendo così depolarizzazione di membrana (Weihrauch et al. 2004; Randall e Tsui 2002), e riducendo la concentrazione intracellulare di sodio a livelli incompatibili con la vita (Camargo e Alonso 2006). Pochi dati sono presenti in letteratura sull'interazione dell'azoto ammoniacale con la Na,K-ATPasi di Molluschi Bivalvi. Uno studio condotto in precedenza sul bivalve *M. galloprovincialis* (Pagliarani et al. 1996) ha evidenziato un diverso effetto dell'azoto ammoniacale sulle due ATPasi  $Na^+$ -dipendenti in prove *in vivo* e *in vitro*. L'effetto è risultato anche essere tessuto, e dose-dipendente. In *vivo*, in seguito all'esposizione dei mitili a due diverse concentrazioni di  $NH_3-N$ , è stata riscontrata attivazione della Na,K-ATPasi branchiale per esposizione a 0,4 mg/L di  $NH_3-N$ , e al contrario inibizione per 1,0 mg/L di  $NH_3-N$ ; in *vitro*, aggiungendo  $NH_4Cl$  al sistema di reazione, solo la maggiore delle due concentrazioni saggate (1,0 mg/L) è risultata in grado di stimolare l'attività Na,K-ATPasica. Nel mantello la Na,K-ATPasi è risultata insensibile all' $NH_3-N$ , sia in *vivo* che in *vitro*. In uno studio analogo, condotto su *T. philippinarum* esposte a concentrazioni di circa 0,5 e 1,0 mg/L di  $NH_3-N$ , la Na,K-ATPasi non ha manifestato alcun effetto (Pagliarani et al. 1999).

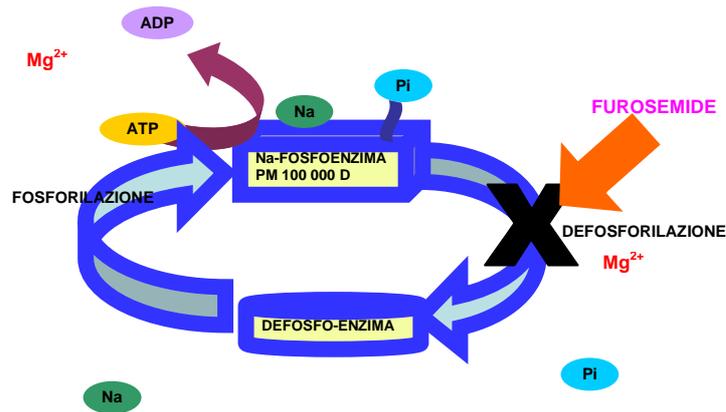
I composti organostannici sono invece contaminanti dell'ambiente acquatico di origine antropica; l'ipotesi che la Na,K-ATPasi possa essere un bersaglio per questi composti è sostenuta da prove *in vitro* che mostrano la sua inibizione in larve di *Artemia* (Machera et al. 1996) e nel fegato e cervello di topo (Samuel et al. 1998). Prove *in vivo* che mostrano inibizione della Na,K-ATPasi in ratti trattati con dibutilstagno (Srivastava 1990) sostengono l'ipotesi che l'inibizione della Na,K-ATPasi possa rappresentare uno dei meccanismi attraverso cui si esplica la tossicità dei composti organostannici (Appel 2004).

## 2.1b Na-ATPasi

Negli ultimi decenni crescente attenzione è stata rivolta ad una seconda attività ATP-asi, anch'essa  $\text{Na}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  dipendente, riscontrata nella membrana plasmatica di numerose specie animali, spesso in coesistenza con la ben nota Na,K-ATPasi, e come questa presente nelle membrane basolaterali di cellule orientate (Proverbio e Del Castillo 1981); tale attività ATP-asi è presumibilmente coinvolta nella regolazione ionica cellulare. La principale caratteristica che differenzia questa Na-ATPasi dalla classica pompa del sodio è l'insensibilità a concentrazioni di ouabaina che annullano completamente l'attività della coesistente Na,K-ATPasi, per cui questa attività enzimatica viene in generale definita ouabaina-insensibile. Oltre che nei Mammiferi, dove è stata inizialmente evidenziata (Proverbio et al. 1991, 1988, 1975), la Na-ATPasi è stata trovata in numerose specie animali appartenenti a un ampio spettro di gruppi tassonomici e in particolare in animali acquatici tra i quali: Teleostei di acqua dolce (Ventrella et al. 1992b) e marini (Ventrella et al. 1990), Crostacei (Proverbio et al. 1988) e Molluschi, sia d'acqua dolce (Lagerspetz e Senius 1979) che marini (Pagliarani et al. 1996; Ventrella et al. 1992a; Proverbio et al. 1988; Howland e Faus 1985), tanto da far supporre una sua diffusione paragonabile a quella della Na,K-ATPasi. Attualmente l'esistenza di una pompa ATPasica ouabaina insensibile che media il trasporto di  $\text{Na}^+$  all'esterno della membrana plasmatica, senza lo scambio con il  $\text{K}^+$ , è stata ipotizzata in diversi tessuti e specie animali ogni qual volta è stata riscontrata un'attività ATPasica  $\text{Na}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$ -dipendente con proprietà in parte distinte dalla coesistente Na,K-ATPasi. I primi dati sperimentali che hanno portato alla dimostrazione di questa attività enzimatica sono stati ottenuti, come sopra ricordato, in tessuti di Mammiferi: qui l'attività Na-ATPasica è stata associata alla formazione di un flusso di ioni  $\text{Na}^+$  attivata dal catione stesso, ma indipendente dal tipo di anione che accompagna il  $\text{Na}^+$ , facendo così escludere che si tratti di una ATPasi anionica (Proverbio e Del Castillo 1981). In tessuti di Mammiferi è stato dimostrato che il trasporto transmembrana degli ioni  $\text{Na}^+$  avviene attraverso due modalità, una in scambio con il  $\text{K}^+$ , attuato dalla Na,K-ATPasi, e l'altra insieme al trasporto con  $\text{Cl}^-$ , o altri anioni, e acqua, attuato dalla cosiddetta Na-ATPasi.

Come nel caso della Na,K-ATPasi, è stato dimostrato che la Na-ATPasi è una ATPasi di tipo P formando un intermedio fosforilato caratteristico con p.m. di circa 100.000 Da durante il ciclo catalitico (Caruso-Neves et al. 2000; Proverbio et al. 2000; Ventrella et al. 1997). Studi diretti alla evidenziazione del meccanismo di tale ciclo non hanno portato tuttavia a mettere in luce sostanziali differenze con quello della Na,K-ATPasi: la fosforilazione avviene con un legame E~P ad alta energia come per la Na,K-

ATPasi, il complesso proteina-fosfato formato in presenza di  $\text{Na}^+$  è del tipo acil-fosfato e la fosforilazione è  $\text{Mg}^{2+}$ -dipendente (Ventrella et al. 1997), indotta da furosemide (Thomas e Del Castillo 2000) e insensibile al  $\text{K}^+$  (Caruso-Neves et al. 1999), mentre la defosforilazione è inibita da furosemide (Ventrella et al. 1997). In base a questi dati il ciclo catalitico, ancora in parte da chiarire, è schematizzato in Figura 2.1e



**Figura 2.1e:** Ciclo catalitico della  $\text{Na}^+$ -ATPasi

Il meccanismo di espulsione del  $\text{Na}^+$  utilizza l'energia derivata dall'idrolisi dell'ATP e consuma ossigeno (Proverbio et al. 1985); pertanto in condizioni di anossia o in presenza di disaccoppianti della catena respiratoria mitocondriale risultano inibite l'attività  $\text{Na}^+$ -ATPasica al pari quella  $\text{Na},\text{K}$ -ATPasica (Whittembury e Proverbio 1970).

Esistono però notevoli differenze tra le due attività enzimatiche che le caratterizzano in maniera specifica: un aspetto fondamentale è la diversa sensibilità ad alcuni inibitori. Nei Mammiferi la  $\text{Na}^+$ -ATPasi non è inibita dall'ouabaina in concentrazioni 1-10 mM, mentre la  $\text{Na},\text{K}$ -ATPasi viene completamente inibita da concentrazioni pari a 0.1 mM. D'altra parte la  $\text{Na}$ -ATPasi viene inibita totalmente da acido etacrinico 2 mM che riduce l'attività della coesistente  $\text{Na},\text{K}$ -ATPasi solo del 53% (Proverbio et al. 1975). La maggiore sensibilità all'acido etacrinico è stata riscontrata anche in Teleostei (Ventrella et al. 1987; Borgatti et al., 1985) e attualmente questo composto viene considerato un inibitore specifico della  $\text{Na}^+$ -ATPasi. Altri inibitori riportati come preferenziali sulla  $\text{Na}$ -ATPasi sono, almeno nei Mammiferi, i diuretici furosemide e triflocin (Del Castillo et al. 1982) e diverse saponine steroidee (De Souza et al 2004). Inoltre l'attività della  $\text{Na}$ -ATPasi è, come già detto, indipendente sia dalla presenza di un secondo catione monovalente attivante, al contrario della  $\text{Na},\text{K}$ -ATPasi,

sia dagli altri anioni che vengono cotrasportati insieme al  $\text{Na}^+$  (Proverbio e Del Castillo 1981). La Na-ATPasi sembra ancora più sensibile al microambiente lipidico della Na,K-ATPasi poiché viene inattivata da detergenti (DOC) che invece attivano la seconda (Trigari et al. 1986). Recentemente è stato dimostrato che l'attività Na-ATPasica in tessuti di Mammiferi è inibita dalla perossidazione lipidica, mentre l'aggiunta di fosfatidilcolina di soia, ricca di acidi grassi poliinsaturi, protegge dalla perossidazione e consente il mantenimento dell'attività enzimatica (Marín et al. 2000).

In tutti i gruppi tassonomici studiati la Na-ATPasi ha mostrato caratteristiche comuni quali l'insensibilità a concentrazioni di ouabaina, l'inibizione da parte della furosemide e dell'acido etacrinico e la richiesta di un solo catione monovalente, non obbligatoriamente  $\text{Na}^+$ . Al contrario le risposte ad alcuni effettori sembrano caratterizzare diversamente l'attività enzimatica nei pecilotermi, Teleostei e Molluschi, rispetto ai Mammiferi, suggerendo che la sensibilità dell'enzima ad alcuni parametri abbia subito cambiamenti evolutivi anche in funzione del diverso ruolo assunto. Il confronto delle attività Na-ATPasiche in animali acquatici esposti a diverse salinità ambientali ha portato a ipotizzare una diversa prevalenza delle due diverse pompe del  $\text{Na}^+$  in dipendenza della salinità. Nelle branchie di teleostei marini (Trombetti et al. 1990; Pagliarani et al. 1988; Borgatti et al. 1985) e di acqua dolce adattati all'acqua salata (Ventrella et al. 1992a; Pfeiler e Kirschner 1972) l'attività della Na,K-ATPasi prevale nettamente su quella della Na-ATPasi, mentre nelle branchie di trota adattata all'acqua dolce (Ventrella et al. 1992b; Pfeiler e Kirschner 1972) accade il contrario. Queste osservazioni hanno fatto ipotizzare che la Na-ATPasi ouabaina-insensibile abbia un ruolo prevalente nell'osmoregolazione dei teleostei d'acqua dolce, contribuendo a mantenere la pressione osmotica cellulare superiore a quella esterna (Ventrella et al. 1992b).

La presenza della Na-ATPasi è stata riscontrata anche in invertebrati acquatici: in particolare in *M. galloprovincialis* l'attività Na-ATPasica in mantello, branchie e epatopancreas è risultata nettamente superiore a quella della coesistente Na,K-ATPasi (Trombetti et al. 1992); in altri Molluschi Bivalvi quali *Anodonta cygnea* (Lagerspetz e Senius 1979) e *M. edulis* (Howland e Faus 1985) è stata riscontrata l'attività ATPasica ouabaina-insensibile, mentre non è risultata determinabile, almeno nelle condizioni riportate dagli autori citati, quella Na,K-ATPasica. In altre specie, come in *Chamelea gallina* e *Scapharca inaequalvis*, la Na-ATPasi non risulta prevalente rispetto alla Na,K-ATPasi. In *T. philippinarum* nelle branchie le due ATPasi hanno attività simile, mentre nel mantello spesso l'attività Na-ATPasica non risulta determinabile (Pagliarani et al. 2002). Inoltre anche l'attivazione della Na-ATPasi da parte di cationi monovalenti

risulta diversa a seconda della specie: in *M. galloprovincialis* (Ventrella et al. 1992a), *M. edulis* e nel calamaro *Doritheutis plei* (Proverbio et al. 1988) l'attività enzimatica può essere attivata da diversi cationi che prendono il posto del  $\text{Na}^+$ ; in particolare si è riscontrato in questi animali una completa sostituzione del  $\text{Na}^+$  da parte dello ione  $\text{NH}_4^+$ . Tale attivazione aspecifica da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$  era stata osservata anche nella spigola (*Dicentrarchus labrax*), dove è stato dimostrato che tali cationi sembrano interagire con lo stesso sito di legame dell'enzima (Ventrella et al. 1987). La sostituibilità del  $\text{Na}^+$  con altri cationi monovalenti nell'attivazione dell'ATPasi insensibile all'ouabaina ha fatto supporre che questa attività enzimatica possa avere, almeno negli animali acquatici, un ruolo nella regolazione di cationi monovalenti anche diversi dal  $\text{Na}^+$ . Nei Mammiferi invece solo il  $\text{Li}^+$  può parzialmente sostituire il  $\text{Na}^+$  (Del Castillo e Robinson 1985; Marín 1983). Altre differenze di specificità di attivazione tra le specie studiate riguardano l'idrolisi di nucleotidi trifosfati: mentre nei Mammiferi solo l'ATP può fungere da substrato per la Na-ATPasi, aspetto che la contraddistingue dalla coesistente Na,K-ATPasi (Del Castillo et al. 1982), nella spigola ambedue le attività enzimatiche idrolizzano anche GTP, UTP e CTP, sia pure con un ordine di efficienza diverso (Borgatti et al. 1985).

L'insieme di queste osservazioni sembra confermare l'ipotesi che negli organismi meno evoluti la Na-ATPasi la cui attivazione risulta in generale meno specifica e la cui incidenza come attività percentuale sulla coesistente Na,K-ATPasi è in generale maggiore, rivesta un ruolo rilevante nella regolazione ionica e che essa abbia in qualche modo perso la sua importanza salendo nella scala evolutiva in favore della più specifica Na,K-ATPasi (Pagliarani et al. 1991). A quest'ultima rimarrebbe, in generale, il maggior carico della regolazione del  $\text{Na}^+$  nei Vertebrati. L'elevata attività Na-ATPasica riscontrata nelle branchie di trota d'acqua dolce (Ventrella et al. 1992b) sarebbe invece in relazione al ruolo preponderante, attribuito a questa attività enzimatica, nella osmoregolazione dei Teleostei in ambiente iposmotico.

Anche se le diverse proprietà tra le due attività ATPasiche riscontrate in tessuti e classi zoologiche diverse suggeriscono che le due ATPasi corrispondano a strutture enzimatiche almeno in parte distinte, questo aspetto potrebbe essere definito soltanto dalla separazione delle strutture proteiche responsabili delle due attività enzimatiche. Tentativi in tal senso hanno portato ad evidenziare, in preparazioni microsomiali di branchie di spigola, due frazioni proteiche con diversi profili SDS-PAGE; una con attività Na,K-ATPasica con due bande a 95.000 e 55.000 Da, l'altra con attività Na-ATPasica corrispondente ad un profilo proteico con bande a 60.000 e 30.000 Da (Trigari et al. 1985). Nonostante numerosi dati sperimentali indichino la possibilità che

le due attività enzimatiche siano attribuibili ad enzimi diversi, per quanto è noto finora non è stato possibile separare le due strutture proteiche responsabili dell'attività Na- e Na,K-ATPasica (Thomas e Del Castillo 2000).

Per quanto riguarda l'effetto di contaminanti ambientali su questa attività enzimatica, esistono pochi dati in letteratura. Tuttavia la sua risposta nei Vertebrati a una serie di modulatori quali bradichinina (Caruso-Neves et al. 1999) e angiotensina (Rangel et al. 2000) è sempre distinta da quella della coesistente Na,K-ATPasi.

La maggiore incidenza della Na-ATPasi sulla Na,K-ATPasi nei Molluschi Bivalvi rispetto ai Vertebrati e la sua aspecifica attivazione da cationi monovalenti hanno fatto pensare che essa possa essere coinvolta nel trasporto di cationi monovalenti, oltre che nei processi di assorbimento di soluti legati al gradiente di  $\text{Na}^+$  tra il compartimento intra- ed extracellulare. Inoltre l'accertamento di una sua sensibilità a contaminanti ambientali può costituire un valido strumento per studiare i meccanismi di interazione di sostanze tossiche con l'enzima, oltre che per individuare parametri biochimici per segnalare condizioni potenzialmente nocive.

Esistono pochi dati sperimentali sull'effetto dei contaminanti ambientali sulla Na-ATPasi di Molluschi Bivalvi. Pivovarova et al. (1992) hanno mostrato, nel mitilo di acqua dolce *Anodonta cygnea*, refrattarietà della Na-ATPasi al cadmio a differenza di altre attività ATPasiche. Precedenti ricerche hanno mostrato che in *M. galloprovincialis* esposto a 1,0 mg/L di azoto ammoniacale ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) la Na-ATPasi di mantello è risultata inibita del 30% (Pagliarani et al. 1996), mentre l'esposizione di *T. philippinarum* a concentrazioni di circa 0,5 e 1,0 mg/L di  $\text{NH}_3\text{-N}$ , ha mostrato attivazione della Na-ATPasi (Pagliarani et al. 2003).

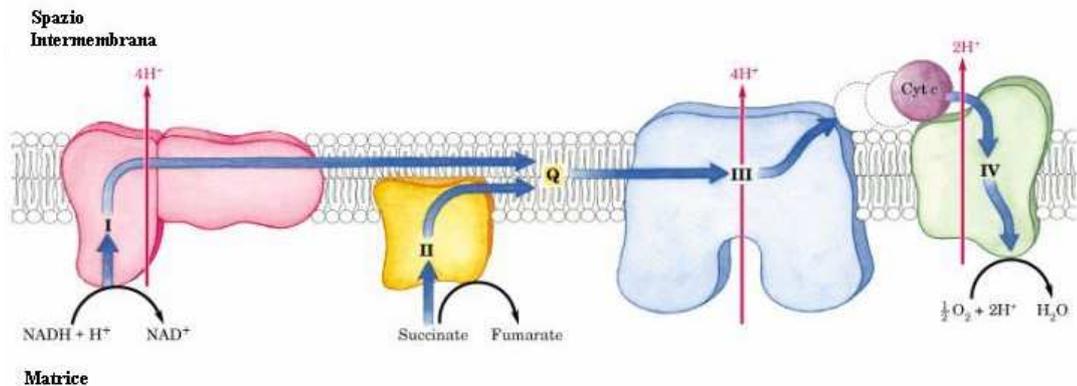
## 2.2 La fosforilazione ossidativa mitocondriale

Tutte le tappe enzimatiche della degradazione ossidativa dei carboidrati, degli acidi grassi e degli amminoacidi nelle cellule aerobiche convergono nella tappa finale della respirazione cellulare, in cui l'energia prodotta dalle ossidazioni viene utilizzata per la sintesi di ATP. La parte terminale di questo processo è localizzata nei mitocondri (fosforilazione ossidativa mitocondriale). Gli studi sono stati effettuati principalmente in tessuti di Mammiferi e la descrizione della catena respiratoria mitocondriale si riferisce a quanto è stato riscontrato in questi animali. Peraltro, sebbene esista un minor numero di studi sulla fosforilazione ossidativa nei Molluschi Bivalvi rispetto ai Mammiferi, indagini sul consumo di ossigeno durante il metabolismo aerobico nel genere *Mytilus* hanno evidenziato, sia nelle branchie che nel mantello, mitocondri con caratteristiche pari a quelle dei Mammiferi. Inoltre non sono state finora riscontrate proprietà diverse nella catena respiratoria (de Zwaan e Mathieu 1992).

I mitocondri sono organelli costituiti da due membrane, di cui quella esterna è facilmente permeabile a piccole molecole (<14 kDa) e a ioni, che si muovono liberamente attraverso canali transmembrana formati da una famiglia di proteine integrali di membrana chiamate porine. La membrana mitocondriale interna è invece altamente selettiva e impermeabile a piccole molecole e a quasi tutti gli ioni, compresi i protoni ed il suo attraversamento è possibile solo con l'ausilio di trasportatori (Wallace e Starkov 2000). In questa struttura sono localizzati anche i componenti della catena respiratoria e il complesso enzimatico che sintetizza l'ATP.

Essendo selettivamente permeabile, la membrana mitocondriale interna determina una separazione netta degli intermedi e degli enzimi citosolici da quelli dei mitocondri; per cui trasportatori specifici consentono il passaggio del piruvato, degli acidi grassi e degli amminoacidi o dei loro derivati  $\alpha$ -chetoacidi nella matrice mitocondriale, dove vengono degradati dal ciclo dell'acido citrico. Il trasportatore dei nucleotidi adenilici permette lo scambio dell'ATP con l'ADP, questo permette l'uscita dell'ATP dal mitocondrio verso i siti di utilizzazione extramitocondriali e il rientro dell'ADP all'interno del mitocondrio per la formazione dell'ATP (Murray et al. 2000).

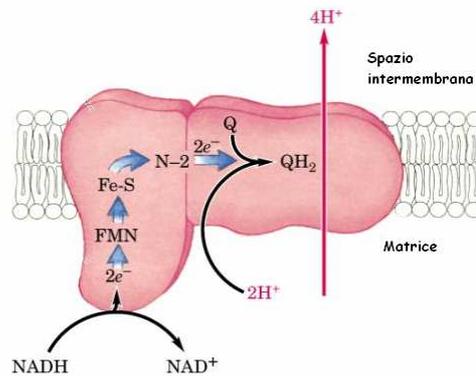
La catena respiratoria mitocondriale è costituita da una serie di trasportatori di elettroni, la maggior parte dei quali è costituita da proteine integrali di membrana, contenenti gruppi prostetici in grado di donare o accettare elettroni. Tali trasportatori, collegati da trasportatori mobili a peso molecolare relativamente basso, sono organizzati in complessi sopramolecolari intramembrana che possono essere tra loro separati mediante un blando trattamento con detergenti evidenziando quattro complessi che partecipano al trasferimento di elettroni (Nelson e Cox 2006) (Figura 2.2a).



**Figura 2.2a:** schema generale dei complessi che compongono il sistema di trasporto elettronico della fosforilazione ossidativa  
 (Modificato da: <http://courses.cm.utexas.edu/emarcotte/ch339k/fall2005/FinalReview.html>)

I Complessi I, III e IV catalizzano il trasporto di elettroni da NADH all'ossigeno trasferendo protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana così generando il gradiente protonico necessario alla sintesi di ATP. Il Complesso II trasferisce elettroni alla catena respiratoria dal succinato senza trasporto di protoni. All'interno della membrana mitocondriale interna si trova anche l'ATP sintasi che utilizza la forza motrice protonica per sintetizzare l'ATP come verrà descritto in dettaglio più avanti.

Il Complesso I, o NADH deidrogenasi, è un enzima di grandi dimensioni contenente più di 42 catene peptidiche diverse e contenente almeno sei centri ferro-zolfo, e catalizza il trasferimento di due elettroni dal NADH all'ubichinone (Q) (Figura 2.2b). Il primo passaggio del trasporto elettronico sposta due elettroni dal NADH al flavin mononucleotide (FMN), il gruppo prostetico di questo enzima; i due elettroni, attraversano poi diversi centri ferro-zolfo, passando alla proteina ferro-zolfo N-2 caratterizzata da una struttura  $Fe_4-S_4$ . Il centro N-2 è considerato il donatore diretto di elettroni all'ubichinone che si riduce a ubichinolo ( $QH_2$ ), in grado di diffondere all'interno del doppio strato lipidico (Lenaz et al. 2006). Questo trasferimento di elettroni porta all'espulsione dalla matrice di quattro protoni per ogni coppia di elettroni. La struttura del Complesso I è ancora poco nota, il microscopio elettronico ha finora mostrato una forma ad L con un braccio immerso nella membrana mitocondriale interna e l'altro orientato verso la matrice.



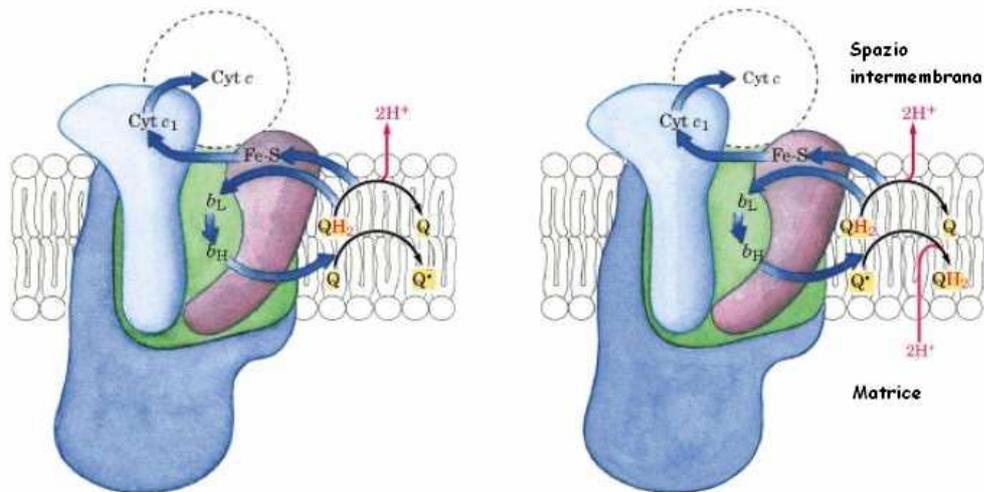
**Figura 2.2b:** Struttura e trasporto elettronico del complesso I

(Modificato da: <http://courses.cm.utexas.edu/emarcotte/ch339k/fall2005/FinalReview.html>)

Il Complesso II, o succinato Q reduttasi, è un enzima appartenente al ciclo dell'acido citrico e catalizza l'ossidazione del succinato a fumarato con la formazione di  $\text{FADH}_2$ ; questo poi non lascia il complesso, ma i suoi elettroni vengono trasferiti ai centri ferro-zolfo e all'ubichinone. Il Complesso II, composto da due subunità transmembrana e due subunità che si estendono all'interno della matrice, guida gli elettroni dal succinato al FAD, quindi attraverso i centri Fe-S fino all'ubichinone in grado di legarsi ad una delle subunità transmembrana attraverso un apposito sito di legame.

Altri elettroni possono raggiungere l'ubichinone tramite l'ossidazione di substrati che non coinvolgono i complessi della catena respiratoria: ad esempio il glicerolo 3-fosfato formato sia nella degradazione degli acidi grassi sia durante la glicolisi, e l'Acetil CoA formato nella prima tappa della  $\beta$  ossidazione, tramite le loro rispettive deidrogenasi cedono elettroni all'ubichinone.

Il Complesso III, o citocromo reduttasi, è un complesso che accoppia il trasferimento degli elettroni dall'ubichinolo al citocromo c con il trasporto di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana. La struttura del Complesso III è formata da un dimero costituito da monomeri identici ciascuno di 11 subunità.

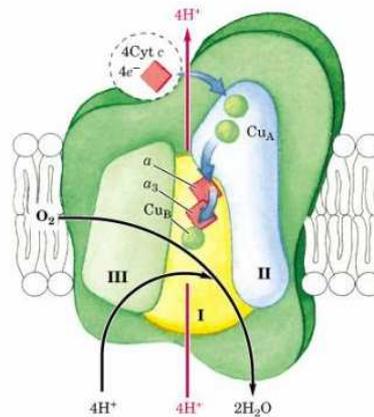


**Figura 2.2c:** Tappe del ciclo dell'ubichinone  
 (Modificato da: <http://courses.cm.utexas.edu/emarcotte/ch339k/fall2005/FinalReview.html>)

Grazie alla determinazione cristallografica ai raggi X e agli studi biochimici sulle reazioni redox è stato possibile elucidare il meccanismo di trasferimento degli elettroni e dei protoni attraverso il complesso. Questo meccanismo, definito ciclo dell'ubichinone può essere descritto in due tappe mostrate in Figura 2.2c dove per semplicità è mostrato un unico monomero. Nella prima tappa una molecola di  $QH_2$  cede un elettrone ad un centro ferro-zolfo che a sua volta lo trasferisce al citocromo  $c_1$  e al citocromo  $c$ , proteina solubile dello spazio intermembrana. L'ubichinololo ossidato ad anione semichinone ( $Q^{\cdot -}$ ) dalla perdita dell'elettrone trasferisce, ossidandosi a  $Q$ , il suo elettrone rimanente a due diversi citocromi ( $b_L$  e  $b_H$ ), che hanno diversa affinità per gli elettroni. L'eme  $b_H$  a sua volta riduce un  $Q$  legato vicino al versante citosolico formando  $Q^{\cdot -}$ . Nella seconda tappa un secondo  $QH_2$  reagisce allo stesso modo del primo cedendo un elettrone al citocromo  $c$  e un altro ai gruppi eme del citocromo  $b$ . Il citocromo  $b_H$  trasferisce l'elettrone al  $Q^{\cdot -}$  formatosi nella prima tappa e generando così un nuovo  $QH_2$ . Nonostante la via seguita dal flusso elettronico di questo segmento della catena respiratoria sia molto complessa la reazione redox complessiva vede un  $QH_2$  ossidato a  $Q$  con il rilascio netto di due protoni nello spazio intermembrana e due citocromo  $c$  ridotti.

Il Complesso IV, o citocromo ossidasi, è l'ultima struttura della catena respiratoria che trasporta gli elettroni dal citocromo  $c$  all'ossigeno molecolare riducendolo ad  $H_2O$  (Figura 2.2d). Il trasferimento degli elettroni attraverso la citocromo ossidasi procede dal citocromo  $c$  al centro binucleare  $Cu_A$  della subunità II,

dopo di che gli elettroni passano al gruppo eme *a*, della subunità I, e al centro binucleare Fe-Cu formato da un gruppo eme ( $a_3$ ) e uno ione rame ( $Cu_B$ ). Infine gli elettroni raggiungono l'ossigeno (Hosler et al. 2006).



**Figura 2.2d:** Trasporto di elettroni attraverso il Complesso IV

(Modificato da: <http://courses.cm.utexas.edu/emarcotte/ch339k/fall2005/FinalReview.html>)

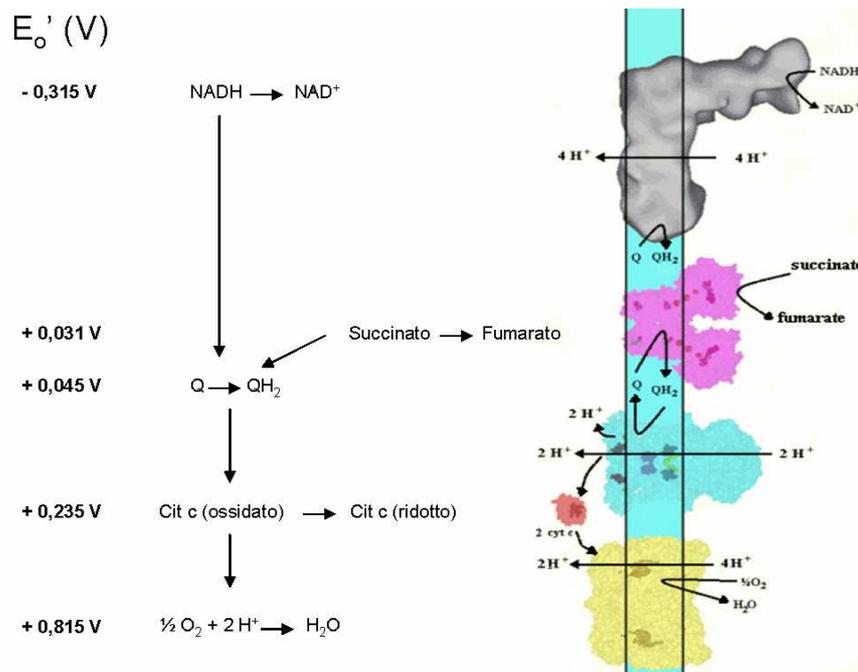
Ogni volta che quattro elettroni attraversano questo complesso, l'enzima preleva quattro ioni  $H^+$  dalla matrice per convertire l' $O_2$  in due molecole di acqua. Il complesso utilizza l'energia di questa reazione redox per pompare un protone nello spazio intermembrana per ogni elettrone che lo attraversa, aumentando ulteriormente il potenziale elettrochimico prodotto dal trasporto protonico attraverso i Complessi I e III. La strategia per la riduzione dell'ossigeno molecolare della citocromo ossidasi ha lo scopo di non rilasciare intermedi dell'ossigeno parzialmente ridotti, come il perossido di idrogeno o i radicali liberi ossidrilici, specie molto reattive che potrebbero danneggiare la struttura della cellula. Per questo gli intermedi restano strettamente legati al centro Fe-S del gruppo  $a_3$ - $Cu_B$  del complesso finché non vengono completamente convertiti in acqua (Stryer 1996).

Il gradiente protonico ottenuto dal trasferimento elettronico costituisce la forza motrice protonica: quando i protoni fluiscono spontaneamente nella direzione del loro gradiente elettrochimico questa energia viene resa disponibile per la produzione di ATP.

Tutte le molecole trasportatrici di elettroni che partecipano alla catena respiratoria possono esistere in due stati: ossidato e ridotto (coppie redox). Nella catena respiratoria tali coppie sono ordinate secondo un potenziale redox crescente (potenziale di riduzione) (Figura 2.2e). All'inizio della catena respiratoria viene posta la coppia redox  $NAD^+/NADH$  e alla fine la coppia  $O_2/H_2O$ . Il trasferimento di elettroni dal  $NADH$  e dal

FADH<sub>2</sub> all'ossigeno risulta quindi termodinamicamente spontaneo con una differenza di potenziale totale pari a 1,13 Volt. L'energia libera ottenuta da questo processo viene utilizzata per formare il gradiente protonico.

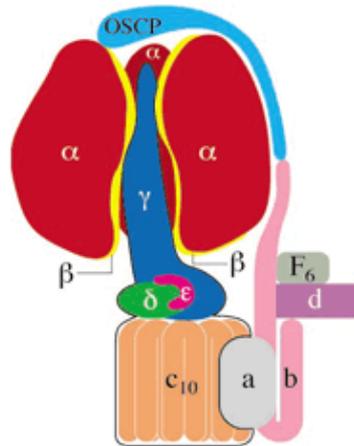
Fino a qualche anno fa la visione più accreditata della catena respiratoria considerava i complessi come entità disperse nel doppio strato lipidico collegati funzionalmente dalla diffusione dei componenti a basso peso molecolare. Recenti studi strutturali e cinetici favoriscono invece una organizzazione almeno in parte in stato solido, sotto forma di supercomplessi con channeling diretto degli elettroni tra tutti i costituenti senza distinzione tra fissi e mobili. Tali studi suggeriscono che il complesso I e il Complesso III formino un supercomplesso funzionale e stabile con rapporto Complesso I:Complesso III 1:2. Questo supercomplesso sembra poi fare parte di un supercomplesso maggiore, detto respirasoma, che comprende anche il Complesso IV (Lenaz et al. 2006).



**Figura 2.2e:** Sequenza dei trasportatori di elettroni all'interno della catena respiratoria con relativi potenziali redox. Il simbolo  $E_o'$  si riferisce ai potenziali calcolati a pH 7. (Modificato da <https://netfiles.uiuc.edu/slhee/www/picture/respiratory.gif>)

## 2.2a ATP sintasi/ATPasi

La proteina enzimatica che utilizza la forza motrice protonica per sintetizzare ATP è l'ATP sintasi. La reazione inversa, cioè l'idrolisi di ATP per ottenere energia, può essere operata dal medesimo complesso nella sua funzione di ATPasi. Anche per questo complesso, considerato specificatamente nella presente ricerca come possibile bersaglio dell'effetto di contaminanti ambientali, non sono riportati finora in letteratura dati riguardanti i Molluschi. La maggior parte degli studi condotti su questo enzima coinvolgono principalmente Mammiferi, lieviti e batteri. La descrizione che segue si riferisce a quanto è stato accertato nei Mammiferi. L'ATP sintasi costituisce un grande complesso enzimatico della membrana interna mitocondriale ed formato da due subunità:  $F_1$ , una proteina periferica della membrana e  $F_0$ , una proteina integrale della membrana, collegate tra loro da un stelo centrale e da uno stelo periferico (Figura 2.2f).



**Figura 2.2f:** Rappresentazione schematica della ATP sintasi

(Da <http://www.photoscience.la.asu.edu/photoyn/photoweb/cosbfig1a.gif>)

Il complesso  $F_1$  è costituito da nove subunità di cinque tipi diversi, con la composizione  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ . Le tre subunità  $\alpha$  e  $\beta$  sono disposte in modo alternato formando una specie di sfera schiacciata, la subunità  $\gamma$  è costituita da due domini, uno che attraversa tutto il complesso  $F_1$ , mentre un altro è associato ad una delle subunità  $\beta$ . Le strutture delle subunità  $\epsilon$  e  $\delta$  non sono state determinate, al pari delle altre, da studi cristallografici, ma costituiscono insieme a  $\gamma$  lo stelo centrale che unisce  $F_1$  e  $F_0$ . Ciascuna delle tre subunità  $\beta$  ha un sito catalitico per la sintesi di ATP; anche se le tre subunità hanno sequenze amminoacidiche identiche, le loro conformazioni differiscono, in parte a causa dell'associazione della subunità  $\gamma$  con una sola delle tre. Come vedremo più avanti queste differenze conformazionali si riflettono a livello dei loro siti di legame

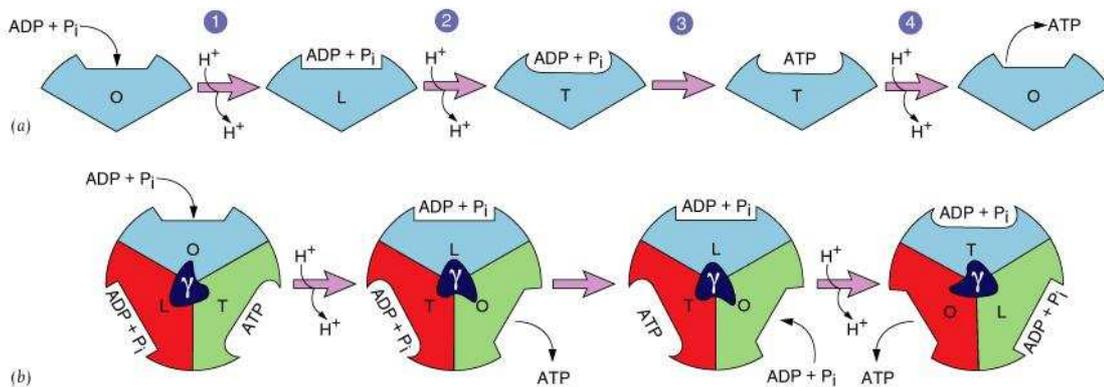
con ATP e ADP e quindi sono essenziali per il meccanismo di sintesi dell'ATP. La porzione  $F_1$  dell'ATP sintasi è in grado da sola di catalizzare l'idrolisi dell'ATP, ma non la sintesi (Solaini et al. 1997).

Il complesso  $F_0$  costituisce il canale protonico dell'enzima, è composto da tre subunità: a, b e c. La subunità c, presente in numero di 10 unità, è un piccolo polipeptide molto idrofobico costituito quasi interamente da due eliche transmembrana. Le subunità c si associano tra di loro con le eliche perpendicolari al piano della membrana formando un cerchio che si associa saldamente con la subunità  $\gamma$ .

Lo stelo periferico unisce la subunità a di  $F_0$  alla superficie esterna del dominio  $F_1$  ed è costituito da: una subunità b che si lega alla subunità a, una subunità d, e una subunità di OSCP (subunità che attribuisce all'enzima la sensibilità all'oligomicina), che si ancora all'N-terminale della subunità  $\alpha$  di  $F_1$  (Carbajo et al. 2005).

Il meccanismo d'azione dell'ATP sintasi è stato proposto per la prima volta da Paul Boyer; secondo questo modello, tuttora riconosciuto valido, un meccanismo di catalisi rotazionale porta alla sintesi di ATP catalizzata a turno sui tre siti attivi delle subunità  $\beta$  di  $F_1$ . Secondo questo modello i protoni entrano in un semicanale della subunità a e qui protonano gli ioni carbossilato del residuo Asp61 appartenente alla subunità c che diventando neutro è in grado di muoversi attraverso il doppio strato lipidico, il che permette la rotazione dell'anello di subunità c. Avvenuta la rotazione i protoni vengono rilasciati in un altro semi canale, comunicante con la matrice, grazie all'interazione con le catene terminali di tre residui amminoacidici della subunità a: His245, Glu219 e Arg210. La rotazione dell'anello costituito dalle subunità c porta ad una rotazione concertata della subunità  $\gamma$ , responsabile del cambiamento conformazionale dei siti attivi che guida la formazione e il rilascio dell'ATP (Nagyvary e Bechert 1999).

Il modello per la sintesi dell'ATP è schematizzato in Figura 2.2g: nella tappa 1 una subunità  $\beta$  inizia il ciclo di catalisi nella sua conformazione O, cataliticamente inattivo e caratterizzata da una bassa affinità per i substrati; il flusso protonico fornisce l'energia necessaria per la conversione dalla conformazione O in quella L che lega debolmente i substrati ed è a sua volta inattiva. L'ulteriore passaggio di protoni permette il cambiamento conformazionale della subunità  $\beta$  da L a T (tappa 2) che lega saldamente i substrati e catalizza la formazione di ATP (tappa 3). A questo punto il ciclo si chiude con l'ultimo cambiamento conformazionale dalla forma T alla O che avendo bassa affinità per l'ATP lo rilascia nella matrice mitocondriale (tappa 4).

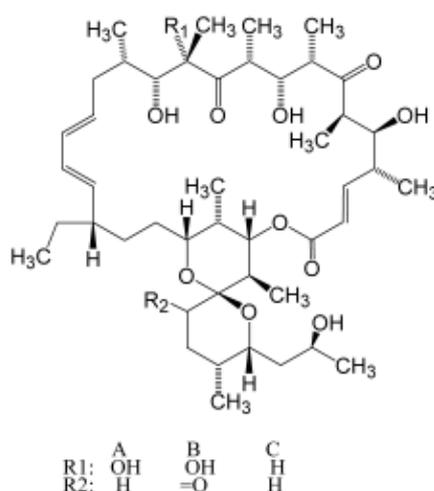


**Figura 2.2g:** Meccanismo di formazione dell'ATP

Ogni rotazione dell'anello di subunità c di  $120^\circ$  pone in contatto la subunità  $\gamma$  con una diversa subunità  $\beta$  e la costringe ad assumere la conformazione O. In questo modo per ogni rotazione di  $\gamma$  ogni subunità  $\beta$  compie un ciclo attraverso le tre possibili conformazioni e vengono rilasciate tre molecole di ATP. Un importante cofattore della sintesi di ATP durante il ciclo appena descritto è il catione  $Mg^{2+}$ : quando questo non è legato all'ADP, infatti, non si riscontra l'asimmetria strutturale dei siti catalitici. Sembra infatti che il  $Mg^{2+}$  giochi un ruolo fondamentale inducendo un cambiamento conformazionale della subunità  $\beta$  dallo stato L in uno stato di transizione intermedio che porta all'espulsione di una molecola d'acqua e al corretto allineamento di ADP e Pi nel sito catalitico per permettere la sintesi di ATP (Ko et al. 1999).

La regolazione della ATP sintasi è strettamente correlata alla catena respiratoria mitocondriale e alla necessità energetica della cellula. Quando nella cellula si ha consumo di ATP la velocità della fosforilazione ossidativa aumenta, mentre quando la conversione di ADP in ATP abbassa considerevolmente la concentrazione di ADP, il meccanismo di controllo dell'accettore fa diminuire il trasporto di elettroni e la fosforilazione ossidativa. Come per tutti gli enzimi di membrana, particolarmente importante è la modulazione dell'attività enzimatica operata dal microambiente lipidico. Gli animali acquatici pecilotermi si adattano in generale a variazioni termiche ambientali modificando la composizione di acidi grassi del doppio strato lipidico, generalmente aumentando l'insaturazione al diminuire della temperatura ambientale (adattamento omeoviscoso) (Pernet et al. 2006). Tale variazione di composizione e quindi di fluidità si può riflettere in una modificazione delle attività enzimatiche di membrana, attraverso modificazioni conformazionali della struttura enzimatica (Cornelius 2001). L'aumento dell'attività della ATP sintasi in carpe acclimatate alle basse temperature è stato infatti messo in relazione ad un aumento degli acidi grassi

insaturi della membrana quindi alla sua fluidità (Itoi et al. 2003). Anche se il meccanismo di interazione tra ambiente lipidico ed enzima non è stato completamente chiarito, sembra che l'incorporazione di colesterolo nella membrana mitocondriale induca un aumento dell'attività ATPasica. Il medesimo risultato ottenuto sia in mitocondri di pesci (Sørensen 1986) che di mammiferi (Calanni Rindina et al. 1986) sembra sia raggiunto tramite un cambiamento conformazionale trasmesso dalla membrana alla porzione F<sub>1</sub> dell'enzima..



**Figura 2.2h:** Struttura dell'oligomicina

L'antibiotico oligomicina (Figura 2.2h) viene considerato inibitore specifico dell'ATP sintasi mitocondriale che viene infatti denominata OS-ATPasi (oligomycin-sensitive). L'oligomicina sembra avere più siti di legame per la ATP sintasi; studi su mitocondri umani e di ratto hanno mostrato infatti che l'oligomicina è in grado di legarsi sia alla porzione OSCP della porzione F<sub>1</sub>, ma anche alla porzione F<sub>0</sub> in cui sarebbero coinvolti aminoacidi della subunità a (Sook-Bae e Berdanier 1999). Matsuno-Yagi e Hatefi (1993) propongono che l'oligomicina interagendo con la subunità F<sub>0</sub> blocchi il trasferimento di protoni attraverso la membrana mitocondriale e di conseguenza il trasferimento di energia tra F<sub>0</sub> e F<sub>1</sub>.

Verificare l'effetto di contaminanti organostannici su questo complesso enzimatico nei Molluschi Bivalvi, uno degli obiettivi della presente ricerca, è stato suggerito dal fatto che l'effetto tossico dei composti organostannici sulla fosforilazione ossidativa mitocondriale è noto da diversi anni (Emanuel et al. 1984). Molti studi sperimentali hanno mostrato infatti la loro tossicità, in particolare delle specie trisostituite, cioè quei composti in cui lo stagno è legato con tre gruppi alchilici o acrilici, su batteri, lieviti e Mammiferi (Bragadin et al. 2003). I composti organostannici

trisostituiti sono in grado di interagire con la fosforilazione ossidativa a diversi livelli; ad esempio causando l'inibizione della ATP sintasi, e l'interazione con la membrana mitocondriale con l'annullamento del gradiente chemiosmotico che guida la sintesi di ATP. La provata azione disaccoppiante del TBT (Connerton e Griffiths 1989), sembra infatti dovuta alla sua capacità di attraversare la membrana mitocondriale come catione  $TBT^+$  senza necessità di trasportatori di membrana (Bragadin et al. 2003). Non solo i composti organostannici trisostituiti sono in grado di interagire con la fosforilazione ossidativa, anche il DBT è infatti stato dimostrato essere un forte inibitore dell'ATP sintasi (Cain et al. 1977). I composti organostannici trisostituiti sembrano interagire con l'ATP sintasi attraverso la subunità  $F_o$  bloccando il trasferimento di protoni attraverso la membrana (Hunziker et al. 2002; Papa 1982), mentre l'attività ATPasica della subunità  $F_1$  è completamente insensibile a questi composti (Ueno et al. 2005). Alcuni autori hanno proposto che il sito di legame del TBT con questo complesso enzimatico si trovi all'interno del canale per la traslocazione dei protoni della subunità a al quale si legherebbe attraverso legami non covalenti (von Ballmoos et al. 2004). Secondo Ueno et al. (2005) il legame del TBT interferirebbe con la traslocazione dei protoni attraverso l'inibizione della rotazione della porzione  $F_o$  dell'enzima.

## 3. Inquinanti ambientali

### 3.1 Azoto ammoniacale

#### 3.1a Caratteristiche chimico-fisiche

L'azoto oltre ad essere il maggior costituente dell'atmosfera (78 % v/v), rappresenta uno dei macrocostituenti degli organismi viventi. Nell'acqua di mare, oltre che nella sua forma elementare  $N_2$  e in forma di composti organici azotati, è presente anche sotto forma di composti inorganici, nitrati ( $NO_3^-$ ), nitriti ( $NO_2^-$ ) e infine azoto ammoniacale nelle due forme ione ammonio ( $NH_4^+$ ) e ammoniaca ( $NH_3$ ).

Le due diverse specie chimiche dell'azoto ammoniacale,  $NH_4^+$ , e  $NH_3$ , sono tra loro interconvertibili secondo la reazione acido-base:

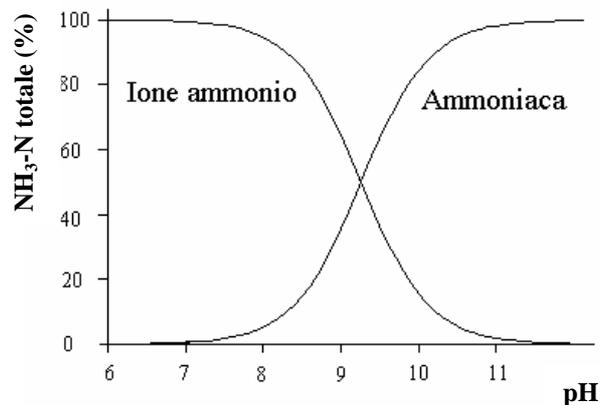


Per la quale si può esprimere la costante di equilibrio  $K_{eq}$ :

$$K_{eq} = \frac{[NH_3] [H^+]}{[NH_4^+]}$$

Alla temperatura di 20°C la costante di equilibrio risulta essere uguale a  $4 \cdot 10^{-10}$ ; questo valore molto piccolo indica che l'equilibrio della reazione acido-base è fortemente spostato a sinistra e quindi la forma predominante in soluzione acquosa è lo ione ammonio, almeno in condizioni di pH vicino alla neutralità o moderatamente alcalini.

Alcuni fattori ambientali influenzano le proporzioni relative di azoto sotto forma di ammoniaca e di ione ammonio in soluzione: tra questi principalmente il pH e la temperatura. Il pH influenza direttamente la reazione sopra riportata in quanto  $H^+$  compare tra i prodotti, e quindi, una sua diminuzione, ovvero un aumento della concentrazione di ioni  $H^+$ , favorisce la formazione di ione ammonio e viceversa. Pertanto, quanto più alcalino è il pH, tanto maggiore è il contributo della forma  $NH_3$  sull'azoto ammoniacale totale. Tuttavia, come si può osservare dalla Figura 3.1a1 solo per pH fortemente alcalini (>9) il contributo della forma  $NH_3$  diventa prevalente. Questo significa che in condizioni naturali in ambiente marino, caratterizzato da pH superiori a 7, il 99% dell'ammonio è presente come  $NH_4^+$  (Ip et al. 2006), come anche a pH fisiologici la forma  $NH_4^+$  è sempre prevalente.



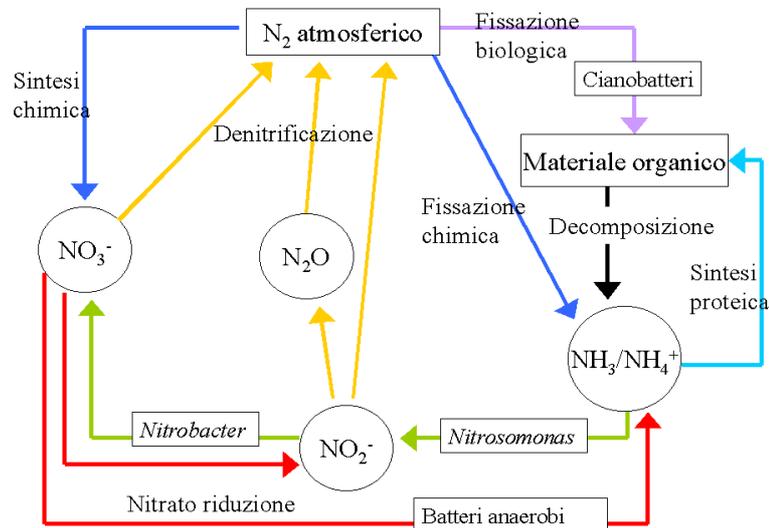
**Figura 3.1a1:** Speciazione chimica dell'azoto ammoniacale in funzione del pH  
(Modificato da: <http://www.sws.uiuc.edu/nitro/nspecies.asp>)

**L'aumento della temperatura, che si esplica direttamente sulla costante di equilibrio, porta a favorire la formazione di ammoniaca (Morris 1987). All'aumentare della salinità, per effetto dell'aumento della forza ionica, la concentrazione dell'ammoniaca diminuisce (Emerson 1975), mentre aumenta quella di  $\text{NH}_4^+$ . A causa della combinazione di questi effetti, è stato dimostrato un aumento della quota di  $\text{NH}_4^+$  rispetto all'azoto ammoniacale totale all'aumentare della salinità tra 5 e 25°C (Johansson e Wedborg 1980). Si osserva tuttavia che l'effetto della salinità sull'equilibrio  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  è molto meno rilevante quantitativamente rispetto a quello esercitato dal pH e della temperatura.**

### 3.1b Esposizione e accumulo

I composti azotati in generale rientrano tra i costituenti non conservativi dell'acqua di mare, in quanto subiscono notevoli variazioni quantitative, sia complessive che dei rapporti reciproci tra i vari derivati presenti, a seconda delle condizioni ambientali e in dipendenza di svariati fattori (apporti fluviali ecc.). Generalmente i nitrati predominano, sul fondo, mentre nei primi 100 metri di profondità si possono trovare anche notevoli quantità di ammoniaca e di nitriti formati dalle attività biologiche. Tutte le forme organiche ed inorganiche sotto cui si presenta

l'azoto sono legate tra di loro attraverso il ciclo dell'azoto (Figura 3.1b1) che, attraverso la fissazione chimica e biologica dell' $N_2$ , nitrificazione, denitrificazione e decomposizione della materia organica, interconverte i diversi composti azotati tra di loro.



**Figura 3.1b1:** Ciclo dell'azoto

Le concentrazioni di questi composti azotati inorganici nel mare oscillano generalmente all'interno dei seguenti intervalli di valori (Cognetti 1992):

$$NO_3^- = 1 - 600 \mu\text{g/L}$$

$$NO_2^- = 0 - 15 \mu\text{g/L}$$

$$NH_3\text{-N} (NH_3 + NH_4^+) = 30 - 200 \mu\text{g/L}$$

Particolare interesse rivestono, ai fini della presente ricerca, i processi chimico-biochimici che portano alla produzione di azoto ammoniacale nelle due forme  $NH_3/NH_4^+$ , della cui interazione con alcune attività enzimatiche di membrana ci si occupa specificamente.

L'azoto ammoniacale entra nel ciclo dell'azoto attraverso diverse fonti: l'escrezione dei cataboliti azotati degli organismi marini, la decomposizione della sostanza organica ad opera dei batteri, la fissazione dell'azoto molecolare, il dilavamento dei terreni concimati con fertilizzanti azotati e infine gli scarichi agro-industriali. Nell'ambiente l'ammonio tende ad essere ossidato a nitrato in due tappe da batteri aerobi obbligati; quelli del genere *Nitrosomonas* operano la trasformazione dell'ammoniacale a nitrito, mentre il genere *Nitrobacter* interviene nell'ossidazione del nitrito a nitrato. Nell'ambiente naturale la nitrificazione è un processo molto importante,

poiché trasforma l'azoto ammoniacale in forme più assimilabili: l'azoto infatti viene assorbito dalle piante principalmente come nitrato. In ambiente acquatico tale processo contribuisce a rimuovere l'ammoniaca dall'acqua, convertendo l'azoto ammoniacale in nitriti e nitrati, che rientrano tra i cosiddetti nutrienti, cioè sali necessari per lo sviluppo e la crescita della flora algale e di microrganismi. In condizioni di anossia alcuni batteri anaerobi possono usare i nitrati, in cui l'azoto ha il suo massimo numero di ossidazione e cioè +5, come accettori di elettroni; la più completa riduzione possibile comporta la conversione ad ammoniaca in cui l'azoto ha numero di ossidazione-3.

**Nel considerare i contenuti relativi delle due forme di azoto ammoniacale e quello complessivo nell'ambiente marino, occorre tenere presente i diversi effetti precedentemente descritti sull'equilibrio chimico e fattori ecologici tipici dei diversi ambienti. Nei nostri mari e in particolare nell'Adriatico settentrionale da cui provengono i molluschi bivalvi utilizzati nella presente ricerca, si hanno, soprattutto nelle zone costiere in corrispondenza delle foci dei fiumi, variazioni di salinità che, nelle acque superficiali e in bacini poco profondi, possono diventare consistenti, anche in dipendenza della diversa piovosità nei vari periodi dell'anno (ARPA-Regione Emilia Romagna 2002). Nelle zone costiere, interessate tra l'altro, dall'allevamento di alcune specie di molluschi bivalvi, la variabilità della concentrazione complessiva di azoto ammoniacale è in genere molto alta e strettamente legata a una varietà di fattori quali: gli apporti fluviali, quelli derivanti dagli insediamenti costieri, e infine, in particolare nelle aree destinate ad acquacoltura, la densità di animali acquatici, in genere tutti ammoniotelici. Nelle acque di fondo invece l'azoto ammoniacale si origina principalmente dalla mineralizzazione e sedimentazione della sostanza organica. In particolar modo nella stagione estiva, in presenza di una marcata stratificazione ed elevate temperature delle acque, e in concomitanza con condizioni anossiche, si possono avere nelle acque di fondo valori di azoto ammoniacale superiori a quelli rilevati nelle acque superficiali (ARPA-Regione Emilia Romagna 2002). Vale la pena ricordare che in periodi di**

**eutrofizzazione e in quelli immediatamente successivi si verifica una concomitanza di condizioni quali scarsità di ossigeno e forte aumento della biomassa, quindi del materiale organico in decomposizione, che favoriscono l'accumulo di ammoniaca. Nel mare Adriatico si evidenzia una tendenza generale alla diminuzione dell'azoto ammoniacale passando dalla costa al largo e da Nord verso Sud (ARPA-Regione Emilia Romagna 2002); tale andamento è legato al maggior ricambio d'acqua e alla dispersione degli apporti fluviali in fondali poco profondi.**

**Dall'insieme di osservazioni sopra riportate risulta chiaramente che, per tutta una serie di fattori, popolazioni di animali marini sedentari quali i molluschi bivalvi, specie negli ambienti d'allevamento, sono in condizioni naturali potenzialmente esposti in diversi periodi del loro ciclo vitale a questo contaminante.**

### **3.1c Tossicità**

L'azoto ammoniacale, nelle sue due forme  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ , è una sostanza tossica per gli animali (Russo 1985), ovvero in grado di produrre un effetto sui sistemi biologici danneggiando seriamente la loro struttura e le loro funzioni o causando la morte dell'organismo. Dal momento che l'azoto ammoniacale rappresenta il contaminante principale negli ambienti di acquicoltura, la sua tossicità ed i meccanismi accertati o ipotizzati della sua azione tossica sono stati largamente studiati negli animali acquatici, mentre i molluschi bivalvi, di cui ci occupiamo nella presente ricerca non rientrano tra i gruppi tassonomici maggiormente considerati.

Come per tutte le sostanze, la tossicità dell'azoto ammoniacale dipende dalla concentrazione, dalla durata e dalle condizioni di esposizione, dalla specie e dallo stadio vitale dell'organismo considerato.

**La tossicità di questo contaminante è stata tradizionalmente attribuita alla forma  $\text{NH}_3$ , che essendo una molecola neutra e lipofila, è in grado di diffondere attraverso le membrane epiteliali degli organismi acquatici molto più facilmente dello ione ammonio, di cui**

risulta quindi maggiormente tossica (Russo 1985). Tuttavia sembra ragionevole pensare che anche lo ione  $\text{NH}_4^+$  possa avere un ruolo nel determinare la tossicità complessiva dell'azoto ammoniacale.

Recentemente alcuni studi hanno infatti evidenziato il coinvolgimento della forma prevalente  $\text{NH}_4^+$  nel determinare la tossicità dell'azoto ammoniacale (Kater et al. 2006).

Diversi effetti ambientali possono influire sulla tossicità dell'azoto ammoniacale negli animali acquatici. In Figura 3.1c1 è riportato un andamento teorico della tossicità rispetto al pH, dove la tossicità dell'azoto ammoniacale viene espressa in termini di valori di concentrazione tossica. Si nota che all'aumentare del pH la concentrazione tossica totale di azoto ammoniacale necessaria per ottenere un effetto acuto diminuisce; questo è legato al rapporto  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  che, come abbiamo visto, è influenzato dal pH con prevalenza della forma maggiormente tossica  $\text{NH}_3$  a  $\text{pH} = 9,5$  a  $20^\circ\text{C}$  (Emerson et al. 1975). Diverse sperimentazioni infatti hanno dimostrato che la tossicità acuta dell'azoto ammoniacale totale aumenta con l'aumentare del pH sia nei pesci (Camargo e Alonso 2006), che negli invertebrati acquatici (Hickey e Martin 1999); quindi a pH più alti, per ottenere gli stessi effetti tossici, sono necessarie concentrazioni minori di azoto ammoniacale.

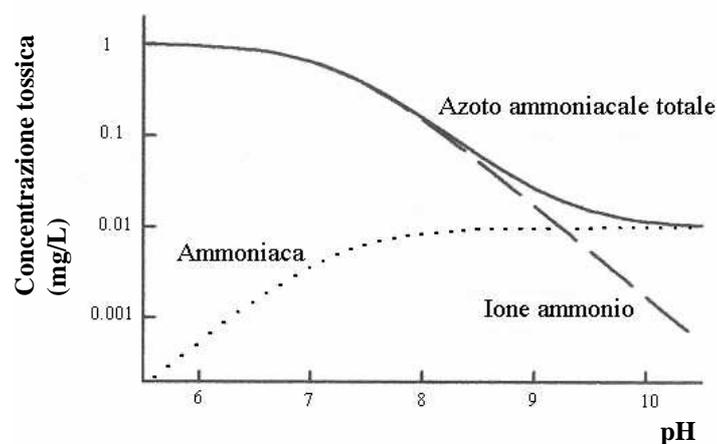


Figura 3.1b: Tossicità dell'azoto ammoniacale in dipendenza del pH (Modificata da: EPA 1999)

**Similarmente l'aumento della temperatura, favorendo l'aumentare della concentrazione di ammoniaca, fa aumentare la tossicità dell'azoto ammoniacale. Arthur et al. (1987) hanno infatti evidenziato una notevole tolleranza degli invertebrati all'azoto ammoniacale a basse temperature. I meccanismi che regolano il rapporto temperatura-tossicità non sono noti, ma è stato ipotizzato che la temperatura possa alterare la tossicità dell'azoto ammoniacale attraverso un effetto sulla permeabilità delle membrane, sulla produzione endogena di ammoniaca e/o su altri processi biochimico-fisiologici.**

**L'interazione tra ammoniaca e ossigeno disciolto è un altro importante fattore nel determinare la tossicità dell'ammonio in ambiente acquatico. Alcuni ricercatori studiando diverse specie di pesci hanno osservato che la tossicità acuta dell'azoto ammoniacale aumenta quando i livelli di ossigeno disciolto diminuiscono (Thurston et al. 1981). Una forte diminuzione del contenuto di ossigeno (ipossia o anossia), infatti, crea condizioni ambientali riducenti che favoriscono la formazione di  $\text{NH}_3$ .**

**Altri fattori sinergici possono poi influenzare la tossicità dell'azoto ammoniacale: il calcio (aggiunto come  $\text{CaCl}_2$ ) ha mostrato di avere un effetto protettivo sulla tossicità mostrata dall'azoto ammoniacale in alcune specie di pesci (Tomasso et al. 1980; Weirich et al. 1993); tale effetto è stato correlato alla capacità del calcio di diminuire la permeabilità delle membrane e di ridurre anche la tossicità di altri metalli (McDonald et al. 1989). La diminuzione della permeabilità di membrana delle branchie potrebbe diminuire o ritardare gli effetti sulla regolazione ionica, che potrebbe essere una delle cause che contribuiscono alla tossicità dell'azoto ammoniacale (Tomasso et al. 1980).**

Diversi meccanismi biochimici, alcuni dei quali ancora non del tutto chiariti, sono stati chiamati in causa per spiegare la tossicità dell'azoto ammoniacale negli organismi animali.

Uno dei meccanismi più generali riguarda l'incorporazione di  $\text{NH}_3$  per la formazione di amminoacidi: questo processo sottrae chetoacidi (specialmente  $\alpha$ -chetoglutarato) al ciclo di Krebs e quindi provoca diminuzione della produzione di energia; si accumulano così amminoderivati quali glutammato, glutammina e  $\gamma$ -amminobutirrato che hanno effetti tossici sul sistema nervoso (Lehninger et al. 1994).

Un secondo meccanismo si basa sul fatto che l'ammoniaca, essendo in grado, come molecola neutra e lipofila, di attraversare le membrane, formando  $\text{NH}_4^+$  può dissipare il gradiente protonico e quindi agire come disaccoppiante della fosforilazione ossidativa mitocondriale, con conseguente diminuzione della produzione di ATP a livello della catena respiratoria.

Mentre l'ammoniaca è in grado di attraversare le membrane, lo ione ammonio necessita di un trasportatore; negli animali acquatici, in cui sono state riscontrate due ATPasi Na-dipendenti nella membrana plasmatica (Proverbio et al. 1981, Borgatti et al 1985), lo ione ammonio è stato dimostrato poter sostituire come catione attivante il  $\text{K}^+$  nella Na,K-ATPasi e il  $\text{Na}^+$  nella  $\text{Na}^+$ -ATPasi sia in pesci (Ventrella et al. 1987) che in molluschi marini (Ventrella et al. 1992a) e d'acqua dolce (Lagerspetz et al. 1992). In questo modo l'ingresso dell' $\text{NH}_4^+$  potrebbe portare ad un aumento dell'incorporazione dell'azoto ammoniacale nei tessuti, se la concentrazione esterna è sufficientemente alta, e quindi contribuire in modo significativo a determinare la tossicità complessiva dell'azoto ammoniacale.

Indubbiamente, per effetto di un aumento della concentrazione extracellulare di azoto ammoniacale si possono produrre alterazioni degli equilibri ionici intracellulari. Questo aspetto è particolarmente rilevante nel tessuto nervoso, dove l'alterazione del gradiente ionico

**transmembrana è stata correlata alla neurotossicità dell'azoto ammoniacale (Randall e Tsui 2002). In tutti i tessuti inoltre l'alterazione del gradiente di sodio tra i compartimenti intra- ed extracellulare può comportare gravi ripercussioni sui processi biochimici e fisiologici legati a tale gradiente.**

**Nelle branchie di granchio l'attività Na,K-ATPasica è modulata da  $\text{NH}_4^+$  indipendentemente da  $\text{K}^+$  (Masui et al. 2002), e l'idrolisi dell'ATP viene stimolata sia in crostacei eurialini (Masui et al. 2005) che di acqua dolce (Furriel et al. 2004). La capacità dell' $\text{NH}_4^+$  di legarsi alla Na,K-ATPasi nello stesso sito di legame per il substrato naturale  $\text{K}^+$  è stata generalmente attribuita al fatto che i due ioni idratati hanno diametro simile, anche se sembra accertato che il legame con il complesso enzimatico avvenga nella forma parzialmente o completamente deidratata (Jorgensen et al. 2003). Il coinvolgimento di questo meccanismo, nel determinare la tossicità dell'azoto ammoniacale, è stato postulato anche in linee cellulari di topo (Martinelle e Haggstrom 1993). Tuttavia le differenti cinetiche evidenziate nell'interazione tra ione ammonio e Na,K-ATPasi in branchie di granchio rispetto ai Mammiferi suggeriscono che la risposta dell'enzima all'azoto ammoniacale possa essere differente nei vari taxa (Masui et al. 2005).**

**Un meccanismo per il trasporto attivo dello ione ammonio attraverso l'epitelio delle branchie di pesci teleostei (Randall e Tsui 2002; Wood 1993) prevede il coinvolgimento di due ATPasi di membrana, la Na,K-ATPasi basolaterale e una Na,H-ATPasi apicale, che trasportano lo ione ammonio rispettivamente in sostituzione di  $\text{K}^+$  e di  $\text{H}^+$ . Studi sul crostaceo *Carcinus maenas* (Santer e Phillips 2002; Weihrauch et al. 2002) hanno evidenziato un trasporto attivo equivalente dell' $\text{NH}_4^+$  mediato dalla Na,K-ATPasi basolaterale e dai canali del  $\text{K}^+$  apicali. Il coinvolgimento della Na,K-ATPasi nell'escrezione cellulare branchiale dell' $\text{NH}_4^+$  è stato inoltre ipotizzato**

**in molluschi bivalvi (Henry e Magnum 1980) e crostacei eurialini (Weihrauch 2004; Masui et al. 2002).**

**Come già riportato in modo più dettagliato nelle sezioni 2.1a e 2.1b, l'azoto ammoniacale, in concentrazioni subletali, ha mostrato effetti diversi sulla Na,K-ATPasi e sulla Na-ATPasi insensibile all'ouabaina nel mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis* (Pagliarani et al. 1996). Questi due aspetti e cioè, da un lato la possibile sostituzione da parte dell' $\text{NH}_4^+$  dello ione  $\text{K}^+$  nell'attivazione della Na,K-ATPasi, e del  $\text{Na}^+$  in quella della Na-ATPasi insensibile all'ouabaina, e, dall'altro, la modulazione di entrambe le attività ATPasiche da parte di concentrazioni elevate, anche se non letali, di azoto ammoniacale nell'ambiente acquatico, hanno fatto pensare che entrambe le attività enzimatiche possano essere coinvolte nella regolazione cellulare dell' $\text{NH}_4^+$  e che l'interazione con le due attività enzimatiche possa rappresentare un ulteriore meccanismo attraverso cui si esplica la sua azione tossica.**

**Come già accennato, gli studi volti ad accertare la tossicità dell'azoto ammoniacale nei molluschi bivalvi, anche mediante prove di esposizione, sono relativamente pochi e considerano per lo più la mortalità causata dall'esposizione all'azoto ammoniacale, mentre scarseggiano dati su possibili alterazioni di parametri biochimici. I valori di  $\text{LC}_{50}$ , cioè le concentrazioni di azoto ammoniacale in grado di produrre il 50% di mortalità negli organismi esposti, disponibili in letteratura, mostrano ampie variazioni, a seconda della specie considerata, dello stadio vitale e dell'habitat. In generale si può comunque affermare che le specie di molluschi che appaiono maggiormente sensibili all'esposizione a questo contaminante sono quelli di acqua dolce (Camargo e Alonso 2006), tanto che la presenza di alcune specie viene considerata indicatrice di buona qualità delle acque.**

**Nell'ambito dei molluschi bivalvi marini la specie *Tapes philippinarum*, considerata nella presente ricerca, si è rivelata in un precedente studio particolarmente resistente a condizioni di stress ambientale, incluse alte concentrazioni di azoto ammoniacale (Borgatti et al. 1998). In questa stessa specie, dati di letteratura indicano valori di LC<sub>50</sub> pari a 18,0 mg/L in forme giovanili e adulte (Wang 1989), ottenuti per esposizione all'azoto ammoniacale di 7 giorni.**

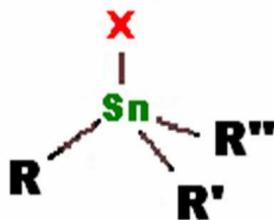
## 3.2 I composti organostannici

### 3.2a Caratteristiche chimico-fisiche

I composti organici dello stagno comprendono un gruppo di organometalli contenenti almeno un legame covalente C-Sn e caratterizzati da un atomo di stagno a numero di ossidazione 4, Sn (IV), centrale e legato ad un massimo di quattro gruppi distinti, organici o inorganici.

La formula generale di questi composti può essere rappresentata come  $R_{(4-n)}SnX_n$  dove n può variare da 0, nei composti tetra-sostituiti, a 3 nei composti cosiddetti monosostituiti. R rappresenta un gruppo alchilico (alifatico) o arilico (aromatico) e X una specie anionica, generalmente inorganica, quale  $Cl^-$ ,  $F^-$ ,  $O^{2-}$ ,  $OH^-$ ,  $S^-$  (Pellerito et al. 2006).

In Figura 3.2a1 è mostrata la struttura tetraedrica di un composto organostannico tri-sostituito.



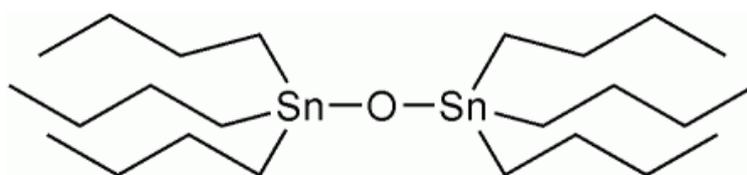
**Figura 3.2a1:** Struttura di un generico composto organostannico tri-sostituito. R, R' e R'' rappresentano gruppi (sostituenti) organici, X rappresenta un gruppo inorganico

I sostituenti organici sono spesso alifatici, con principalmente uno, quattro o otto atomi di carbonio e in questo caso i composti sono denominati alchilstannici. Tuttavia alcuni derivati organici dello stagno contengono anelli aromatici quali fenili (arilstannici). Consideriamo in questa trattazione, in relazione agli obiettivi della presente ricerca, con particolare attenzione soprattutto i composti alchilstannici, che comprendono tributilstagno (TBT) e derivati.

E' stato ipotizzato che il metallo a pH fisiologici non sia ionizzato, mentre gli ossidi non comprendono gruppi elettricamente carichi (Saxena 1987).

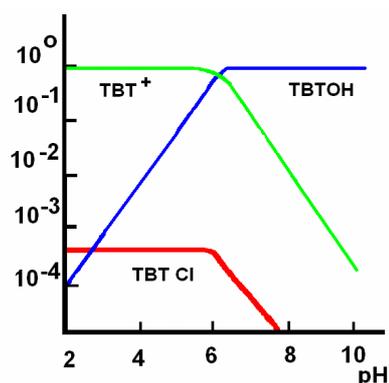
Il numero di legami stagno-carbonio e la lunghezza delle catene organiche hanno effetto sulle proprietà chimiche e fisiche dei composti organostannici ed anche sulla loro capacità di interagire con i sistemi biologici (Pellerito et al. 2006).

In generale i composti organostannici sono lipofili, anche se talune specie chimiche presentano anche una certa idrofilicità. La polarità della molecola dipende dalla presenza di gruppi polari e dalla disposizione spaziale di questi. Ad esempio l'ossido di TBT per la sua geometria risulta meno polare di quanto la presenza di un atomo di ossigeno farebbe supporre (Figura 3.2a2)



**Figura 3.2a2:** Struttura del TBTO

La presenza dei composti organostannici nella colonna d'acqua è strettamente legata alle caratteristiche chimico-fisiche, la loro solubilità nell'ambiente acquatico è bassa e dipende da salinità, pH e temperatura. In generale si può affermare che la solubilità di questi composti aumenta con la diminuzione della salinità e con l'aumentare della temperatura. Nell'ambiente acquatico viene riportato un valore di solubilità per il TBT di 50 mg/L in condizioni standard (Hoch 2001). In generale nelle acque naturali le forme predominanti dei vari composti organostannici sono i cationi e gli idrossidi. La forma cationica è stabile a valori di pH ambientali inferiori al valore della costante di acidità (pKa), mentre a valori più alti predomina la forma idrossilata: ad esempio per il TBT Fent e Looser (1995) riportano che a pH 8 sono presenti le forme  $TBT^+$ ,  $TBTCl$ ,  $TBTOH$  con netta prevalenza della forma idrossilata (Figura 3.2a3).



**Figura 3.2a3:** Speciazione del TBT in dipendenza del pH (Modificato da: Fent 2004)

Tuttavia, sempre a pH 8 nell'acqua di mare è stata descritta anche una significativa presenza di TBT come carbonato (Hoch 2001).

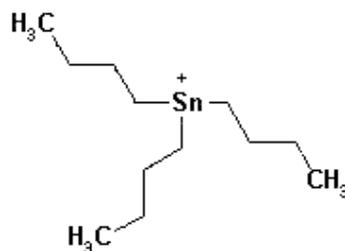
### **3.2b Applicazioni e contaminazione**

Per comprendere in che misura i composti organostannici siano arrivati a contaminare l'ambiente e in particolare si ritrovino accumulati come in un serbatoio nell'ambiente marino, occorre tener conto del vasto campo di applicazioni in cui queste molecole sono state utilizzate, a partire dalla seconda metà del secolo scorso (Saxena 1987). Sebbene i composti inorganici dello stagno non siano considerati generalmente tossici, i composti organostannici, che, come abbiamo visto, comprendono un ampio spettro di specie chimiche, esercitano in generale azione tossica (Hoch 2001). Questa tossicità è stata sfruttata nel corso degli anni attraverso un ampio spettro di applicazioni nell'industria chimica, soprattutto nella produzione di vernici antivegetative e come chemioterapici (Saxena, 1987), ma anche come preservanti dei tessuti e plastificanti (Appel 2004).

Anche se il rilascio nell'ambiente acquatico dei composti organostannici può avvenire attraverso diverse fonti, l'apporto quantitativamente più consistente è dato dal loro utilizzo a livello globale come agenti biocidi, che ha provocato una contaminazione dell'ambiente acquatico su scala mondiale (Fent 2004).

La maggiore produzione di organostannici riguarda i composti in cui si ha una mono- di- e tri-sostituzione da parte di gruppi butile e fenile; d'altra parte i composti tetra-sostituiti sono utilizzati come intermedi nella produzione degli altri composti organostannici (Appel 2004). Il principale utilizzo dei composti organostannici mono- e di-sostituiti è come stabilizzanti del PVC, questi composti sono infatti in grado di impedire la degradazione del polimero attuata dal calore e della luce. Attualmente circa il 70% degli organostannici prodotti annualmente sono utilizzati come stabilizzanti di materie plastiche (Hoch, 2001). Il rilascio di questi composti da parte dei tubi di PVC e delle materie plastiche in generale è influenzato dalle condizioni chimico-fisiche quali pH, temperatura e dalla natura del mezzo dilavante. Alcuni studi hanno dimostrato che l'acqua potabile può subire contaminazioni da organostannici attraverso il passaggio in tubi di PVC (Sadiki e Williams, 1999).

I composti organostannici tri-sostituiti, tra i quali il più noto è il tributilstagno (TBT) (Figura 3.2b1), sono utilizzati principalmente per la loro azione biocidi.



**Figura 3.2b1:** Struttura del TBT

Il TBT è stato utilizzato, soprattutto in passato, come agente antivegetativo nelle vernici per imbarcazioni grazie alla sua grande efficacia come biocida, in grado di impedire la crescita di organismi che provocano incrostazioni sugli scafi delle navi. Riscontrata la sua pericolosità e la sua azione negativa su organismi diversi da quelli bersaglio, a partire dagli anni ottanta diversi paesi hanno progressivamente ridotto l'utilizzo di questo composto nelle vernici antivegetative. L'International Maritime Organization (IMO) dell'Unione Europea ha proposto la completa abolizione del loro utilizzo nelle vernici dal 2008. Anche in Italia è stata recepita la direttiva europea secondo la quale a partire dal 2003 l'uso di vernici antivegetative per imbarcazioni contenenti composti organostannici deve essere ridotto fino al loro completo inutilizzo nel 2008.

Queste restrizioni normative hanno prodotto risultati diversi e purtroppo finora non sempre soddisfacenti. La prima nazione europea a proibire l'uso del TBT nelle vernici antivegetative fu la Francia già nel 1982. In questa nazione è stata evidenziata una netta diminuzione delle concentrazioni di organostannici nelle acque costiere dal 1988 al 1995 mostrando, in questo caso, un effetto positivo della legislazione (Tolosa et al. 1996). Al contrario, dopo dieci anni di legislazione restrittiva per il TBT, in Spagna non si è riscontrata nessuna diminuzione effettiva dei composti organostannici nei porti commerciali del Mediterraneo (Diez et al. 2002). Nonostante le leggi che sempre più marcatamente tendono ad eliminare i composti organostannici come agenti biocidi, vengono ancora oggi riscontrati alti livelli nel Mediterraneo in particolare in prossimità di zone portuali con intenso traffico marittimo e attivi bacini di carenaggio dove si eseguono verniciature con vernici antivegetative; in tali luoghi e spesso anche in quelli adiacenti i valori permangono tuttora ben al di sopra dei livelli di pericolosità (Evans e Nicholson 2000).

Nell'ambiente acquatico i composti organostannici possono occupare due diversi compartimenti: la colonna d'acqua e i sedimenti.

La presenza dei composti organostannici legati ai sedimenti è un importante aspetto della contaminazione ambientale. Questi composti mostrano infatti un'alta affinità per il materiale particolato organico ed inorganico, con il quale si associano stabilmente. Nella loro forma cationica, questi contaminanti vengono adsorbiti dalla superficie dei sedimenti carica negativamente, rimanendovi legati stabilmente e portando in alcuni casi ad una loro alta concentrazione in questo compartimento. Dai et al. (1998) hanno osservato che il TBT e i suoi metaboliti, dibutilstagno (DBT) e monobutilstagno (MBT), in ambiente acquatico si ritrovano per oltre il 60% nei sedimenti; Randall e Weber (1986) precisano che nell'ambiente estuario tra il 57 e il 95% del TBT presente nell'acqua viene adsorbito dai sedimenti. La deposizione di particolato e la risospensione dei sedimenti quindi possono essere, per queste sostanze, importanti processi di trasporto e interscambio tra acqua e sedimento.

Per questi motivi negli ultimi anni lo studio delle concentrazioni di composti organostannici nei sedimenti si è principalmente concentrato nelle zone portuali, essendo queste esposte a continue immissioni di contaminanti a causa dell'intenso traffico marittimo, dalla presenza di attivi bacini di carenaggio e del periodico drenaggio dei sedimenti.

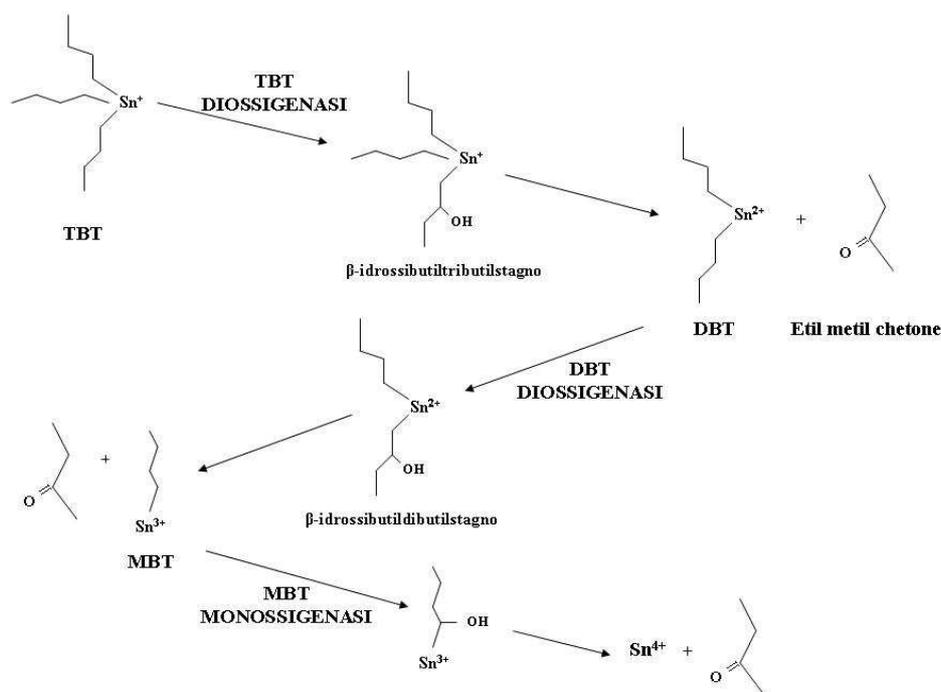
La compartimentazione dei composti organostannici tra i vari strati della colonna d'acqua e i sedimenti influisce inoltre sulla capacità da parte dell'ambiente di degradarli. Molti autori riportano un tempo di emivita (cioè tempo di dimezzamento della quantità) del TBT nella colonna d'acqua di alcuni giorni (Dubey e Roy 2003; Dai et al. 1998), mentre la degradazione del TBT è fortemente rallentata, con tempi di emivita di diversi anni quando il contaminante è associato ai sedimenti (Dubey e Roy, 2003, Omae, 2003). Si deve poi considerare che, sia nell'acqua come nei sedimenti, i prodotti di degradazione del TBT, cioè DBT e MBT, si aggiungono al loro precursore partecipando alla tossicità di questo composto.

La crescente evidenza della persistenza dei composti della famiglia del TBT nei sedimenti marini li indica come importante riserva e fonte di introduzione secondaria nell'ambiente (Fent 2004).

E' quindi prevedibile che l'esposizione e il danno agli organismi marini siano destinati a perdurare, in particolare per le specie che vivono nei sedimenti. Esistono infatti prove sperimentali che mostrano una maggiore concentrazione di composti organostannici in molluschi bivalvi che vivono a contatto con i sedimenti rispetto a quelli che vivono nella stessa zona, ma nella colonna d'acqua (Chandrinou et al. 2007).

La degradazione dei composti organostannici nell'ambiente procede attraverso una rimozione sequenziale dei gruppi organici dall'atomo di stagno (Hoch, 2001), e può

avvenire attraverso meccanismi biotici e abiotici. I fattori abiotici più significativi negli ecosistemi acquatici e terrestri sono i raggi ultravioletti e gli agenti chimici (Gadd, 2000). Molte evidenze sperimentali sembrano comunque suggerire che la degradazione del TBT da parte di microrganismi rivesta il ruolo di maggiore importanza in questo processo. In Figura 3.2b2 è mostrata una via di degradazione del TBT effettuata da microalghe: gli organismi in grado di effettuare il primo passaggio della degradazione sono diatomee e dinoflagellati, ma altri tipi di organismi possono parteciparvi inserendosi lungo la via degradativa. Lee et al. (1989) hanno mostrato come, in acque dove le microalghe presenti in natura venivano eliminate per filtrazione, non si riscontrava la degradazione del TBT; mentre l'incremento di clorofilla nelle acque era correlato ad un più alto tasso di degradazione.



**Figura 3.2b2:** Schema di degradazione del TBT  
(Modificato da:[http://umbbd.msi.umn.edu/tbt/tbt\\_image\\_map.html](http://umbbd.msi.umn.edu/tbt/tbt_image_map.html))

Oltre alle microalghe, altri organismi sono in grado di degradare il TBT: in alcuni casi è stata dimostrata la capacità di degradazione del TBT da parte di batteri (Dubey e Roy 2003) e diverse specie di funghi sono state dimostrate in grado di degradare dal 40 al 90% del TBT presente nell'ambiente (Bernat e Długoński 2006).

Diversi studi hanno mostrato come diversi organismi marini sono in grado di metabolizzare il TBT, che come gli altri organostannici, funge da substrato per le ossidasi a funzione mista. Il processo di degradazione procede attraverso fasi di idrossilazione e dealchilazione catalizzate dal citocromo P450, con formazione di DBT, MBT e stagno inorganico (Appel 2004; Lee 1991).

Gli effetti tossici dei contaminanti ambientali sono strettamente legati alla loro biodisponibilità. L'assunzione di contaminanti da parte delle specie acquatiche, oltre ad essere influenzata dalle loro caratteristiche chimico-fisiche, dipende da fattori specie-specifici. Per composti quali gli organostannici, che in acqua possono essere presenti come specie cariche e neutre in equilibrio, è inevitabile aspettarsi un diverso bioaccumulo a seconda delle specie chimiche prevalenti. In *Daphnia magna* il bioaccumulo a pH 8,0 molto più elevato rispetto a pH 6 è stato messo in relazione col fatto che il TBT è presente nella forma TBTOH al 95%, evidenziando quindi che questo composto è accumulato principalmente, anche se non solo, come idrossido (Fent 2003).

L'assunzione di composti organostannici da parte degli organismi marini può avvenire attraverso i sedimenti, l'acqua e il cibo. L'accumulo dei composti organostannici nei diversi tessuti è la risultante di queste modalità di assunzione accoppiata alla capacità degli organismi di degradare ed espellere i contaminanti (Rüdel 2003). Mentre negli organismi marini ad un basso livello della catena trofica la via principale di assunzione dei contaminanti è quella attraverso l'acqua tramite le branchie e la superficie corporea, la via di assunzione attraverso i sedimenti e il cibo potrebbero essere importante per organismi ai più alti livelli trofici.

Per quanto riguarda i molluschi bivalvi, la via di assimilazione principale dei composti organostannici sembra essere l'acqua, anche se è possibile anche un accumulo attraverso il cibo e i sedimenti. La via di assimilazione sembra riflettersi su una diversa distribuzione dei composti organostannici nell'organismo. In *Mytilus edulis* e nelle vongole *Mya arenaria* e *Tapes decussatus*, si è osservato un accumulo preferenziale di TBT nelle branchie quando gli animali erano esposti al contaminante nell'acqua, mentre l'assorbimento del TBT attraverso sedimenti e il cibo porta ad un maggiore accumulo di contaminante nella ghiandola digestiva (Coelho et al. 2002).

La maggior parte delle ricerche condotte sull'accumulo di questi composti da parte degli invertebrati acquatici riguarda molluschi e crostacei, in quanto questi gruppi ricoprono particolare interesse come risorsa alimentare e sono dominanti in molti habitat.

In particolare i molluschi bivalvi si sono dimostrati in grado di accumulare significative quantità di tali contaminanti. Tale caratteristica è stata attribuita al fatto

che, rispetto a crostacei e pesci, posseggono meccanismi di degradazione meno efficienti (Hoch 2001). Esistono diversi studi sull'accumulo di composti organostannici da parte dei molluschi bivalvi nel mare Adriatico settentrionale e in particolare nella zona lagunare di Venezia, particolarmente utilizzata per la coltivazioni di mitili e vongole, in cui sono state riscontrate elevate concentrazioni di TBT nei tessuti di *Mytilus* e *Tapes* (Biancotto et al. 2004; Bortoli et al. 2003), facendo intravedere un possibile rischio per la salute umana attraverso l'assunzione di prodotti ittici contaminati (Hoch 2001). La capacità da parte di diversi molluschi bivalvi di accumulare nei loro tessuti in modo preferenziale il TBT rispetto ai suoi composti di degradazione è stata riscontrata da diversi autori (Yang 2006; Harino et al. 2005; Boscolo et al. 2004; Barroso et al. 2004; Biancotto et al. 2004; Bortoli et al. 2003). Il ritrovamento di elevate concentrazioni di TBT nei tessuti di questi animali, oltre a confermare la bassa attività del citocromo P450, e delle ossidasi a funzione mista nell'epatopancreas dei molluschi bivalvi considerati, è stato messo in relazione con il grado di alchilazione di tali composti, per cui il TBT risulta più lipofilo rispetto al DBT e all'MBT (Boscolo et al. 2004).

La capacità di bioaccumulo dei composti organostannici da parte dei molluschi bivalvi sembra inoltre inversamente correlata, almeno nell'ambito di alcune concentrazioni, alla loro concentrazione nell'ambiente. E' stato infatti riportato in *Mytilus galloprovincialis* (Boscolo et al. 2004) e in *M. edulis* (Devier et al. 2003) che i valori più alti del fattore di bioconcentrazione per il TBT si riscontrano negli esemplari campionati dai siti, o esposti a concentrazione minore di contaminante.

La trasmissione lungo la catena alimentare dei composti organostannici è stata osservata da diversi autori, il TBT entra nella catena alimentare a partire dal plankton, al quale è in grado di associarsi (Gadd 2000), e grazie alle sue caratteristiche lipofile è in grado di arrivare ai più alti consumatori della catena alimentare fino all'uomo. Ciononostante ancora poche informazioni si hanno sull'accumulazione dei composti organostannici lungo la catena alimentare, esiste infatti un'alta variabilità di accumulo delle singole specie, anche allo stesso livello trofico, probabilmente riferibile alle differenze specie-specifiche nelle vie di assimilazione e nelle capacità di eliminare i composti organostannici (Strand e Jacobsen 2005). Pertanto se il bioaccumulo di questi contaminanti nei tessuti di vertebrati e invertebrati è largamente documentato, la biomagnificazione, ovvero l'aumento progressivo della concentrazione di questi composti e derivati all'interno della catena alimentare, è ancora controverso.

### 3.2c Tossicità

I composti organostannici sono estremamente tossici per gli organismi acquatici come dimostrato da prove *in vivo* e *in vitro* per molte specie animali (Fent 2004). La tossicità di questi composti sembra essere dipendente dal numero e dalla natura dei gruppi organici legati all'atomo di stagno, mentre scarsa importanza, almeno per quanto riguarda l'attività biologica, sembra avere la natura degli anioni inorganici (Pellerito et al. 2006). La tossicità diminuisce in generale all'aumentare della lunghezza di catena dei gruppi alchilici. I composti considerati maggiormente tossici sono quelli trisostituiti, mentre ad una diminuzione dell'alchilazione dello stagno è associata una diminuzione della tossicità. I composti tetrasostituiti non mostrano invece attività tossica negli organismi, il che suggerisce che sia necessaria una certa polarità perché queste molecole possano esplicare la loro tossicità (Hoch 2001). Il TBT è, tra i composti organostannici, quello che mostra la più alta tossicità sugli animali acquatici: già a concentrazioni nanomolari è infatti in grado di causare effetti cronici e acuti sugli organismi maggiormente sensibili di questo ecosistema come alghe, zooplankton, molluschi, e larve di alcuni pesci (Pellerito et al. 2006).

I composti organostannici esplicano la loro azione tossica sugli animali acquatici in diversi modi. Numerosi studi su molluschi marini riportano infatti un ampio spettro di risposte a vari livelli: nei gasteropodi è stato evidenziato soprattutto l'imposex, cioè mascolinizzazione a livello anatomico e fisiologico di individui femminili (Horiguchi 2006; Pellizzato 2004), nei bivalvi disturbi riproduttivi (Regoli et al. 2001), immunotossicità (Bouchard et al. 1999; Cima et al. 1999), induzione di apoptosi (Mičić et al. 2001) e danno mitocondriale (Guolan e Yong 1995). Deformazione della conchiglia ed inibizione della crescita e sviluppo in bivalvi esposti a TBT è stata osservata in *Crossostrea gigas* (Alzieu et al. 1989) e *Ruditapes decussatus* (Coelho et al. 2006). In altri casi vongole *Ruditapes semidecussatus* si sono rivelate più tolleranti non mostrando riduzione del tasso di crescita anche in presenza di alte concentrazioni di TBT (Thain e Waldock 1986).

Tra gli effetti sopra elencati sembra rivestire un ruolo rilevante la capacità dei composti organostannici di agire come distruttori endocrini. Gli effetti più evidenti, sotto questo punto di vista, sono stati osservati in molluschi gasteropodi, come prima accennato, come imposex, tanto che questo viene considerato un sintomo della presenza nell'ambiente di elevate concentrazioni di composti organostannici (Leung et al. 2006). Più raramente sono stati osservati effetti di mascolinizzazione nei molluschi bivalvi: in *Tapes decussatus* è stata tuttavia descritta un'interazione del TBT con il metabolismo

degli androgeni attraverso l'inibizione dell'aromatasi, che potrebbe contribuire alla mascolinizzazione della vongola (Morcillo e Porte 2000; Morcillo et al. 1998).

La letteratura riguardante l'effetto tossico a livello cellulare dei composti organostannici sui molluschi bivalvi non è particolarmente ampia. Alcuni studi hanno tuttavia dimostrato la capacità dei composti organostannici di provocare danni al DNA (Gabbianelli et al. 2006) e, in *Tapes philippinarum*, inibizione dell'adenilato ciclasi (Valbonesi et al. 2004). Un'azione immunotossica con ridotta fagocitosi e inibizione dell'attività enzimatica superossido-dismutasi in emociti esposti a TBT è stata ampiamente documentata in diverse specie (Matozzo et al. 2002; Cima et al. 1999; Bouchard et al. 1999).

L'ampia gamma di effetti che i composti organostannici provocano negli organismi è stata ricondotta a molteplici meccanismi, alcuni dei quali ancora non completamente chiariti. E' ormai riconosciuto che l'azione tossica di questi composti dipenda dalla loro solubilità nelle membrane biologiche e dal loro accumulo a livello cellulare, che è diverso a seconda della specie chimica (Bertoli et al. 2001). Studi recenti su colture cellulari hanno dimostrato che i composti metilstannici trimetilstagno (TMT) e derivati, dimetil-(DMT) e monometil (MMT) stagno, non si legano alle membrane cellulari e si ritrovano nel citosol in concentrazioni dipendenti da quelle nel mezzo di coltura. Tra i composti saggiati il DMT sembra essere quello più permeabile e anche quello in grado di provocare maggiori danni al DNA. Non è ancora noto se l'espulsione dei composti organici dello stagno dalla cellula avvenga attraverso un meccanismo attivo (Dopp et al. 2007).

Alcuni meccanismi dell'azione tossica dei composti organostannici sono invece riconducibili alla loro possibile incorporazione nelle membrane biologiche, grazie alle loro caratteristiche lipofile, e alla loro capacità di legarsi attraverso diverse modalità alle molecole biologiche.

I composti organostannici incorporati nelle membrane biologiche, ne possono variarne le proprietà fisiche, la permeabilità e le caratteristiche funzionali. La maggior parte degli studi di incorporazione è stata effettuata utilizzando sistemi modello quali i liposomi. La struttura del quarto gruppo legato al TBT sembra in questi sistemi importante nel determinare il livello di incorporazione: ad esempio TBT cloruro e TBT acetato si localizzano diversamente nel doppio strato lipidico di liposomi (Bertoli et al. 2001). Sembra che la parte idrofobica del TBT interagisca con le catene aciliche dei fosfolipidi, aumentando le interazioni idrofobiche tra queste. Nella fosfatidilcolina il TBT sembra localizzarsi nella parte superiore vicina all'interfaccia lipidi/acqua, rendendo i gruppi carbonilici più accessibili all'acqua, mentre viene escluso da sistemi

contenenti solo fosfatidilammina in cui le catene aciliche appaiono più strettamente impacchettate (Chicano et al. 2001). Il DBT interagisce con la superficie di membrana, mentre il MBT interagisce a ciascun livello del doppio strato lipidico. La diversa localizzazione riscontrata per i composti organostannici è stata messa in relazione ai diversi cationi che si formano in soluzione acquosa (Bertoli et al. 2001). Se la struttura delle teste polari dei fosfolipidi è fondamentale nel determinare il comportamento delle molecole lipidiche in presenza di organostannici (Chicano et al. 2002), non minore importanza riveste la composizione in acidi grassi delle membrane, correlata ripetutamente alla tossicità dei composti organostannici (Bertoli et al. 2001; Puccia et al. 2005). Su tali basi una diversa composizione complessiva di membrana potrebbe giustificare effetti diversi e anche apparentemente contrastanti (Chicano et al. 2002; Martins et al. 2005). Anche l'azione neurotossica di MMT e DMT è stata attribuita alla loro incorporazione nelle membrane sinaptiche (Kruger et al. 2006).

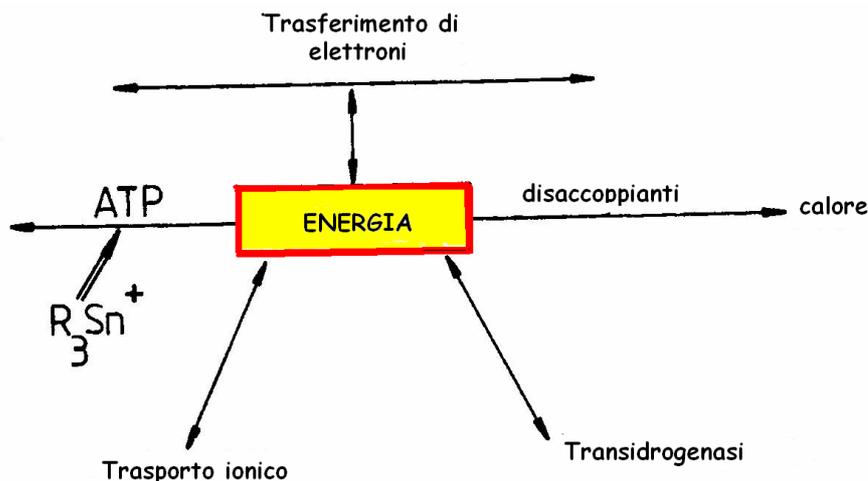
Un altro meccanismo di tossicità legato all'incorporazione di organostannici nelle membrane biologiche è la promozione della perossidazione lipidica. L'incorporazione di composti organostannici quali il TBT nella fosfatidilcolina aumenta infatti la formazione di perossidi (Petrosyan et al. 2003).

La permeabilizzazione della membrana plasmatica operata dall'incorporazione dei composti organostannici può avere importanti ripercussioni sui processi legati al gradiente ionico di transmembrana: nei pesci sembra infatti che l'assunzione di TBT nella matrice lipidica della membrana plasmatica produca una permeabilizzazione aspecifica e un conseguente annullamento delle differenze di potenziale tra il compartimento cellulare interno e quello esterno, compromettendo i processi di regolazione ionica e il mantenimento dell'osmoticità cellulare (Hartl et al. 2001a).

Nonostante la disponibilità di un grande numero di dati in letteratura sugli effetti biologici dei composti organostannici sui molluschi marini, l'interazione di questi composti con i meccanismi coinvolti nella regolazione ionica degli animali acquatici, e soprattutto dei Bivalvi, è ancora poco studiata. Studi su teleostei eurialini (Alkail et al. 2004; Hartl et al. 2001b; Pinkney et al. 1989) mostrano un'inibizione della Na,K-ATPasi, enzima chiave nell'osmoregolazione. Evidenze sperimentali che hanno portato a considerare la Na,K-ATPasi un possibile bersaglio dei composti organostannici sono riportate più in dettaglio nel paragrafo 2.1, dedicato a questo enzima di membrana.

Per quanto riguarda i mitocondri, è noto che la compromissione dell'integrità della membrana mitocondriale con conseguente alterazione dei meccanismi di trasporto di  $H^+$ , dell'intero processo della respirazione mitocondriale e il suo accoppiamento con la sintesi di ATP, risultano tra i primi meccanismi, a livello cellulare, a subire l'impatto

dei composti organostannici (Bragadin et al. 2003; Corsini et al. 1998), tanto che questi sono stati definiti potenti veleni mitocondriali (Stridh et al. 1998). Da tempo è stato accertato che i composti organostannici si comportano come ionofori (Ortiz et al. 2005) e quindi agiscono come disaccoppianti della fosforilazione ossidativa mitocondriale (Saxena 1987; Bragadin et al. 2003; Puccia et al. 2005), provocando una cascata di effetti (Figura 3.2c1)



**Figura 3.2c1:** Gli organostannici come disaccoppianti (Modificato da Saxena 1987)

La permeabilizzazione della membrana mitocondriale, promossa dal legame degli organostannici con il poro di transizione di permeabilità (Nishikimi et al. 2001) provoca l'annullamento della differenza di potenziale tra interno ed esterno; questo altera il flusso di elettroni lungo la catena respiratoria e provoca il rilascio del citocromo c, innescando il processo apoptotico (Jurkiewicz et al. 2004; Tiano et al. 2003). L'induzione dell'apoptosi dei timociti sembra uno dei meccanismi implicati nell'azione immunotossica del TBT (Stridh et al. 1998); tuttavia anche la perossidazione lipidica è stata chiamata in causa nell'immunotossicità di DBT e TBT (Gennari et al. 2000).

Probabilmente più meccanismi concorrono nel determinare questi effetti a livello mitocondriale (Gogvadze et al. 2002; Stridh et al. 1998).

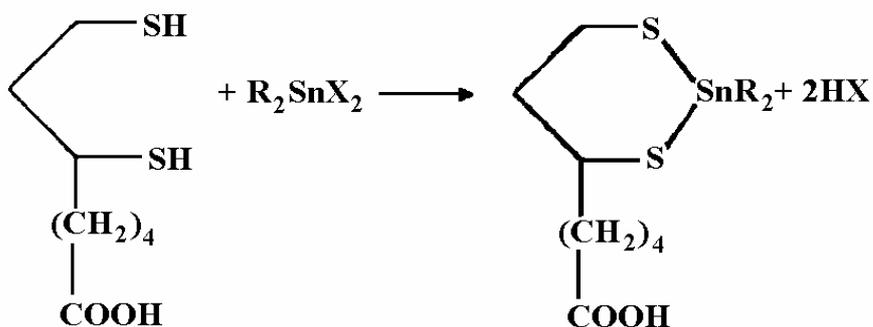
L'ATP sintasi infine sembra essere uno dei bersagli specifici del TBT (von Balmoos et al. 2004), come descritto in modo più particolareggiato nel paragrafo 2.2a.

Oltre che un'interazione con le strutture di membrana in un certo senso indiretta attraverso la modificazione del microambiente lipidico di membrana, alcuni effetti degli organostannici sono stati ricondotti al loro legame con biomolecole. In questi legami l'atomo di Sn degli organostannici si comporta generalmente da accettore di elettroni e

tende a interagire con atomi delle biomolecole in grado di cedere elettroni. Gli effetti sulla perossidazione lipidica sono stati anche ricondotti al legame con i fosfolipidi di membrana portando alla formazione di complessi in cui lo stagno forma un legame dativo Sn-O-P (Petrosyan et al. 2003).

Un meccanismo proposto per l'interazione proteine-organostannici prevede la formazione di legami covalenti tra lo stagno e i gruppi tiolici presenti nelle proteine.

In presenza di certi composti organostannici disostituiti i ditioli si legano al metallo formando chelati stabili (Saxena 1987).



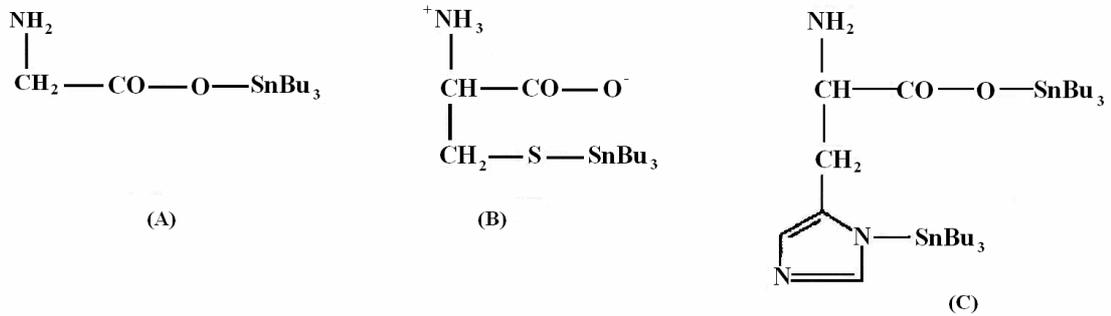
**Figura 3.2c2:** Legame dei ditioli a composti organostannici disostituiti (Da: Saxena 1987)

Questo meccanismo, indicando la possibilità di chelazione da parte dell'atomo di Sn di due gruppi tiolici ravvicinati, potrebbe giustificare il maggiore effetto dei composti organostannici disostituiti rispetto a quelli trisostituiti osservato in certi casi (Saxena 1987).

E' stato osservato inoltre che l'aggiunta di ditioli impedisce l'inibizione di attività enzimatiche esercitata dal TBT: sembra infatti che gruppi sulfidrilici esogeni esplicino una funzione antagonista verso i composti organostannici impedendo la modificazione della struttura terziaria delle proteine e mantenendo in forma ridotta i gruppi -SH della proteina enzimatica (Ohno et al. 2005; Lo et al. 2003). Recenti studi *in vitro* hanno avvalorato questa ipotesi mostrando che ditioli, ma non monotioli, hanno azione antagonista verso l'effetto biochimico degli organostannici (Buck-Koenhntop et al 2006).

E' stato comunque dimostrato un legame del TBT con gli amminoacidi glicina, cisteina ed istidina (Smith et al. 1979). Mentre il legame con la cisteina avviene tramite formazione di un legame covalente S-Sn, il legame con gli altri amminoacidi si attua

tramite l'esterificazione del gruppo carbossilico o il legame ad un atomo di azoto (Figura 3.2c3).

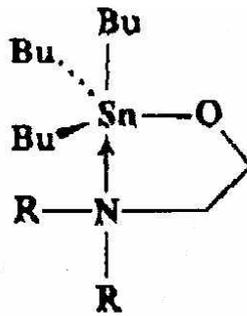


**Figura 3.2c3:** Legame del TBT con gli aminoacidi glicina (A), cisteina (B) e istidina (C). I gruppi butilici sono indicati Bu (Da Smith et al. 1979).

Per spiegare il legame del TBT con le proteine è stata anche ipotizzata la formazione di un complesso pentacoordinato del TBT con formazione di una struttura geometrica di bpiramide a base triangolare in cui l'atomo di stagno occupa la posizione centrale (Smith et al. 1979; Saxena 1987).

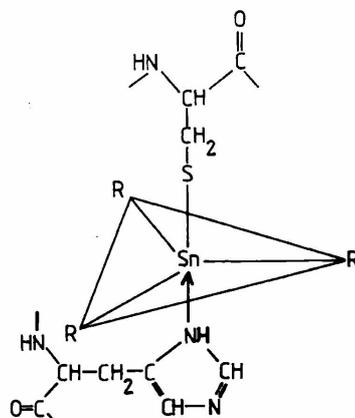
Questa struttura può essere costituita in diversi modi.

È stato ipotizzato un legame intramolecolare del TBT con un ligando organico contenente un gruppo amminico e un gruppo idrossilico, per cui l'atomo di stagno viene ad essere legato covalentemente ad un atomo di ossigeno e ad un atomo di azoto (Smith et al. 1979) (Figura 3.2c4).



**Figura 3.2c4:** Legame del TBT con un ligando aminoalcol con formazione di un complesso pentacoordinato. I gruppi butilici sono indicati Bu (Da Smith et al. 1979).

Un altro tipo di complesso pentacoordinato prevede invece il legame del TBT con due residui amminoacidici che vengono a trovarsi sopra e sotto il piano individuato dal TBT che in questo caso assume struttura planare (Saxena 1987) (Figura 3.2c5).



**Figura 3.2c5:** Legame del TBT con residui di cisteina e istidina con formazione di un complesso pentacoordinato (Da Saxena 1987)

Mentre l'interazione del TBT con i gruppi tiolici con formazione di legami covalenti S-Sn sembra accertata in molti casi, un recente lavoro di von Balmoos et al. (2005) ha indicato che, nel caso dell'ATP sintasi mitocondriale, il legame del TBT possa attuarsi tramite interazioni non covalenti, cioè senza un diretto coinvolgimento dei gruppi SH.

La possibilità dei composti organostannici di formare complessi e vari tipi di interazione con le proteine è stata messa in relazione con la diversa attività biologica di questi composti. E' stato osservato che la formazione di un complesso pentacoordinato con le proteine porta ad una minore attività biologica, attribuita ad una minore tendenza del composto organostannico di legarsi ai siti attivi delle proteine (Smith et al. 1979).

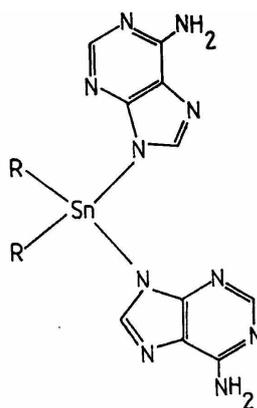
E' stato anche ipotizzato che nel caso la molecola di organostannico contenga un solo gruppo funzionale X e/o ligandi neutri Y, l' interazione di questi gruppi con i gruppi SH delle proteine con formazione del legame Sn-S possa avvenire con relativa facilità, secondo la reazione:



potendo portare in alcuni casi anche al mantenimento dell'attività biologica (Smith et al. 1979), probabilmente perchè questa interazione non comporta una distorsione significativa della struttura proteica.

Dal momento che numerosi studi in vitro utilizzano TBT disciolto in dimetilsolfossido (DMSO) è stata anche considerata la possibilità di formazione di un complesso pentacoordinato  $TBT(DMSO)_2^+$  in soluzione, per cui gli effetti osservati potrebbero anche essere indotti da questo complesso (Smith et al. 1979) e quindi diversi da quelli del TBT cloruro.

Infine, oltre che con le proteine, è stata dimostrata la possibilità di alcuni composti organostannici di legarsi a nucleotidi (Figura 3.2c6).



**Figura 3.2c6:** Legame di un composto dialchilstannico con l'adenina (Da Saxena 1987).

Questa capacità è stata sfruttata per utilizzare alcuni composti organostannici come farmaci antitumorali (Saxena 1987) e potrebbe giustificare gli effetti genotossici riportati in diversi casi (Dopp et al 2007).

E' interessante osservare che gli studi finora condotti sull'interazione tra i composti organostannici e complessi enzimatici di membrana, quali la MgATPasi mitocondriale e le ATPasi Na-dipendenti della membrana plasmatica riguardano generalmente mammiferi, pesci (Hartl 2001a), protozoi e microorganismi (Saxena 1987) e non esistono praticamente dati sui molluschi bivalvi, direttamente esposti nell'ambiente naturale a questi contaminanti. Appare quindi di grande interesse verificare l'eventuale effetto di tali composti su queste ATPasi in molluschi bivalvi.

## Premessa alla parte sperimentale

Alcune specie di molluschi bivalvi marini quali la vongola filippina *Tapes philippinarum* e il mitilo *Mytilus galloprovincialis*, comunemente allevati nell'ambiente costiero dell'Adriatico, ci sono sembrati particolarmente idonei per valutare alcuni effetti biochimici di contaminanti ambientale di origine naturale (azoto ammoniacale) e antropica (composti organostannici).

I molluschi bivalvi sono organismi considerati sentinelle dell'ambiente acquatico e, per le loro caratteristiche di bassa motilità, grande capacità di filtrazione e predominanza in svariati habitat, sono spesso utilizzati come bioindicatori. Inoltre questi animali si trovano alla base della catena alimentare di cui l'uomo rappresenta l'ultimo anello. Nonostante l'ampia mole di studi ecotossicologici che prevedono l'impiego di questi animali, finora poco si sa sugli effetti a livello cellulare dei composti di accertata tossicità per gli animali acquatici considerati nella presente ricerca. Soprattutto restano ancora in larga parte ipotetici i meccanismi attraverso cui questi contaminanti esplicano il loro effetto negativo, e d'altra parte poco studiate in generale nei molluschi sono le pompe ATPasiche ioniche anche come possibile bersaglio di queste classi di contaminanti.

In questo studio si sono considerati complessi enzimatici che rivestono un ruolo chiave nella regolazione ionica cellulare quali la Na,K-ATPasi e la Na-ATPasi insensibile all'ouabaina. Per quanto riguarda l'interazione con i composti organostannici, i contaminanti più pericolosi immessi deliberatamente nell'ambiente marino, lo studio è stato esteso alla Mg-ATPasi mitocondriale, già riportata in letteratura come bersaglio del più tossico di questi composti e cioè il tributilstagno (TBT).

L'interazione dello ione ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ), specie chimica prevalente dell'azoto ammoniacale nell'ambiente naturale, con le attività ATPasiche di membrana Na-dipendenti, sembra essere coinvolta nei meccanismi di regolazione ionica in alcuni animali acquatici tra cui pesci e crostacei. Basandosi su risultati precedentemente ottenuti in cui è stato dimostrato che lo ione  $\text{NH}_4^+$  è in grado di sostituire il  $\text{K}^+$  nell'attivazione della Na,K-ATPasi, e il  $\text{Na}^+$  in quella della Na-ATPasi insensibile all'ouabaina, il lavoro sperimentale della presente ricerca ha inteso approfondire lo studio dei meccanismi cinetici di interazione dello ione ammonio con le due attività di membrana Na-dipendenti al fine di contribuire a definire, oltre che il ruolo delle due ATPasi nella regolazione di cationi monovalenti, alcuni possibili meccanismi di tossicità dell'azoto ammoniacale e in particolare della sua forma prevalente  $\text{NH}_4^+$ .

La contaminazione dell'ambiente marino da parte di composti organostannici è oggi una realtà su scala mondiale. In particolar modo nei molluschi bivalvi, in grado di accumulare alte concentrazioni di questi contaminanti nei propri tessuti e sui quali gli effetti cellulari sono ormai ben noti, quali immunotossicità, danni mitocondriali, disturbi riproduttivi ecc., non sono stati finora studiati possibili effetti biochimici su processi implicati nella regolazione ionica e nella respirazione mitocondriale.

In questa ricerca abbiamo quindi inteso valutare la capacità dei composti organostannici di interagire con attività ATPasiche di membrana implicate in processi biochimici chiave quali la regolazione ionica e la fosforilazione ossidativa mitocondriale. Gli effetti di TBT e derivati sono stati valutati *in vitro* per verificare l'interazione diretta dei composti organostannici con i complessi enzimatici di membrana considerati, la Na,K-ATPasi e la Na-ATPasi insensibile all'ouabaina, e la Mg-ATPasi mitocondriale. Mentre *in vivo* sono state effettuate prove di esposizione di mitili al TBT per riprodurre possibili episodi di grave contaminazione ambientale nell'ambiente naturale.

Questi due differenti approcci potranno, integrandosi a vicenda, contribuire ad approfondire le conoscenze su effetti e meccanismi di interazione di tali composti con le attività ATPasiche di membrana, la cui alterazione può rappresentare il primo stadio di una serie di alterazioni biochimico-fisiologiche a livello di membrana, che possono rappresentare uno dei meccanismi dell'azione tossica di questi contaminanti a livello cellulare.

# 1. Materiali e metodi

## 1.1 Disegno sperimentale

La presente ricerca è stata articolata in due linee sperimentali:

A) valutazione dell'interazione dello ione ammonio, la forma prevalente dell'azoto ammoniacale a pH fisiologici e anche nell'acqua di mare, con le attività Na-dipendenti, sensibili ed insensibili all'ouabaina, presenti nella membrana plasmatica. Questo studio è stato effettuato *in vitro*, immettendo il contaminante come  $\text{NH}_4\text{Cl}$  direttamente nel sistema di reazione, e valutando le attività enzimatiche in tessuti del mollusco bivalve *Tapes philippinarum*. Questo approccio sperimentale ha avuto l'obiettivo di contribuire a chiarire il meccanismo di interazione della forma cationica del contaminante azoto ammoniacale con le ATPasi Na-dipendenti, potenzialmente responsabile della sua azione tossica a livello cellulare.

B) Studio del possibile effetto di composti alchilstannici sulle attività Na-dipendenti, sensibili e insensibili all'ouabaina, presenti nella membrana plasmatica e sulla Mg-ATPasi mitocondriale di tessuti di molluschi bivalvi. L'attività Mg-ATPasica determinata si riferisce all'attività idrolitica dell'ATP operata dal complesso enzimatico ATP sintasi. Tale linea di ricerca è stata perseguita attraverso due distinti approcci:

1) *in vitro*, immettendo tributilstagno (TBT) e i derivati dibutilstagno (DBT), monobutilstagno (MBT) e tetraetilstagno (TeET) nel sistema di reazione utilizzato per la determinazione di ciascuna delle ATPasi in studio. In queste prove le attività Na-dipendenti sono state determinate in tessuti di vongola (*Tapes philippinarum*) e mitili (*Mytilus galloprovincialis*) mentre l'attività Mg-ATPasica è stata caratterizzata e valutata nei soli tessuti di mitilo.

Le prove *in vitro* sono state condotte per verificare direttamente la risposta dei complessi enzimatici considerati ai contaminanti saggiati, determinando la cinetica di inibizione da parte del TBT delle attività enzimatiche, e confrontando l'effetto delle diverse specie molecolari organostanniche.

2) *in vivo*, esponendo mitili in ambiente controllato a diverse concentrazioni di TBT, e valutando quindi le ATPasi considerate.

Le prove *in vivo* hanno inteso valutare le risposte delle stesse attività enzimatiche saggiate nelle prove *in vitro*, dopo esposizione degli animali a breve termine al TBT, in condizioni volte a riprodurre episodi di grave contaminazione ambientale.

Si è inteso affrontare, attraverso questo duplice approccio, la complessità di interazione dei contaminanti organostannici con le ATPasi in studio, nel tentativo di far emergere, tramite il confronto dei dati *in vivo* e *in vitro* e la complementarità delle due forme di indagine, meccanismi biochimici di risposta e adattamento dei molluschi a condizioni ambientali potenzialmente negative.

## **1.2 Sperimentazione *in vitro***

Per tutte le prove *in vitro* sono stati utilizzati animali di taglia commerciale delle specie *Tapes philippinarum* e *Mytilus galloprovincialis* provenienti da diverse popolazioni dell'Adriatico settentrionale.

Gli esemplari di *T. philippinarum* utilizzati provengono da due distinti campionamenti. Gli animali del primo campionamento, formato da circa 80 esemplari, sono stati utilizzati per le prove di interazione delle attività Na-dipendenti con lo ione ammonio. Il secondo campionamento costituito da circa 210 animali è stato utilizzato per le prove riguardanti l'interazione con i composti organostannici.

Gli esemplari di *M. galloprovincialis* utilizzati per le prove *in vitro* sono stati campionati in quattro distinti momenti. Ogni campionamento era costituito da circa 110 animali e la loro utilizzazione è stata la seguente:

1° e 2° campionamento: determinazione delle attività Na-dipendenti, inibizione da parte dei composti organostannici e prove con DTE.

3° campionamento: caratterizzazione dell'attività Mg-ATPasi mitocondriale e prove di inibizione da parte del TBT

4° campionamento: determinazione dei parametri cinetici e prove con DTE

Ogni campionamento di animali è stato suddiviso in due distinti pool e le analisi su questi sono state eseguite separatamente.

### **1.2a Interazione delle ATPasi Na-dipendenti con $\text{NH}_4^+$**

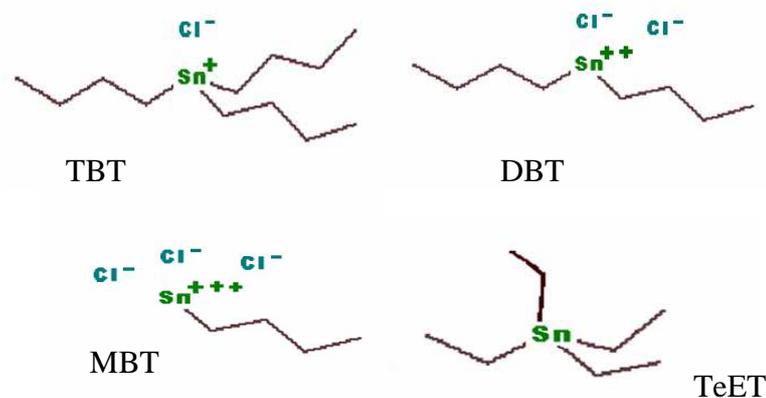
Si è valutata in *Tapes philippinarum* la dipendenza delle attività enzimatiche Na-dipendenti dai diversi cationi attivanti immettendo nel sistema di reazione concentrazioni crescenti di  $\text{Na}^+$  o di  $\text{NH}_4^+$ , per la Na-ATPasi, e di  $\text{K}^+$  o  $\text{NH}_4^+$ , sempre in presenza di concentrazioni ottimali di  $\text{Na}^+$ , per la Na,K-ATPasi, e mantenendo costanti le concentrazioni di tutti gli altri componenti del sistema.

Nelle prove in cui è stata saggiata la sensibilità all'ouabaina delle due attività enzimatiche in presenza di  $\text{NH}_4^+$  come catione sostituito del  $\text{K}^+$  nella Na,K-ATPasi e

del  $\text{Na}^+$  nella Na-ATPasi, nei sistemi di reazione venivano aggiunte quantità crescenti di ouabaina. Le prove che si riferiscono alla Na-ATPasi ouabino-insensibile nel tessuto di mantello non sono state effettuate in quanto l'attività enzimatica in questo tessuto non era determinabile.

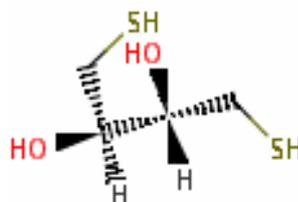
## 1.2b Risposta delle attività enzimatiche ai composti organostannici

È stata saggiata in *T. philippinarum* la risposta delle due attività enzimatiche Na-dipendenti, Na,K-ATPasi e Na-ATPasi insensibile all'ouabaina, di branchie e mantello al TBT, e in *M. galloprovincialis* anche al DBT, MBT e TeET, quest'ultimo utilizzato come rappresentativo di composti organici dello stagno completamente apolari (Figura 1.2b1).



**Figura 1.2b1:** Strutture dei diversi composti alchilstannici utilizzati

Al fine di chiarire i possibili meccanismi di azione del TBT sull'attività Na,K-ATPasica è stato utilizzato l'agente riducente 1,4-ditioeritritolo (DTE). Il DTE (Figura 1.2b2) è un composto che, come altri composti ditiolici, è considerato da molti autori in grado di prevenire l'inibizione di diverse attività enzimatiche da parte di composti organostannici (Ohno et al. 2005; Lo et al. 2003).



**Figura 1.2b2:** Struttura del DTE

L'interazione tra TBT e DTE è stata studiata in presenza di concentrazioni di TBT che inducevano la massima inibizione possibile nella Na,K-ATPasi mentre il DTE è stato immesso nel sistema di reazione sia direttamente che previa preincubazione con la frazione microsomale.

In *Mytilus galloprovincialis* è stato poi preso in considerazione il complesso enzimatico Mg-ATPasi mitocondriale. Non essendo presenti dati in letteratura sulla determinazione di questo enzima nel mitilo, inizialmente sono state definite la sensibilità dell'enzima all'oligomicina, suo inibitore specifico, e le condizioni di saggio ottimali per la valutazione dell'attività enzimatica in branchie e mantello. La dipendenza dell'attività Mg-ATPasica è stata quindi valutata rispetto a diversi parametri di saggio quali pH, concentrazione di MgCl<sub>2</sub> e substrato attivante ATP.

La risposta della Mg-ATPasi al TBT è stata valutata immettendo nel sistema di reazione concentrazioni note crescenti del contaminante.

Allo scopo di valutare la cinetica di inibizione del TBT l'attività enzimatica è stata determinata in presenza di concentrazioni crescenti di ATP, nell'intervallo di concentrazioni attivanti, e in presenza e assenza di due diverse concentrazioni di TBT riscontrate inibire l'attività enzimatica. I valori di  $K_m$  e  $V_m$  sono stati calcolati attraverso i diagrammi di Lineweaver-Burk. La determinazione della costante di inibizione ( $K_i$ ) è stata attuata valutando l'attività enzimatica a diverse concentrazioni di TBT e a due diverse concentrazioni di substrato attivante ATP. Il valore di  $K_i$  è stato quindi determinato tramite il diagramma di Dixon (Dixon e Webb 1979). Anche per la Mg-ATPasi sono state condotte prove in presenza di DTE con e senza preincubazione con la frazione mitocondriale per chiarire il suo meccanismo di interazione con il TBT, con modalità simili a quelle descritte per la Na,K-ATPasi.

## **1.3 Sperimentazione in ambiente controllato**

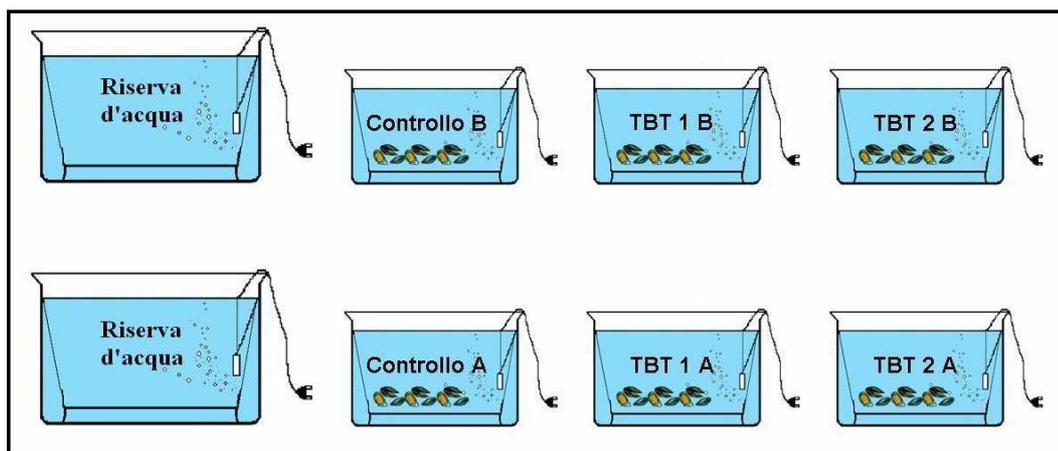
### **1.3a Modalità di conduzione della prova di esposizione al TBT, animali e campionamenti**

La sperimentazione in ambiente controllato è stata effettuata negli stabulari del Dipartimento di Biochimica “G. Moruzzi”, Sezione di Biochimica Veterinaria presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell’Università di Bologna a Ozzano Emilia.

Per la prova sono stati utilizzati mitili di taglia commerciale della specie *Mytilus galloprovincialis* di peso medio senza conchiglia di  $5,4 \pm 0.3$  g. I molluschi sono stati ottenuti dal Centro di Raccolta Molluschi di Cesenatico (FC) e quindi trasportati in contenitori refrigerati presso gli stabulari. Inizialmente circa 450 mitili sono stati suddivisi in 6 vasche posizionate in ambiente termostato alla temperatura di 18°C. Ciascuna vasca conteneva 57 litri di acqua di mare artificiale (sale Coral Life e acqua della rete idrica) alla salinità di 30‰, precedentemente preparata e areata con diffusori a pietra porosa per almeno 48 ore. In queste condizioni i mitili sono stati mantenuti per 48 ore senza alimentazione, per favorire l’acclimatazione e per consentire di individuare e eliminare eventuali esemplari deceduti in seguito a rottura del guscio e/o traumi subiti nel trasporto. Terminato il periodo di acclimatazione sono stati posti per ogni vasca 60 mitili; si è poi provveduto ad un cambio dell’acqua immettendo in ciascuna vasca 60 litri di acqua di mare artificiale precedentemente preparata e mantenuta areata in due vasche da 150 litri cadauna, indicate come riserva d’acqua in Figura 1.3a1, e all’inserimento del TBT. Considerando che tutto il TBT inserito nelle vasche venga assunto dai mitili (Guolan e Yong 1995), le concentrazioni di TBT da somministrare agli animali sono state calcolate in rapporto al peso secco dei tessuti dei mitili. Al fine di ottenere le concentrazioni desiderate è stata preparata una soluzione madre di tributilstagno cloruro (TBTCl) di 1 mg/mL in DMSO, da queste si è ottenuta una soluzione di 0,01 mg/mL in acqua ultrapura Millipore 18MΩ contenente 0,01% di DMSO. Aliquote pari a 3 e 6 mL di questa soluzione hanno permesso di ottenere le concentrazioni nominali di 0,5 e 1,0 µg/g peso secco. Durante la sperimentazione le vasche sono state posizionate come mostrato in Figura 1.3a1. Nelle vasche denominate TBT 1A e TBT 1B gli animali erano esposti ad una concentrazione nominale di TBT pari a 0,5 µg/g peso secco, mentre nelle vasche denominate TBT 2A e TBT 2B ad una concentrazione di 1,0 µg/g peso secco, erano poi presenti due vasche controllo nelle quali i mitili non erano esposti. Tutte le vasche sono state coperte con teli di plastica neri per mantenere al riparo dalla luce ed evitare immissione di materiale estraneo (polvere ecc.).

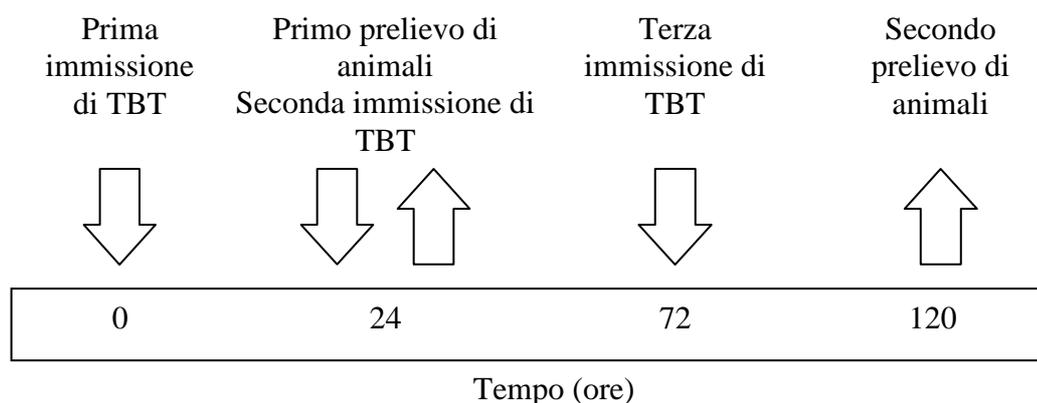
Le concentrazioni utilizzate sono state scelte in modo da riprodurre possibili condizioni di accumulo di TBT riscontrabili nell'ambiente naturale (Barroso et al. 2004; Bortoli 2003). Gli animali non sono stati alimentati ne durante il periodo di acclimatazione ne durante quello di esposizione.

Giornalmente in tutte le vasche sono state effettuate le misurazioni dei valori di pH, temperatura e ossigeno disciolto.



**Figura 1.3a1:** Disposizione delle vasche nell'esposizione in ambiente controllato

Dopo 24 ore dall'immissione della soluzione di TBT nelle vasche è stato effettuato un primo campionamento di circa 40 animali da ogni vasca. Sono poi state effettuate due ulteriori aggiunte di TBT dopo 24 e 72 ore dalla prima aggiunta, in questo caso essendo rimasti 20 animali in vasca le aliquote di TBT aggiunte in ciascuna vasca sono state ridotte a un terzo rispetto all'immissione precedente. Dopo 120 ore dalla prima aggiunta di TBT è stato eseguito un secondo campionamento finale di tutti gli animali rimasti in vasca. La conduzione dell'esperimento dal momento in cui i mitili sono stati esposti al TBT è schematizzato in Figura 1.3a2



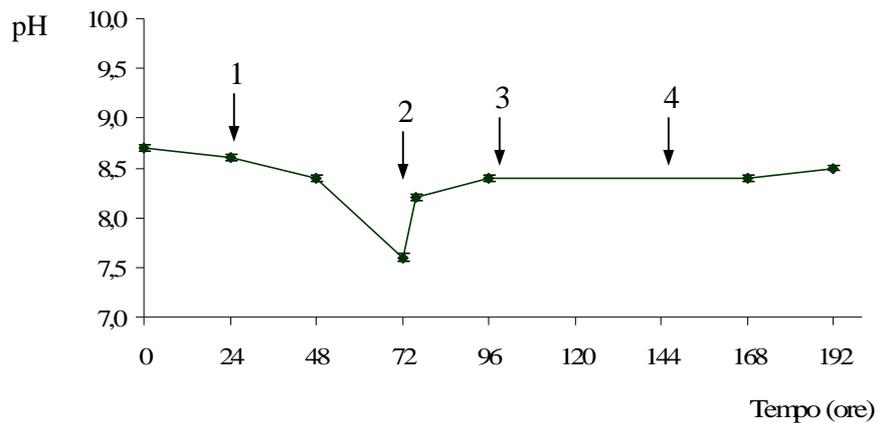
**Figura 1.3a2:** Conduzione dell'esperimento durante l'esposizione dei mitili al TBT

Per ogni campionamento gli individui di ciascuna vasca sono stati dissezionati e utilizzati in parte per la determinazione del peso, del contenuto d'acqua e dell'indice di condizione, e in parte come fonte di tessuto per la preparazione delle frazioni microsomiali e mitocondriali di branchie e mantello sulle quali sono state determinate le attività enzimatiche.

### 1.3b Analisi dell'acqua

Sulle acque di mantenimento utilizzate per le prove di esposizione dei mitili per tutto il periodo di sperimentazione sono stati determinati giornalmente mediante apparecchiature portatili: contenuto di ossigeno disciolto espresso in percentuale di saturazione (Aqualytic OX22 Oxygen meter), temperatura e pH (Knick Portamess Type 911).

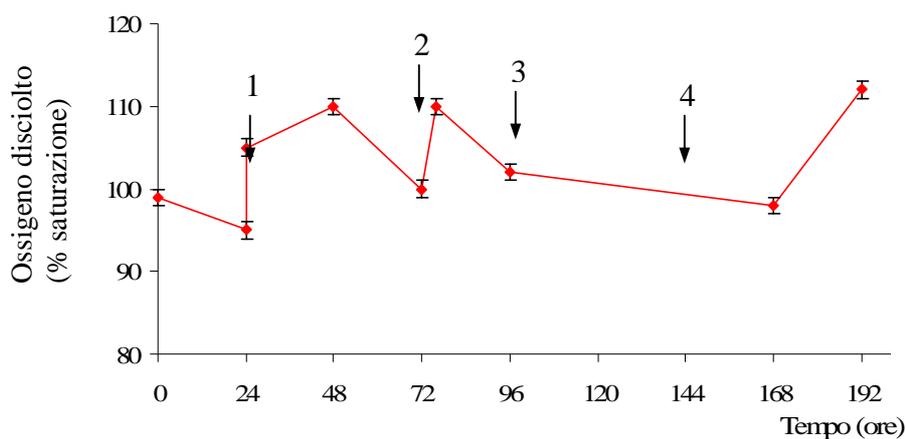
Nelle Figure 1.3b1-2-3 sono rappresentati gli andamenti dei parametri misurati durante la sperimentazione. Le variazioni riscontrate sono state trovate indipendenti dai diversi trattamenti e della stessa entità all'interno delle due replicazioni A e B di ciascun trattamento sperimentale; pertanto l'andamento mostrato rappresenta la media delle misurazioni effettuate.



**Figura 1.3b1:** Andamento del pH durante la sperimentazione in ambiente controllato

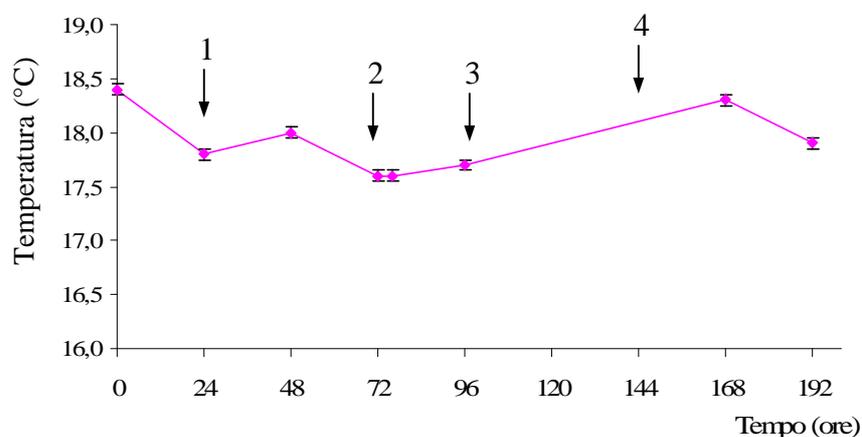
1: inserimento nelle vasche degli animali. 2: cambio dell'acqua nelle vasche e inserimento TBT. 3: campionamento animali. 4: inserimento TBT.

Si osserva che l'inserimento degli animali all'interno delle vasche (1) ha portato ad un abbassamento del pH di circa un'unità rispetto al valore iniziale, dovuto principalmente alla respirazione dei mitili con conseguente produzione di  $\text{CO}_2$ . Il cambio dell'acqua nelle vasche (2), ha portato infatti ad un innalzamento del pH, che si mantiene stabile per tutta la durata dell'esperimento di esposizione. La stabilità del valore del pH è probabilmente dovuta al fatto che dopo il primo campionamento degli animali (3), sono stati lasciati in ciascuna vasca circa un terzo degli animali totali la cui attività respiratoria in un volume d'acqua inalterato non influisce in modo significativo sul pH dell'acqua. Dalla Figura 1.3b1 si nota inoltre che l'inserimento del TBT nelle vasche non influenza il pH dell'acqua.



**Figura 1.3b2:** Andamento dell'ossigeno disciolto durante la sperimentazione in ambiente controllato  
 1: inserimento nelle vasche degli animali. 2: cambio dell'acqua nelle vasche e inserimento TBT. 3: campionamento animali. 4: inserimento TBT.

All'introduzione degli animali all'interno delle vasche (1), si nota una diminuzione del contenuto di ossigeno disciolto dell'acqua, dovuto ai processi di respirazione degli animali ai quali sono dovute probabilmente le oscillazioni riscontrate durante tutto il periodo di esposizione.



**Figura 1.3b3:** Andamento della temperatura durante la sperimentazione in ambiente controllato  
 1: inserimento nelle vasche degli animali. 2: cambio dell'acqua nelle vasche e inserimento TBT. 3: campionamento animali. 4: inserimento TBT.

Le oscillazioni di temperatura che si riscontrano in tutte le vasche indipendentemente dai trattamenti e dalle replicazioni, rientrano nelle variazioni

riscontrate nella termostatazione del locale che rispetto al valore prefissato di 18 °C, hanno mostrato oscillazioni di circa 0,5 °C.

### **1.3c Analisi sui molluschi**

#### **1.3c1 Mortalità**

Durante tutta la sperimentazione, giornalmente, è stata controllata la sopravvivenza degli animali sia nelle vasche controllo che in quelle relative ai trattamenti sperimentali allontanando gli animali morti; al termine della prova è stato effettuato il conteggio degli animali vivi e morti in modo da poter determinare la percentuale di esemplari non sopravvissuti rispetto al totale. Sono stati considerati morti, oltre agli individui che presentavano le valve aperte, anche quelli che sottoposti ad una leggera percussione non reagivano con la chiusura delle valve.

#### **1.3c2 Indice di condizione**

Questo parametro, che definisce il riempimento della conchiglia da parte dei tessuti molli dell'animale, è stato valutato al termine della prova sperimentale per ciascun trattamento e per il controllo. In considerazione del fatto che l'I.C. su materiale secco può essere ritenuto più attendibile di quello su materiale fresco in quanto svincolato dal contenuto d'acqua (Seed e Suchanek, 1992), variabile anch'esso in dipendenza del ciclo biologico e stagionale (A.A.VV. 1990). I dati riportati sono stati calcolati in base alla formula:

$$\text{INDICE DI CONDIZIONE} = \frac{\text{Peso secco (g)} \times 1000}{\text{Volume intervalvare (mL)}}$$

Il volume intervalvare è stato determinato per differenza, misurando in un cilindro da 100 mL riempito per metà d'acqua, la variazione di livello prodotta dall'immissione di 3 animali con le valve chiuse di ciascun pool e successivamente delle stesse aperte dopo dissezione dei tessuti molli. Per ciascun pool di animali è stata utilizzata quindi la formula sopra citata, considerando il peso secco determinato gravimetricamente per gli stessi animali.

### 1.3c3 Contenuto d'acqua

**Tre animali per ciascun pool, privati del guscio ed asciugati su carta assorbente sono stati posti in recipienti idonei (pesafiltri) precedentemente portati a peso costante a 110°C. Dopo essere stati pesati e posti in stufa a 110°C per 24 ore il residuo fisso è stato valutato con successive pesate fino a peso costante, previo raffreddamento in essiccatore. Il contenuto di acqua, valutato per differenza tra la prima e l'ultima pesata, è stato espresso come percentuale su materiale fresco.**

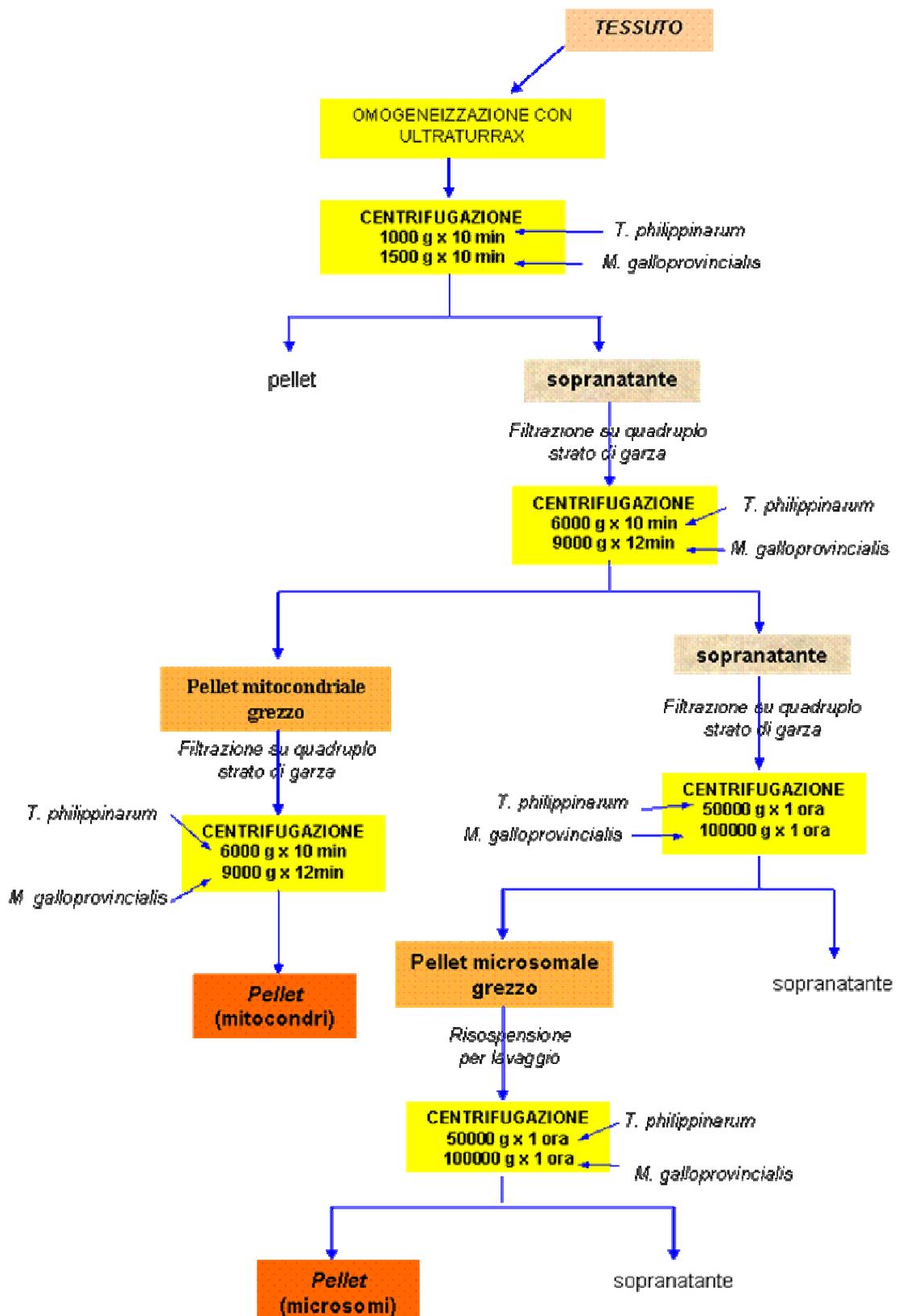
### 1.4 Preparazione delle frazioni microsomale e mitocondriale

Le metodologie descritte in questa sezione, come pure nelle sezioni 1.5, 1.6 limitatamente alla descrizione dell'attività ATPasica, e 1.7 sono state utilizzate sia nelle prove *in vivo* che *in vitro*.

Dagli animali, aperte le valve, sono stati prelevati branchie e mantello che sono stati lavati ripetutamente con medium A (saccarosio 0,25 M, Tris-EDTA 5 mM, pH 7,4).

Per ottenere le frazioni microsomale e mitocondriale i tessuti sono stati omogeneizzati nelle proporzioni di 11 ml di medium B (saccarosio 0,25 M, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, BSA 0,5 g/L, Tris 24 mM, pH 7,6) per ogni grammo di tessuto con Ultra-turrax T25 IKA-Labortechnik a diverse velocità a seconda della specie considerata. Per *Tapes philippinarum* l'omogeneizzazione è stata fatta ad una velocità di 25000 rpm per le branchie e di 18000 rpm per il mantello. Per *Mytilus galloprovincialis* entrambi i tessuti sono stati omogeneizzati ad una velocità di 14000 rpm. L'omogenato è stato poi sottoposto a centrifugazione frazionata (centrifuga Sorvall RC2-B, rotore SS34 e centrifuga Beckman Optima LE-80K, rotore 50.2) secondo lo schema riportato in Figura 1.4a utilizzando sempre medium B tranne che nella risospensione del pellet microsomale, per cui è stato utilizzato il medium A.

Ultimata la procedura di preparazione, i pellet microsomale e mitocondriale sono stati risospesi in piccole quantità, rispettivamente, di medium A e B, e omogenizzati con omogenizzatore Potter-Elvehjem. Tutte le operazioni sono state condotte a 0-4°C. Le preparazioni sono state conservate in provette Eppendorf da 1,5 ml in N<sub>2</sub> liquido fino al momento delle analisi.

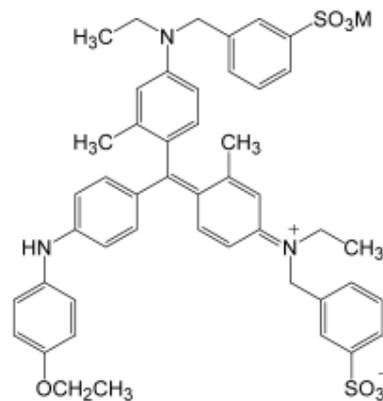


**Figura 1.4a:** Schema per la preparazione delle frazioni microsomiali e mitocondriale di branchie e mantello per *M.galloprovincialis* e *T. philippinarum*

## 1.5 Determinazione del contenuto di proteina

Sulle frazioni microsomiali e mitocondriali la determinazione del contenuto di proteina è stata effettuata con il metodo colorimetrico di Bradford (1976) utilizzando il kit Bio-Rad Protein Assay.

**Tale metodo si basa sul fatto che il colorante Comassie Brilliant Blue G 250 (Figura 1.5a) in soluzione acida legandosi alle proteine, mediante interazioni elettrostatiche con gruppi amminici e carbossilici e forze di Van der Waals, produce uno spostamento del suo massimo di assorbimento da 465 nm a 595 nm, consentendo determinazioni quantitative.**



**Figura 1.5a:** Struttura del colorante Comassie Brilliant Blue G 250

A 10  $\mu\text{L}$  di campione vengono aggiunti 90  $\mu\text{L}$  di acqua e 5 mL di reattivo, diluito 1:5 dalla soluzione commerciale concentrata. L'assorbanza a 595 nm viene letta da 5 a 60 minuti dopo aggiunta del reattivo, periodo in cui la colorazione rimane stabile, utilizzando come bianchi soluzioni contenenti 100  $\mu\text{L}$  di acqua e 5 mL di reattivo. La concentrazione di proteina viene determinata interpolando il valore di assorbanza letto su una retta di taratura preparata utilizzando soluzioni a concentrazione nota di albumina di siero bovino.

## 1.6 Determinazione delle attività ATPasiche

### 1.6a Attività ATPasiche Na-dipendenti

#### 1.6a1 Determinazione delle attività enzimatiche

Le determinazioni dell'attività della Na,K-ATPasi sensibile all'ouabaina e della Na-ATPasi insensibile all'ouabaina sono state effettuate a 30°C, in un sistema di reazione di 1 mL contenente Hepes 75 mM, portato al pH necessario con aggiunte di (idrossimetil)-amminometano (Tris), MgATP, e cationi monovalenti immessi nel sistema sotto forma di sali cloruro. La reazione è stata fatta avvenire nelle condizioni di saggio precedentemente determinate come ottimali per ciascun tessuto ed attività enzimatica nel laboratorio in cui è stata svolta la presente ricerca e riportate in Tabella 1.6a1a.

	Na,K-ATPasi				Na-ATPasi		
	pH	MgATP (mM)	Na <sup>+</sup> (mM)	K <sup>+</sup> (mM)	pH	MgATP (mM)	Na <sup>+</sup> (mM)
<i>Tapes philippinarum</i>							
Branchie	7,0	3,0	100,0	10,0	7,5	5,0	80,0
Mantello	7,0	2,0	10,0	10,0	7,0	1,0	50,0
<i>Mytilus galloprovincialis</i>							
Branchie	7,5	2,0	80,0	12,5	6,5	2,0	50,0
Mantello	7,5	2,0	20,0	12,5	6,5	2,0	150,0

**Tabella 1.6a1a:** Condizioni ottimali di saggio delle attività ATPasiche microsomiali Na-dipendenti.

Al sistema di reazione sono stati aggiunti 50-100 µL di sospensione microsomale appena scongelata ottenendo una concentrazione di proteina nel sistema nell'intervallo di 0,1 – 0,4 mg/mL, ambito in cui precedentemente era stata verificata la linearità dell'attività enzimatica nelle condizioni sperimentali adottate e la buona leggibilità del campione allo spettrofotometro.

Dopo 10 minuti di preriscaldamento del sistema la reazione enzimatica è stata fatta partire dall'aggiunta di MgATP e bloccata dopo 10 minuti per aggiunta di 1 mL di acido tricloroacetico freddo al 15% (p/v). Le due attività ATPasiche sono state poi valutate per differenza: la Na,K-ATPasi dalla differenza tra il Pi idrolizzato in presenza di Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e in assenza di K<sup>+</sup>, uguale alla differenza valutata tra il Pi idrolizzato sempre in presenza di Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e in assenza e presenza di ouabaina 1 mM, suo inibitore specifico. L'attività Na-ATPasica è stata valutata dalla differenza tra il Pi idrolizzato in assenza e in presenza di Na<sup>+</sup>, in ambedue i casi in presenza di ouabaina 1 mM nel sistema di reazione, tale concentrazione, inibendo al 100% la Na,K-ATPasi ouabaina-sensibile, consente di eliminare possibili interferenze e sovrapposizioni di quest'ultima attività enzimatica (Pagliarani et al. 1996).

## **1.6a2 Prove *in vitro* di interazione con $\text{NH}_4^+$**

### **Sostituibilità dei cationi attivanti**

Le curve di dipendenza delle attività enzimatiche in funzione della concentrazione  $\text{K}^+$  o  $\text{NH}_4^+$  per la Na,K-ATPasi, e di  $\text{Na}^+$  o  $\text{NH}_4^+$  per l'ATPasi insensibile all'ouabaina, sono state costruite aggiungendo al sistema di reazione concentrazioni crescenti dei cationi monovalenti in assenza dello ione sostituito e mantenendo invariati di tutti gli altri componenti del sistema. I cationi monovalenti sono stati aggiunti al sistema di reazione tramite piccole aliquote ( $< 50 \mu\text{L}$ ) come sali cloruro in soluzione acquosa nell'intervallo di concentrazioni 0-20 mM per le branchie e 0-200 mM per il mantello. Le cinetiche di attivazione di ogni catione monovalente attivante sono state saggiate calcolando la pendenza della retta ( $n_h$ ) dei diagrammi di Hill. I valori di  $K_m$  sono stati calcolati attraverso i diagrammi di Lineweaver-Burk.

### **Sensibilità all'ouabaina**

Nelle prove in cui è stata saggiata la sensibilità all'ouabaina delle due attività enzimatiche in presenza di  $\text{NH}_4^+$  come catione sostituito del  $\text{K}^+$  nella Na,K-ATPasi e del  $\text{Na}^+$  nella Na-ATPasi, nei sistemi di reazione preparati come descritto sopra sono state aggiunte quantità crescenti di ouabaina in concentrazioni comprese tra  $10^{-9}$  e  $10^{-2}$  M per quanto riguarda la Na,K-ATPasi, mentre nelle prove riguardanti la Na-ATPasi le concentrazioni di ouabaina saggiate erano comprese nell'intervallo  $10^{-7}$  e  $10^{-2}$  M.

## **1.6a3 Prove *in vitro* di interazione con i composti organostannici**

### **Interazione con i composti organostannici**

La risposta delle due attività enzimatiche Na-dipendenti ai composti organostannici è stata saggiata aggiungendo al sistema di reazione, contenente la frazione microsomale, concentrazioni crescenti di TBT, DBT, MBT e TeET in soluzione acquosa (acqua Millipore 18 M $\Omega$  contenente 0,01-10% v/v DMSO). Prove preliminari avevano mostrato che entrambe le attività ATPasiche non sono inibite dalle concentrazioni finali di DMSO utilizzate nel sistema di reazione.

## **Ditioli e inibizione enzimatica da TBT**

Le prove in presenza di DTE sono state effettuate con le seguenti modalità:

1. Immissione simultanea di TBT e DTE nel sistema di reazione. In questo caso il DTE è stato inserito a concentrazioni crescenti nell'intervallo 1-10  $\mu\text{M}$  in presenza di una concentrazione costante di TBT di 34,5  $\mu\text{M}$ .
2. Preincubazione di DTE con la frazione microsomale alle due concentrazioni di 10  $\mu\text{M}$  per un tempo di 5 minuti e TBT 34,5  $\mu\text{M}$  immesso nel sistema di reazione. Prove preliminari avevano dimostrato che il tempo di incubazione saggiato nell'intervallo da 1 a 10 minuti non modificava l'effetto del DTE.

## **1.6b Attività ATPasica mitocondriale Mg-dipendente**

### **1.6b1 Caratterizzazione dell'attività ATPasica**

Per rendere possibile la determinazione della Mg-ATPasi mitocondriale sono state inizialmente determinati la sensibilità all'oligomicina e i parametri ottimali di saggio (vedi risultati). La sensibilità all'oligomicina è stata valutata aggiungendo al sistema di reazione concentrazioni crescenti dell'inibitore, solubilizzato in DMSO, nell'intervallo di 1,0-10,0  $\mu\text{g/mL}$ . I parametri di saggio quali pH, concentrazione di  $\text{MgCl}_2$  e di substrato attivante ATP, sono stati valutati facendo svolgere la reazione in presenza e assenza di oligomicina e variando un parametro alla volta in presenza di concentrazioni costanti degli altri effettori. La dipendenza dei parametri di saggio è stata valutata nei seguenti intervalli:  $\text{MgCl}_2$  0,0-15,0 mM e  $\text{Na}_2\text{ATP}$  1,0-8,0 mM, aggiungendo concentrazioni crescenti degli effettori, pH 7,0-10,0, utilizzando due diversi sistemi tampone e precisamente Hepes 75 mM-Tris, Etanolamina 75 mM-HCl. Individuati i valori ottimali dei singoli parametri le determinazioni sono state ripetute variando un parametro alla volta in presenza di valori costanti e ottimali degli altri effettori.

### **1.6b2 Determinazione dell'attività enzimatica**

La determinazione dell'attività Mg-ATPasica è stata effettuata a 30°C in un sistema di reazione di 1 mL. Durante la determinazione dell'attività enzimatica al sistema di reazione sono stati aggiunti 10-15  $\mu\text{L}$  di sospensione mitocondriale appena scongelata ottenendo una concentrazione di proteina nel sistema nell'intervallo di 0,06 –

0,08 mg/mL, ambito in cui precedentemente era stata verificata la linearità dell'attività enzimatica nelle condizioni sperimentali adottate e la buona leggibilità del campione allo spettrofotometro.

Dopo 10 minuti di preriscaldamento del sistema (descritto in sezione 2.1b2) alla temperatura di reazione, la reazione enzimatica è stata fatta partire dall'aggiunta di  $\text{Na}_2\text{ATP}$  e bloccata dopo 5 minuti per aggiunta di acido tricloroacetico freddo al 15% (p/v). L'attività enzimatica oligomicina-sensibile viene valutata dalla differenza tra il Pi idrolizzato in assenza e presenza di oligomicina. Tale concentrazione inibendo completamente l'attività ATPasica Mg-dipendente mitocondriale, permette di eliminare eventuali interferenze imputabili ad altre attività ATPasiche Mg-dipendenti.

### **1.6b3 Prove *in vitro* di interazione con il TBT**

#### **Interazione con il TBT**

Le prove per saggiare la risposta dell'attività enzimatica al TBT sono state condotte inserendo concentrazioni crescenti di tale composto (soluzione in acqua Millipore 18 M $\Omega$  contenente 0,01- 10% v/v DMSO) al sistema di reazione. Prove preliminari avevano mostrato che l'attività ATPasica non viene inibita dalle concentrazioni finali di DMSO utilizzate nel sistema di reazione.

La cinetica di interazione del TBT con l'enzima è stata studiata valutando l'attività enzimatica in presenza di due diverse concentrazioni di contaminante (per il mantello 0,17  $\mu\text{M}$  e 0,35  $\mu\text{M}$ , per le branchie 0,17  $\mu\text{M}$  e 0,52  $\mu\text{M}$ ) e in assenza di esso, a concentrazioni attivanti del substrato ATP nell'intervallo di concentrazioni 0,2-4,0 mM. La cinetiche di attivazione da parte dell'ATP alle diverse concentrazioni di TBT sono state saggiate calcolando la pendenza della retta ( $n_h$ ) dei diagrammi di Hill.

I valori di  $K_m$  e  $V_m$  sono stati quindi calcolati attraverso i diagrammi di Linweaver-Burk.

La  $K_i$  è stata valutata dalla costruzione dei diagrammi di Dixon (Dixon e Webb 1979). A tal fine sono stati aggiunti al sistema di reazione concentrazioni di TBT comprese nell'intervallo 0,0-0,6  $\mu\text{M}$  in presenza di due diverse concentrazioni del substrato attivante ATP, 5,0 mM e 2,5 mM per le branchie e 4,0 mM e 3,0 mM per il mantello.

#### **Ditioli e inibizione enzimatica da TBT**

Le prove in presenza di DTE sono state effettuate con le due modalità distinte:

1. Immissione simultanea di TBT e DTE nel sistema di reazione. Il DTE è stato immesso a concentrazioni crescenti nell'intervallo 1-20  $\mu\text{M}$  in presenza di una concentrazione costante di TBT di 0,6  $\mu\text{M}$ .
2. Preincubazione di DTE con la frazione mitocondriale alle due concentrazioni di 10 e 50  $\mu\text{M}$  per un tempo di 5 minuti e TBT 0,6  $\mu\text{M}$  nel sistema di reazione. Prove preliminari avevano dimostrato che il tempo di incubazione saggiato nell'intervallo da 1 a 10 minuti non modificava l'effetto del DTE.

### 1.6c Principio del metodo colorimetrico adottato

Tutte le determinazioni delle attività ATPasiche considerate nella presente ricerca si basano sulla valutazione del fosfato inorganico (Pi) liberato nel tempo prefissato da una quantità nota di proteina microsomale o mitocondriale dopo lo svolgimento della reazione ATPasica. Il Pi è stato determinato spettrofotometricamente secondo i principi del metodo di Fiske e Subbarow (1925). Prove preliminari avevano dimostrato in tutti i casi una relazione lineare tra il Pi liberato ed il tempo di incubazione nelle condizioni sperimentali adottate. Tale metodo colorimetrico, comunemente adottato per la determinazione quantitativa dei fosfati, si basa sulla riduzione dei complessi fosfomolibdici a blu di molibdeno: il Pi in soluzione acquosa forma con il reagente molibdico, costituito da molibdato di ammonio al 2,5% in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10% (v/v), complessi fosfomolibdici acidi incolori, che diventano azzurri (blu di molibdeno) dopo riduzione con acido 1,2,4, aminonaftalensolfonico in ambiente acido (Mondovì 1977). Dopo 20 minuti di tempo in cui avviene la stabilizzazione del colore, si legge l'assorbanza a  $\lambda = 730 \text{ nm}$ , e si calcola la concentrazione di Pi utilizzando opportuni standard a concentrazione nota. Le attività ATPasiche sono state quindi espresse in  $\mu\text{moli}$  di fosforo (Pi) liberato in 1 ora da 1 mg di proteina ( $\mu\text{moli Pi} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{ora}^{-1}$ ). Per ciascun gruppo o prova sperimentale sono state effettuate almeno 3 determinazioni di attività ATPasica.

### 1.7 Statistica

I dati riportati nelle figure e tabelle sono stati espressi come *media*  $\pm$  *errore standard* (ES). Ogni dato rappresenta la media delle determinazioni effettuate per ciascun parametro secondo quanto precisato nei paragrafi relativi. Nelle figure ES è rappresentato come segmento verticale. Eventuali differenze da quanto sopra esposto sono riportate nelle didascalie delle figure e tabelle.

La significatività delle differenze è stata valutata mediante test del t di Student per i confronti a coppie, mentre per confrontare tre gruppi di dati è stata utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA) seguita da test di Student-Newman-Keuls quando sono state evidenziate differenze significative. Nel caso di dati percentuali è stata effettuata la trasformazione in valori angolari,  $\arcsin \sqrt{\%}$  per assicurare la normalità prima di sottoporre i dati a test statistico. In tutti i casi è stato utilizzato il livello di significatività  $p \leq 0,05$ .

## **2. Risultati**

### **2.1 Sperimentazione *in vitro***

Come riportato nella sezione materiali e metodi le prove *in vitro* effettuate hanno seguito due diversi approcci, volti rispettivamente a saggiare :A) l'interazione dello ione  $\text{NH}_4^+$  con le ATPasi Na-dipendenti microsomiali e B) la risposta ai composti organostannici delle due ATPasi Na-dipendenti e della Mg-ATPasi mitocondriale

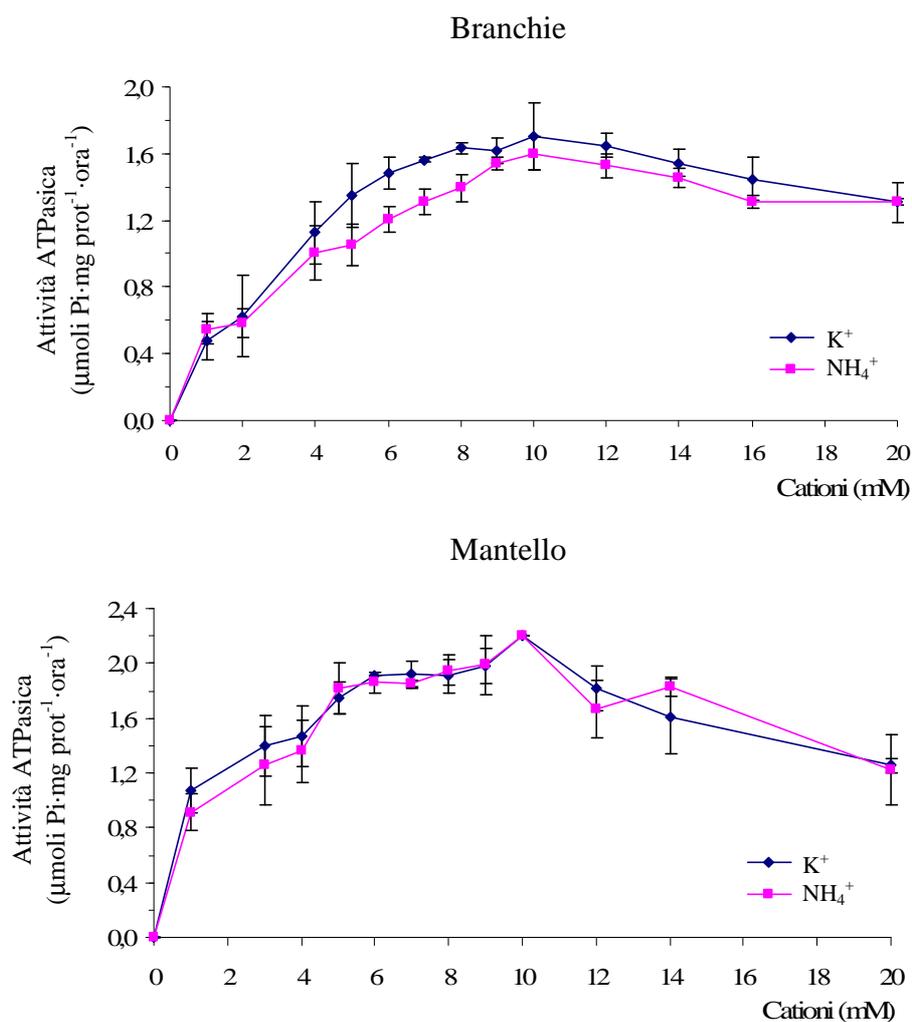
Per chiarezza di esposizione i risultati verranno di seguito descritti seguendo questa suddivisione.

#### **2.1a Interazione delle ATPasi Na-dipendenti con $\text{NH}_4^+$**

##### **2.1a1 Sostituibilità dei cationi attivanti**

Per comprendere i motivi che ci hanno indotto ad effettuare queste prove occorre precisare che prove precedenti, svolte nell'ambito della ricerca oggetto della tesi di laurea, avevano dimostrato in *Tapes philippinarum*, che lo ione  $\text{NH}_4^+$  è in grado di sostituire il catione attivante  $\text{K}^+$ , ma non il  $\text{Na}^+$ , nell'attivazione della Na,K-ATPasi, e il  $\text{Na}^+$  in quella della ATPasi insensibile all'ouabaina. Tali prove di sostituibilità, condotte aggiungendo nei sistemi di reazione concentrazioni di  $\text{NH}_4^+$  pari a quelle utilizzate per i classici cationi attivanti le due attività ATPasiche, non avevano mostrato differenze significative nell'attività enzimatica quando era attivata da  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$  o da  $\text{Na}^+ + \text{NH}_4^+$  nel caso dell'ATPasi sensibile all'ouabaina, o da  $\text{Na}^+$  o indifferentemente da  $\text{NH}_4^+$  nel caso dell'ATPasi insensibile all'ouabaina.

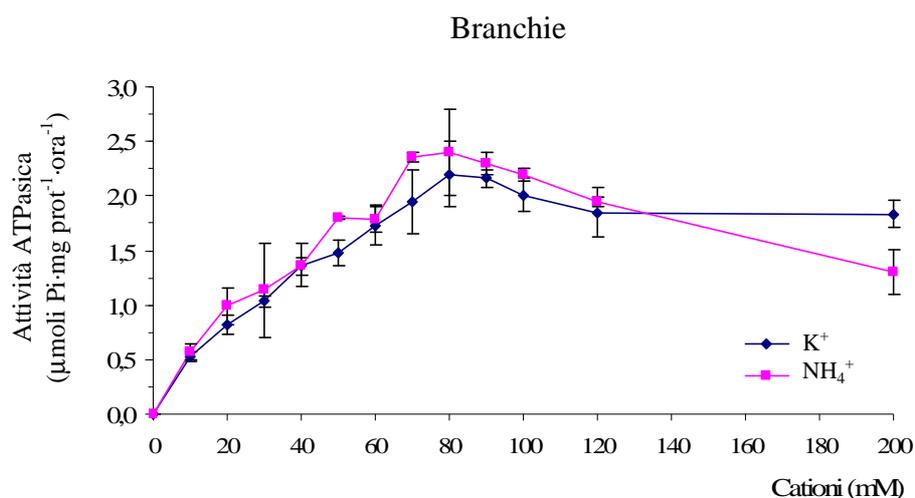
In questa ricerca, per approfondire le conoscenze sulla capacità dello ione ammonio di attivare le due ATPasi Na-dipendenti, sono state costruite le curve di dipendenza delle due attività enzimatiche da concentrazioni crescenti di  $\text{NH}_4^+$ , rispettivamente in sostituzione del  $\text{K}^+$  per la Na,K-ATPasi e del  $\text{Na}^+$  per la ATPasi insensibile all'ouabaina.



**Figura 2.1a1a:** Attivazione della Na,K-ATPasi da parte di K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in branchie e mantello di *T. philippinarum*

Come mostrato in Figura 2.1a1a, sia nelle branchie (riquadro superiore) che nel mantello (riquadro inferiore), non solo la massima attivazione della Na,K-ATPasi avviene alle stesse concentrazioni di K<sup>+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ma entrambe le curve di dipendenza appaiono sovrapposte in tutto l'intervallo di concentrazioni saggate.

Questa osservazione risulta valida anche per l'attivazione da Na<sup>+</sup> o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dell'ATPasi insensibile all'ouabaina di branchie (Figura 2.1a1b). Nel mantello la bassa e poco riproducibile attività della Na-ATPasi non ha permesso, come in precedenza, di valutare un possibile effetto dello ione ammonio sull'attivazione dell'attività enzimatica.



**Figura 2.1a1b:** Attivazione della Na-ATPasi insensibile all'ouabaina da  $\text{Na}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  in branchie di *T. philippinarum*

Questo approccio sperimentale ci ha inoltre permesso di calcolare i parametri cinetici quali coefficiente di Hill ( $n_h$ ) e  $K_m$  per l'attivazione dell'enzima da parte dei cationi monovalenti.

Come si può vedere in Tabella 2.1a1a, indipendentemente dal catione attivante considerato, le cinetiche di attivazione di entrambe le attività enzimatiche seguono la cinetica micheliana con valori di  $n_h$  prossimi all'unità.

I valori di  $K_m$  ottenuti sono sostanzialmente simili ( $p \leq 0,05$ ), indicando per la Na,K-ATPasi una pari affinità per i due cationi attivanti,  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ , in presenza di una concentrazione costante e ottimale di  $\text{Na}^+$ , sia nelle branchie che nel mantello. Lo stesso risultato si ottiene per l'attivazione della Na-ATPasi da parte di  $\text{Na}^+$  o  $\text{NH}_4^+$ , dove i valori di  $K_m$  per l'attivazione da parte dei due cationi non risultano significativamente diversi ( $p \leq 0,05$ ).

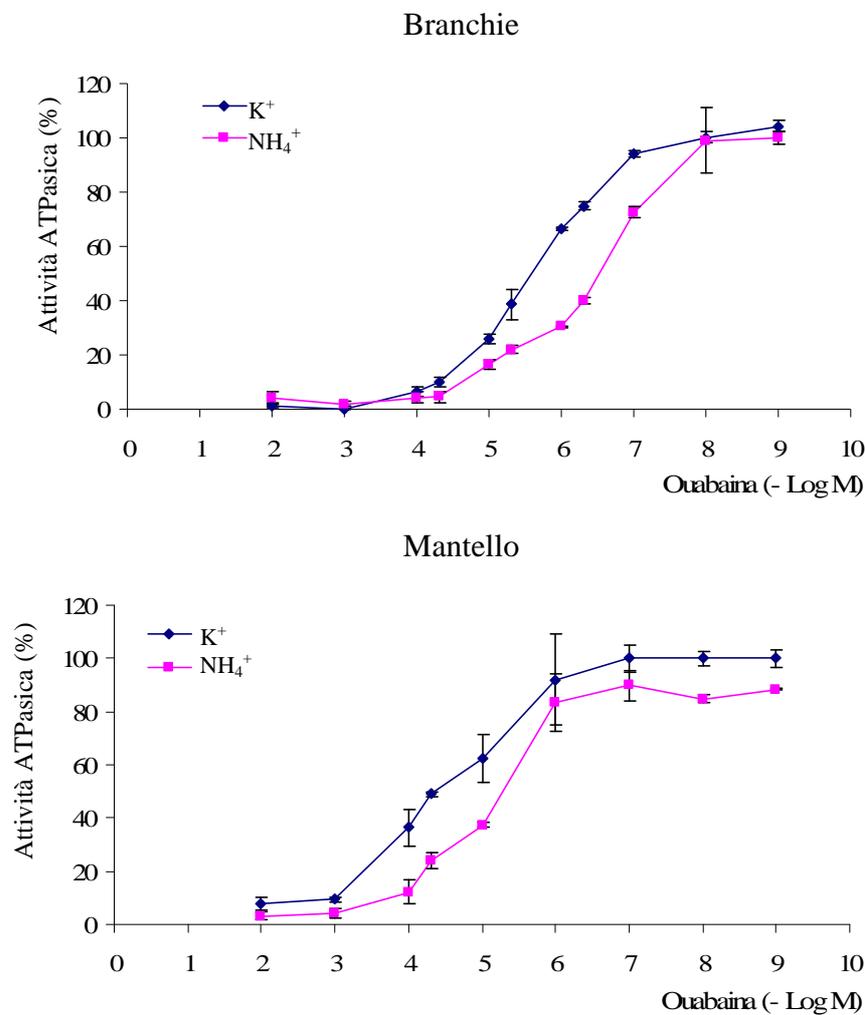
Cationi monovalenti	Na,K-ATPasi		Na-ATPasi	
	$\text{Na}^+ + \text{K}^+$	$\text{Na}^+ + \text{NH}_4^+$	$\text{Na}^+$	$\text{NH}_4^+$
Branchie	$n_h$	$1,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$ $1,2 \pm 0,1$
	$K_m$	$3,6 \pm 1,0$	$2,9 \pm 0,7$	$37,5 \pm 1,7$ $35,5 \pm 3,5$
Mantello	$n_h$	$1,3 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,4$	Non determinabile
	$K_m$	$1,2 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,3$	

**Tabella 2.1a1a:** Coefficienti di Hill ( $n_h$ ) e valori di  $K_m$  (mM) per i cationi attivanti le attività ATPasiche

### 2.1a2 Sensibilità all'ouabaina

La diversa sensibilità al glicoside ouabaina è considerata una delle principali caratteristiche distintive tra le due coesistenti attività ATPasiche microsomiali Mg-dipendenti (Caruso-Neves et al. 2004; Proverbio et al. 1991; Ventrella et al. 1987; Borgatti et al. 1985).

I risultati delle prove condotte al fine di valutare se l'attività Na,K-ATPasica attivata da  $\text{NH}_4^+$  ha la stessa sensibilità all'ouabaina rispetto all'attivazione con il catione classico  $\text{K}^+$ , e se la coesistente attività Na-ATPasica attivata da  $\text{Na}^+$  o  $\text{NH}_4^+$  mantiene la sua tipica refrattarietà al glicoside a concentrazioni che inibiscono totalmente la Na,K-ATPasi, sono mostrati nelle Figure 2.1a2a e 2.1a2b. Le attività ATPasiche sono espresse come % dell'attività enzimatica valutata in assenza di inibitore.



**Figura 2.1a2a:** Risposta all'ouabaina della Na,K-ATPasi attivata da  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  in branchie e mantello di *T. philippinarum*

Le curve delle attività ATPasiche in presenza di concentrazioni crescenti di inibitore mostrano un andamento sigmoidale in entrambi i tessuti. La completa inibizione dell'attività enzimatica è stata riscontrata alla concentrazione di ouabaina  $10^{-3}$  M sia che l'enzima sia attivato da  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$  o  $\text{Na}^+ + \text{NH}_4^+$ .

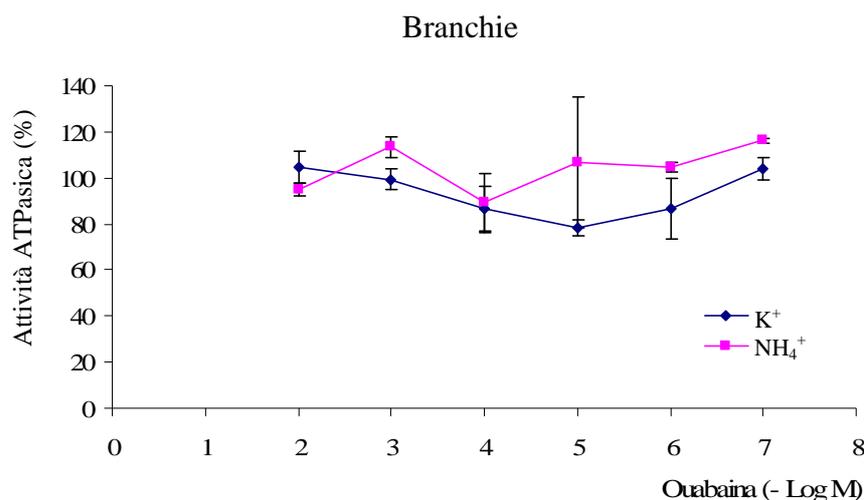
Interpolando graficamente le curve mostrate in Figura 2.1a2a sono stati ottenuti i valori di  $I_{50}$  mostrati in Tabella 2.1a2a.

I valori di  $I_{50}$  rappresentano un indice per definire la sensibilità dell'enzima all'inibitore.

Catione monovalente	Branchie	Mantello
$\text{Na}^+ + \text{K}^+$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$6,0 \cdot 10^{-5}$
$\text{Na}^+ + \text{NH}_4^+$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$6,0 \cdot 10^{-6}$

**Tabella 2.1a2a:** Valori di  $I_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) della Na,K-ATPasi attivata da  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$  o  $\text{Na}^+ + \text{NH}_4^+$

Tali dati sembrano mostrare che in entrambi i tessuti l'attivazione dell'attività Na,K-ATPasica da parte dell' $\text{NH}_4^+$  al posto del  $\text{K}^+$  aumenti la sensibilità dell'enzima all'ouabaina. Nonostante si ottenga infatti l'inibizione del 100% dell'attività enzimatica in entrambi i tessuti alla stessa concentrazione di ouabaina, i valori di  $I_{50}$  sono dieci volte più bassi quando lo ione potassio è sostituito dallo ione ammonio. Considerando inoltre i valori più bassi di  $I_{50}$  ottenuti per i due tessuti, l'attività enzimatica sembra risultare maggiormente sensibile all'inibitore nelle branchie che nel mantello.



**Figura 2.1a2b:** Risposta all'ouabaina della Na-ATPasi insensibile all'ouabaina attivata da  $\text{Na}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  in branchie di *T. philippinarum*

Nel caso della Na-ATPasi insensibile all'ouabaina, la sua tipica refrattarietà al glicoside appare inalterata indipendentemente dal catione attivante. L'attività ATPasica non appare infatti inibita dall'ouabaina nell'intervallo delle concentrazioni saggate, fino a  $10^{-2}$  M.

## 2.1b Risposta delle attività enzimatiche ai composti organostannici

### 2.1b1 Attività ATPasiche Na-dipendenti

Le attività ATPasiche Na-dipendenti sono state determinate, in preparazioni microsomiali di branchie e mantello di *T. philippinarum* e *M. galloprovincialis*, nelle condizioni di saggio ottimali.

Prima di considerare l'effetto dei composti organostannici sulle attività ATPasiche Na-dipendenti in studio è stato ritenuto opportuno riportare le attività enzimatiche medie riscontrate nelle preparazioni utilizzate in queste prove, in assenza di contaminanti (Tabella 2.1b1a), anche perché per agevolare il confronto, nelle figure successive le attività ATPasiche sono riportate in percentuale dell'attività riscontrata in assenza di contaminante.

	Na,K-ATPasi		Na-ATPasi	
	Branchie	Mantello	Branchie	Mantello
<i>T. philippinarum</i>	2,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1	n.d.
<i>M. galloprovincialis</i>	1,2 ± 0,1	2,3 ± 0,2	5,0 ± 0,3	12,1 ± 1,7

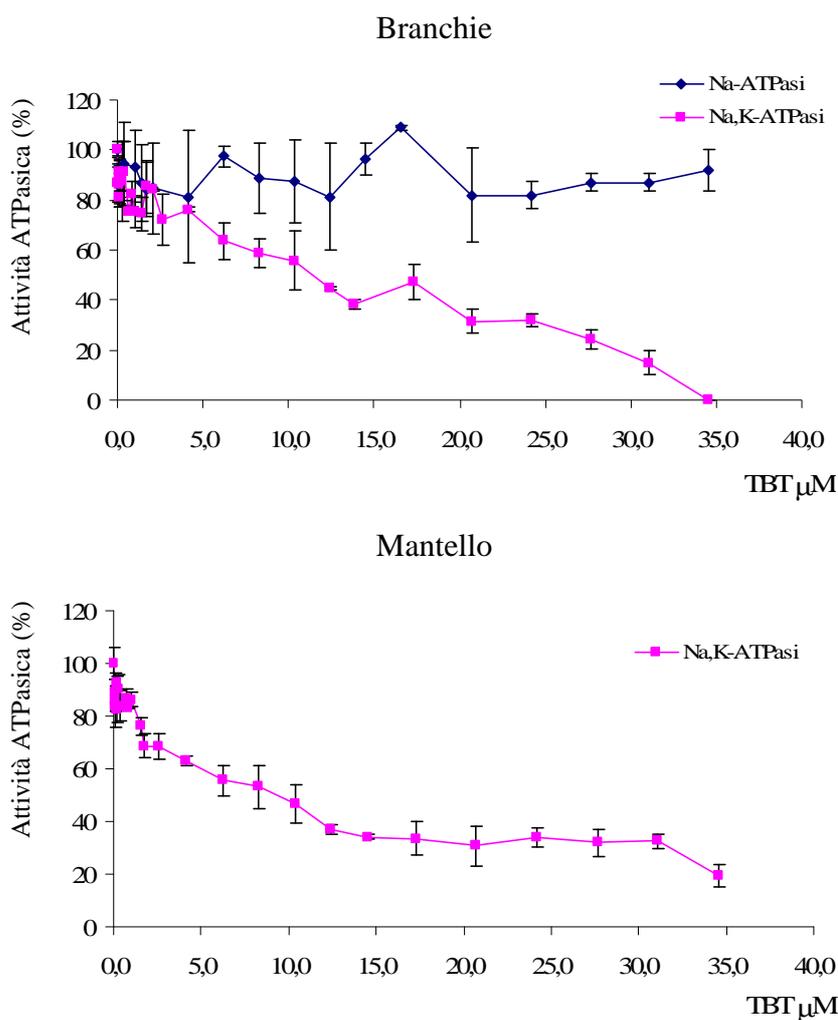
**Tabella 2.1b1a:** Attività ATPasiche ( $\mu\text{moli Pi}\cdot\text{mg proteina}^{-1}\cdot\text{ora}^{-1}$ )  
n.d.: non determinabile

Come già osservato in precedenza (Pagliarani et al. 1996), i tessuti di mitilo hanno un'attività Na-ATPasica particolarmente elevata e molto superiore a quella della coesistente Na,K-ATPasi. Nelle preparazioni microsomiali di branchie di vongola la Na-ATPasi ha invece mostrato attività minore della Na,K-ATPasi, mentre nel mantello, almeno nelle preparazioni utilizzate nella presente ricerca, è risultata essere non determinabile e quindi non utilizzabile per saggiare l'effetto di composti organostannici.

### Interazione con i composti organostannici

Sono state saggiate varie concentrazioni di stagno tributile (TBT) e derivati sulle attività ATPasiche Na-dipendenti di *T. philippinarum* con le modalità riportate nella sezione 1.6a3.

I risultati di tali prove sono mostrati in Figura 2.1b1a.



**Figura 2.1b1a:** Risposta al TBT della Na,K-ATPasi e Na-ATPasi in branchie e mantello di *T. philippinarum*

L'attività Na,K-ATPasica di branchie (riquadro superiore) risulta essere proporzionalmente inibita all'aggiunta di concentrazioni crescenti di TBT fino a raggiungere l'inibizione totale dell'attività enzimatica ad una concentrazione di contaminante pari a 34,4  $\mu\text{M}$ . Il valore di  $I_{50}$ , ottenuto attraverso interpolazione grafica, è di 12  $\mu\text{M}$ , che corrisponde approssimativamente a 3,5 ppm.

L'attività Na-ATPasica di branchie in *T. philippinarum* è invece risultata refrattaria all'aggiunta di concentrazioni crescenti di TBT; anche concentrazioni che inibiscono completamente la Na,K-ATPasi non hanno alcun effetto sulla Na-ATPasi.

Nel mantello (riquadro inferiore) la massima concentrazione saggiata di contaminante di 34,4  $\mu\text{M}$  provoca un'inibizione della Na,K-ATPasi pari all'80% dell'attività determinata in assenza di contaminante. Il valore di  $I_{50}$  ottenuto per interpolazione grafica è di 8,0  $\mu\text{M}$  che corrisponde approssimativamente a 2,3 ppm.

Per agevolare il confronto tra la risposta della Na,K-ATPasi al TBT nei due tessuti di *T. philippinarum* è stata considerata la più bassa dose di contaminante che produce un'inibizione significativa dell'attività enzimatica e i valori di  $I_{50}$ . Questi parametri sono riportati in Tabella 2.1b1b.

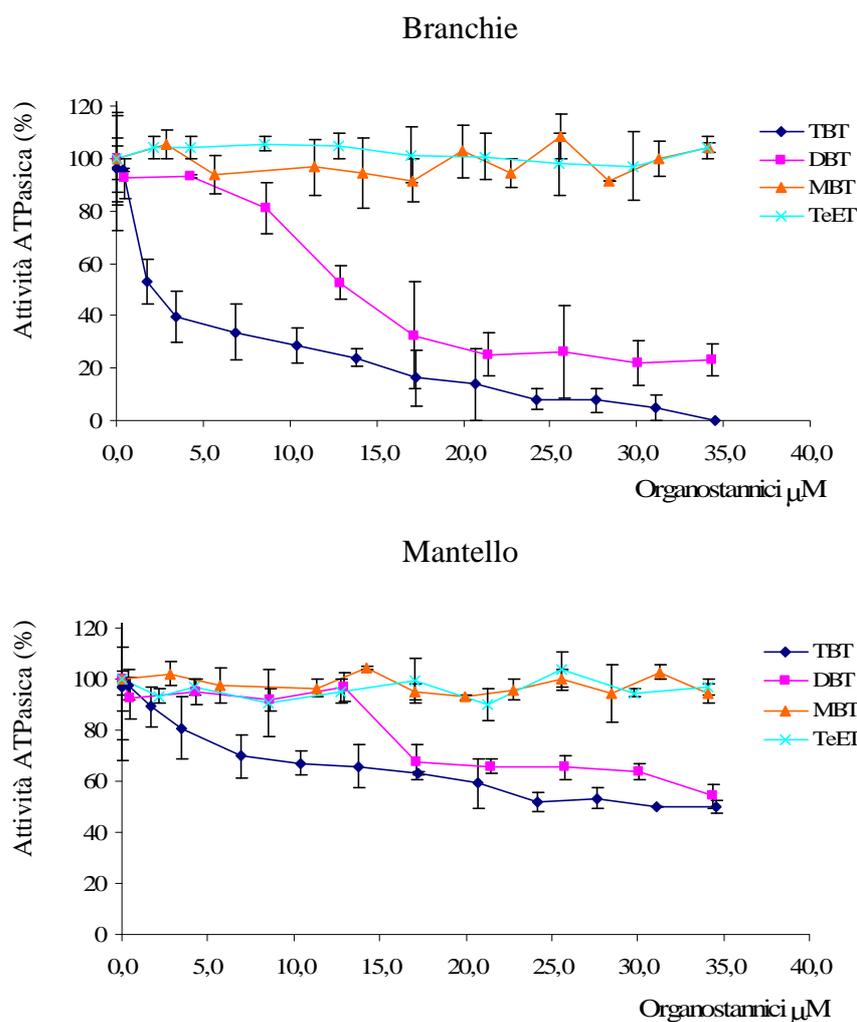
	TBT ( $\mu$ M)	I %	$I_{50}$ ( $\mu$ M)
Branchie	1,0	24,7 $\pm$ 6,2	12,0
Mantello	1,7	31,2 $\pm$ 4,7	8,0

**Tabella 2.1b1b:** Minima concentrazione di TBT che produce un'inibizione significativa (I %) ( $p \leq 0,05$ ) della Na,K-ATPasi e valori di  $I_{50}$  in *Tapes philippinarum*

La determinazione dell'attività Na,K-ATPasica in presenza di concentrazioni crescenti di TBT ha mostrato che questa attività enzimatica subisce un'inibizione significativa rispetto all'attività in assenza di contaminante a partire da 1,0  $\mu$ M di TBT per le branchie e da 1,7  $\mu$ M di TBT per il mantello. Sebbene nelle condizioni adottate non sia stata mai riscontrata una totale inibizione della Na,K-ATPasi nel mantello, l'enzima di questo tessuto non sembra essere meno sensibile al contaminante rispetto a quello nelle branchie a basse concentrazioni di contaminante. I valori di  $I_{50}$  mostrano infatti che nel mantello è richiesta una minore concentrazione di TBT per raggiungere l'inibizione del 50% dell'attività enzimatica rispetto alle branchie.

Nella specie *Mytilus galloprovincialis* è stato saggiato l'effetto sulle due attività ATPasiche Na-dipendenti oltre che del TBT, di suoi derivati e cioè stagno dibutile (DBT) e stagno monobutile (MBT). Inoltre si è saggiato l'effetto dello stagno tetraetile (TeET) come rappresentativo di composti apolari.

In Figura 2.1b1b è rappresentata la risposta dell'attività Na,K-ATPasica all'aggiunta di concentrazioni crescenti dei diversi composti alchilstannici.



**Figura 2.1b1b:** Risposta della Na,K-ATPasi a diversi composti alchilstannici in branchie e mantello di *M. galloprovincialis*

La risposta della Na,K-ATPasi al TBT concorda in linea di massima con i risultati ottenuti in *T. philippinarum*. In questa specie la sensibilità dell'enzima al TBT è molto maggiore nelle branchie rispetto al mantello nell'ambito delle concentrazioni di TBT saggate.

Nelle branchie ( riquadro superiore) l'attività enzimatica è completamente inibita in presenza di 34,4 μM di TBT, come per *T. philippinarum*, e il valore di I<sub>50</sub>, calcolato per interpolazione grafica dalle curve di inibizione, è di 2 μM corrispondente approssimativamente a 0,6 ppm.

Nel mantello (riquadro inferiore) l'attività Na,K-ATPasica è inibita del 50% dalla concentrazione di TBT che inibisce completamente l'enzima nelle branchie.

Come mostrato in Figura 2.1b1b il DBT produce nelle branchie una inibizione della Na,K-ATPasi minore rispetto al TBT. La massima concentrazione di DBT

saggiata di 34,4  $\mu\text{M}$  inibisce infatti l'attività enzimatica dell'80% con un  $I_{50}$  di 13  $\mu\text{M}$ . Nel mantello invece TBT e DBT producono alla massima concentrazione saggiata, la medesima inibizione, del 50 %, dell'attività enzimatica.

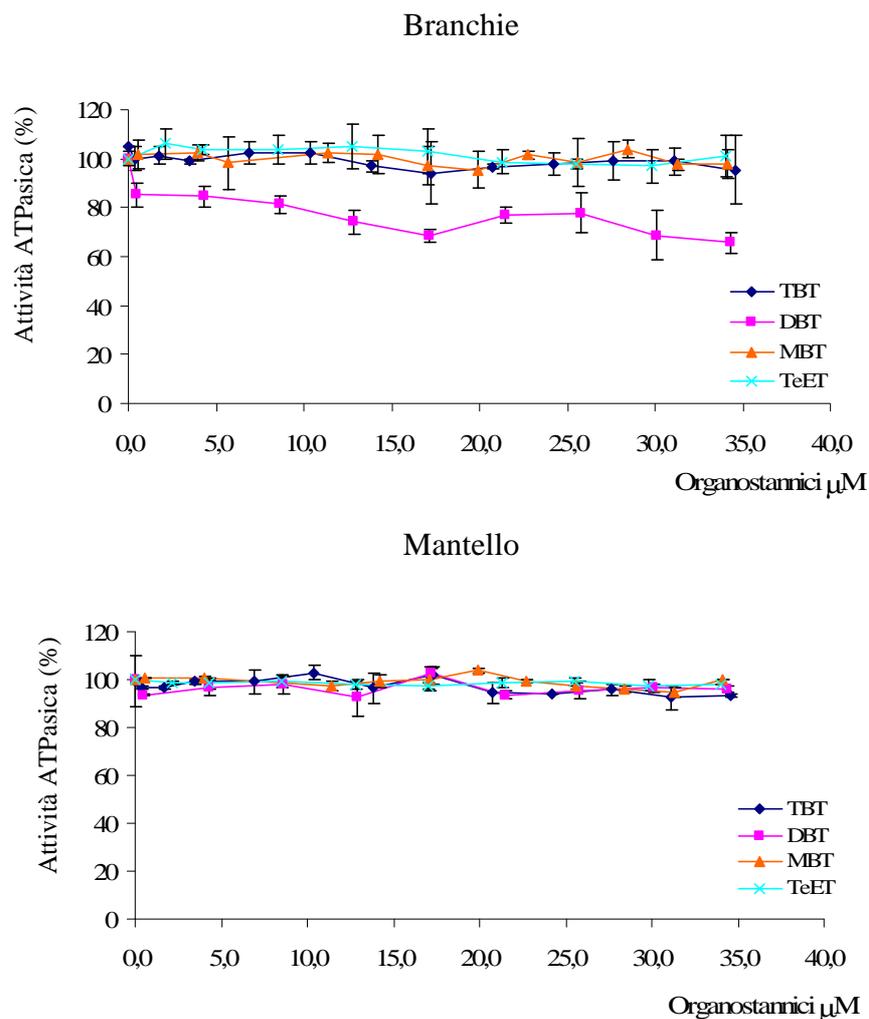
A differenza di *T. philippinarum*, nel mitilo i valori di  $I_{50}$  mostrati in Tabella 2.1b1c, sia per il TBT che per il DBT, indicano una maggiore sensibilità dell'attività enzimatica delle branchie rispetto al mantello.

	TBT ( $\mu\text{M}$ )	I %	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	DBT ( $\mu\text{M}$ )	I %	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Branchie	1,7	47,0 $\pm$ 8,3	2,0	13,0	47,4 $\pm$ 6,5	13,0
Mantello	20,7	40,9 $\pm$ 9,9	31,0	17,2	32,6 $\pm$ 6,7	34,4

**Tabella 2.1b1c:** Minore concentrazione di TBT e DBT che produce un'inibizione significativa (I %) ( $p \leq 0,05$ ) della Na,K-ATPasi e valori di  $I_{50}$  in *Mytilus galloprovincialis*

Nel mantello la concentrazione minore di contaminante necessaria per produrre un'inibizione significativa dell'attività Na,K-ATPasica risulta essere simile per TBT e DBT, mentre nelle branchie la medesima percentuale di inibizione dell'attività enzimatica (I% intorno al 47 %) è raggiunta con concentrazioni molto minori di TBT rispetto al DBT. Nelle branchie quindi il TBT risulta decisamente più efficace del DBT nell'inibire l'attività enzimatica.

Infine i composti MBT e TeET non producono nessuna inibizione dell'attività Na,K-ATPasica nell'intervallo di concentrazioni saggiate; le attività enzimatiche valutate in presenza e assenza di questi composti non risultano infatti significativamente diverse.



**Figura 2.1b1c:** Risposta della Na-ATPasi a diversi composti alchilstannici in branchie e mantello in *M. galloprovincialis*

L'attività Na-ATPasica ouabaina-insensibile di *M. galloprovincialis* in ambedue i tessuti risulta essere completamente refrattaria, non solo al TBT come già osservato nelle branchie di *T. philippinarum*, ma anche a tutti i composti organostannici saggiati (Figura 2.1b1c).

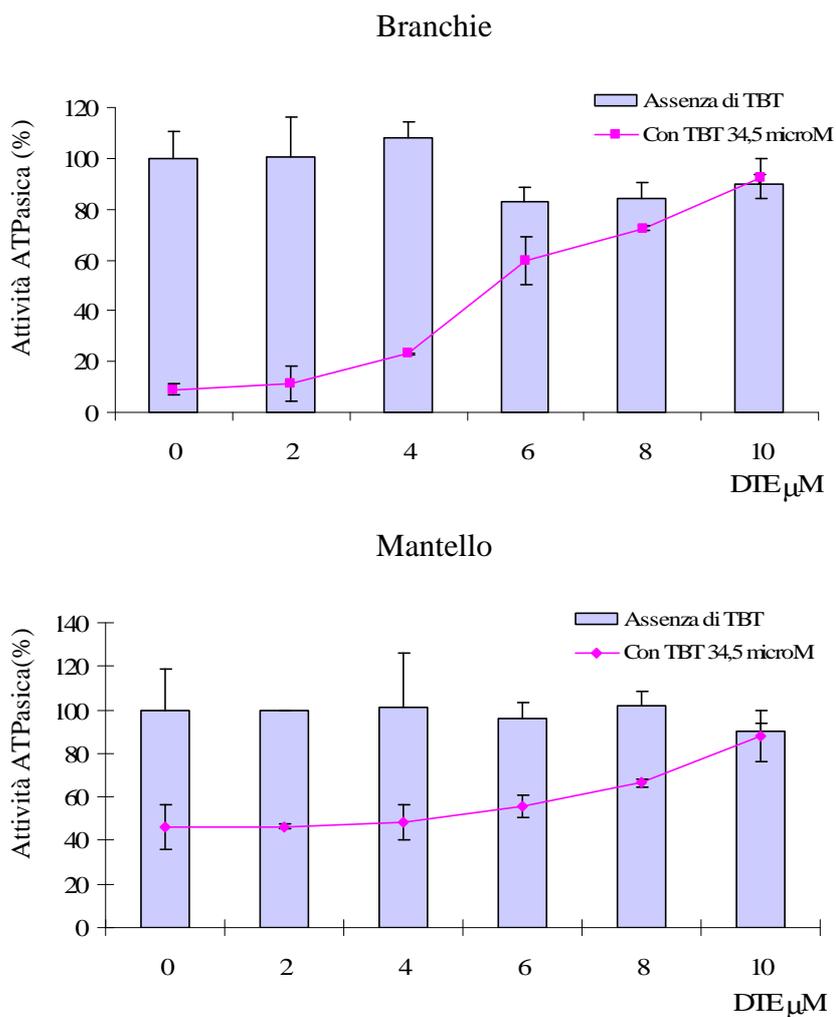
L'apparente inibizione costante del 20-30% che si riscontra nelle branchie ad opera del DBT nell'intervallo di concentrazioni 1 – 34,4 μM è stata trovata non significativamente diversa dal valore di attività Na-ATPasica determinato in assenza del contaminante.

### Ditioli e inibizione enzimatica da TBT

Essendo i composti ditiolici generalmente riportati in grado di prevenire effetti inibitori di contaminanti organostannici su alcune proteine enzimatiche (Buck-

Koenhntop et al 2006; Ohno et al. 2005; Lo et al. 2003), sono state effettuate prove in *M. galloprovincialis* in cui l'inibizione dell'attività Na,K-ATPasica era saggiata in presenza dell'agente riducente 1,4-ditioeritritolo (DTE) allo scopo di acquisire ulteriori conoscenze sul meccanismo di interazione tra il TBT e la Na,K-ATPasi.

Queste prove sono state effettuate con due diverse modalità, come riportato nella sezione 1.6a3.



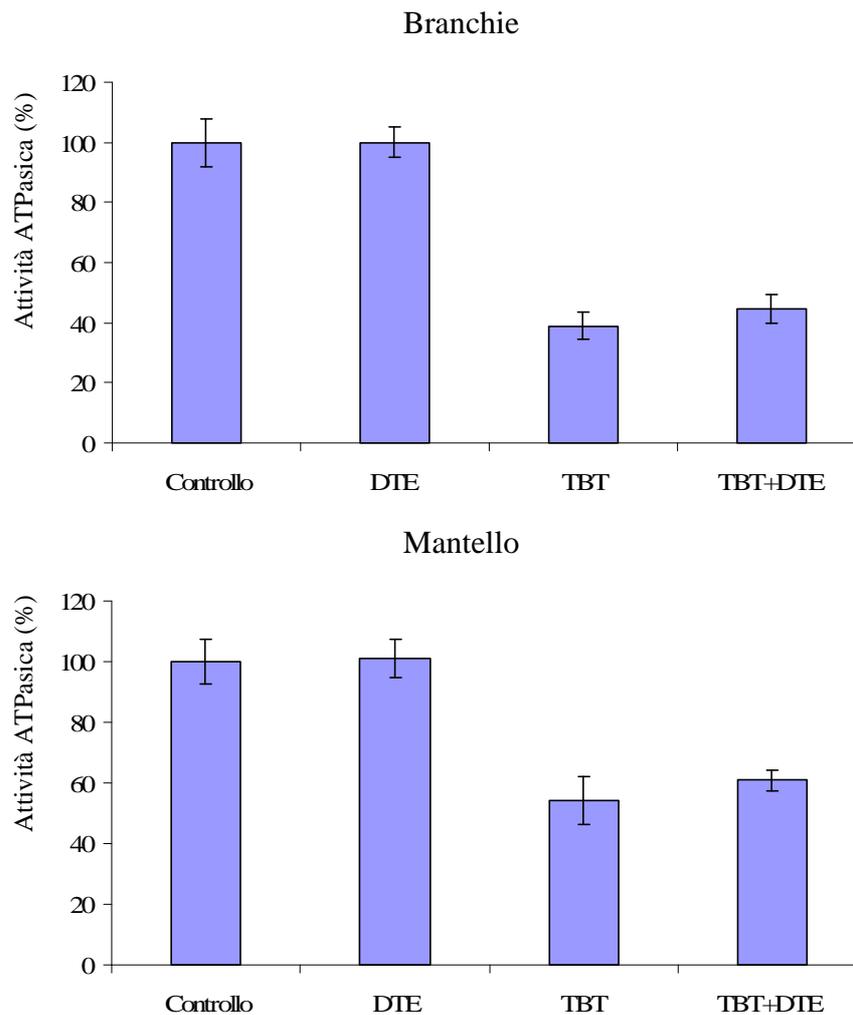
**Figura 2.1b1d:** Risposta dell'attività Na,K-ATPasica a diverse concentrazioni di DTE preincubate con la frazione microsomale in presenza di TBT in branchie e mantello in *M. galloprovincialis*

Preincubando la frazione microsomale con concentrazioni di DTE crescenti, in presenza nel sistema di reazione della massima concentrazione di TBT precedentemente dimostrata inibire la Na,K-ATPasi, si rileva un ripristino dell'attività enzimatica tanto maggiore quanto maggiore è la concentrazione di DTE utilizzata, fino ad un massimo di

10  $\mu\text{M}$  di DTE (Figura 2.1b1d). In presenza di tale concentrazione di DTE infatti l'attività Na,K-ATPasica si mantiene attorno a valori significativamente non diversi da quelli osservati in assenza di TBT. Sia nelle branchie che nel mantello la massima concentrazione saggiata di DTE di 10  $\mu\text{M}$  porta ad un ripristino totale dell'attività ATPasica. In Figura 2.1b1d è mostrato inoltre che l'attività Na,K-ATPasica in presenza delle sole concentrazioni di DTE utilizzate non è significativamente diversa da quella determinata in assenza del composto.

I risultati ottenuti in queste prove mostrano chiaramente che il “contatto ravvicinato” del DTE con il complesso enzimatico è in grado di impedire l'azione inibitrice del TBT.

Si è inoltre saggiata la risposta dell'attività Na,K-ATPasi all'aggiunta nel sistema di reazione della massima concentrazione di DTE, saggiata nelle prove con incubazione (10  $\mu\text{M}$ ), in presenza della concentrazione di TBT che provoca la massima inibizione della Na,K-ATPasi, e cioè il 100% nelle branchie e il 50% nel mantello. I risultati di queste prove sono mostrati in Figura 2.1b1e.



**Figura 2.1b1e:** Risposta dell'attività Na,K-ATPasica in presenza di DTE 10  $\mu$ M inserito nel sistema di reazione in branchie e mantello in *M. galloprovincialis*

Questi risultati possono essere considerati come una prova che in questo caso l'immissione del DTE direttamente nel sistema di reazione non impedisce l'interazione del TBT, presente nel sistema di reazione, con la proteina enzimatica. Anche in questo caso il solo DTE all'interno del sistema di reazione non modifica significativamente ( $p \leq 0,05$ ) l'attività enzimatica.

## 2.1b2 Attività ATPasica mitocondriale Mg-dipendente

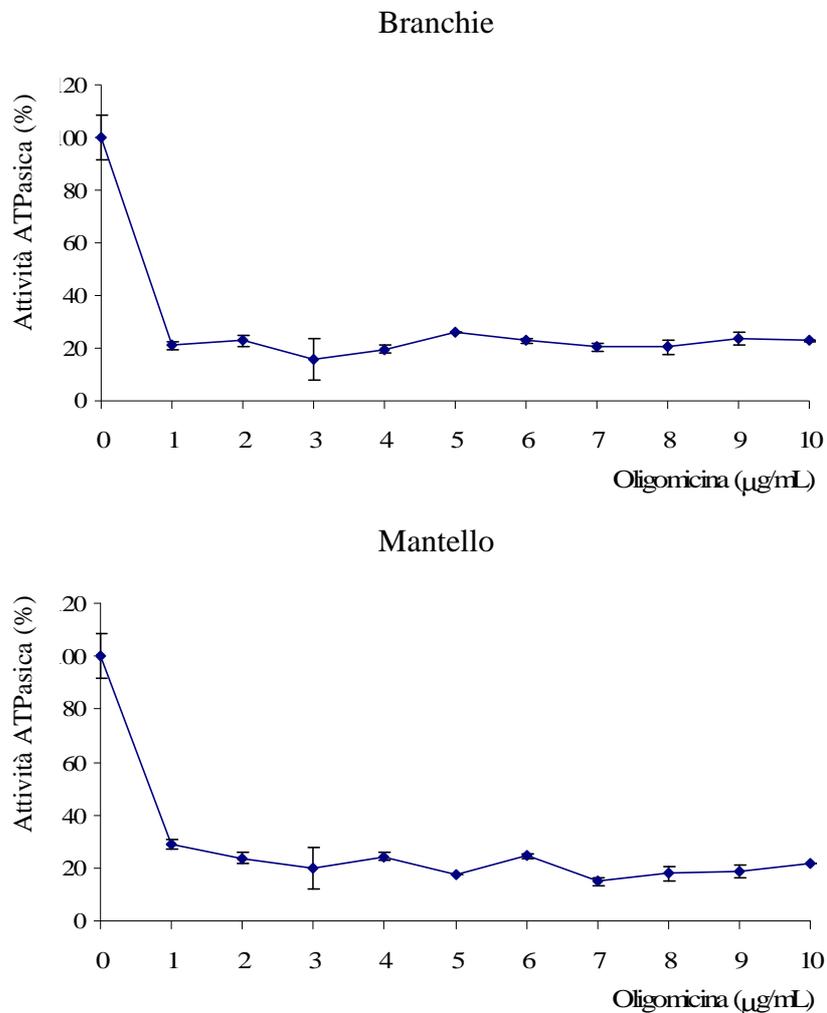
### Caratterizzazione dell'attività enzimatica

Per poter valutare l'inibizione del TBT sulla Mg-ATPasi mitocondriale di *M. galloprovincialis* è stato necessario come primo passo individuare le condizioni ottimali

di saggio per questa attività enzimatica non disponibili in letteratura per questa specie. I parametri considerati sono stati: sensibilità all'oligomicina, pH, concentrazione di magnesio e concentrazione di substrato attivante ATP.

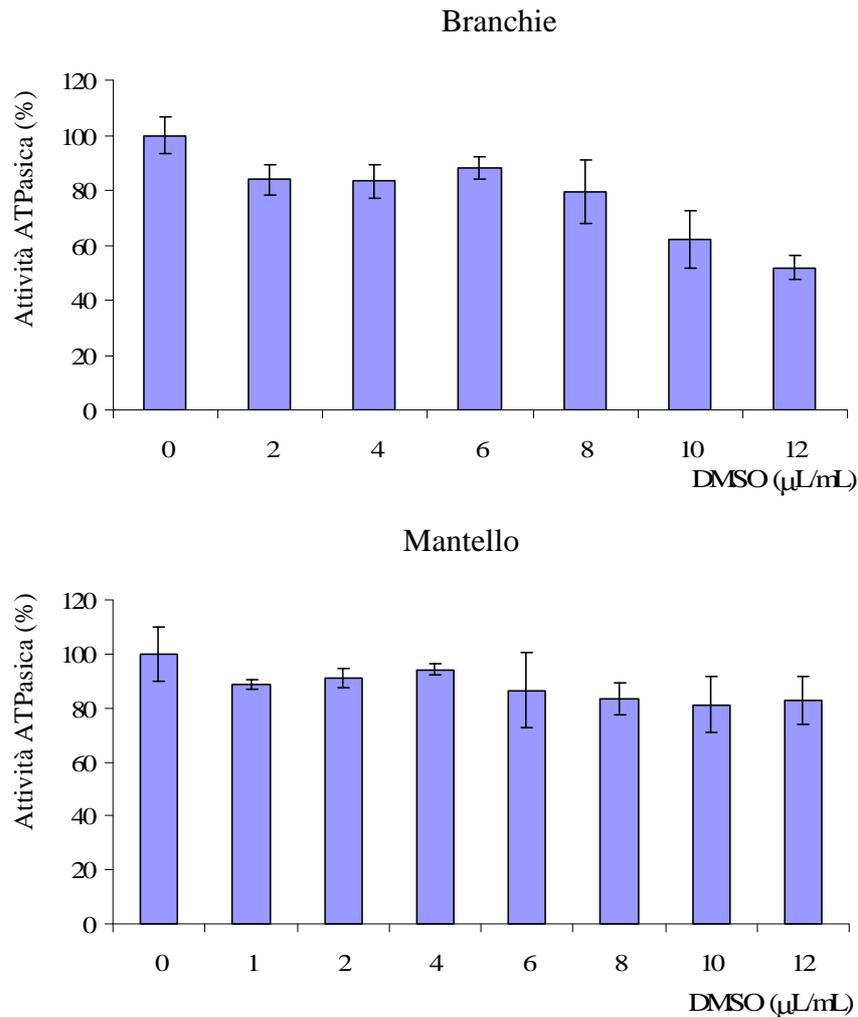
Prove preliminari sono state effettuate utilizzando condizioni di saggio riportate in letteratura per altri animali acquatici, e quindi, una volta determinate tutte le condizioni di saggio ottimali per la Mg-ATPasi mitocondriale di mitilo, sono state effettuate nuovamente le curve di dipendenza dai singoli parametri come riportato in sezione 1.6b1.

I risultati delle prove riguardanti la sensibilità all'oligomicina, inibitore specifico della Mg-ATPasi mitocondriale, che permette di distinguere questa attività da altre ATPasi Mg-dipendenti eventualmente presenti, sono rappresentati in Figura 2.1b2a.



**Figura 2.1b2a:** Risposta dell'attività Mg-ATPasi mitocondriale all'oligomicina in branchie e mantello in *M. galloprovincialis*

In entrambi i tessuti l'attività enzimatica è risultata inibita dell'80% da 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di oligomicina. L'inibizione si mantiene costante nell'intervallo saggiato 1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Essendo l'oligomicina sciolta in dimetilsolfossido (DMSO) si è parallelamente saggiato l'effetto di questo solvente organico sulla Mg-ATPasi, aggiungendo al sistema di reazione concentrazioni crescenti di DMSO pari a quelle utilizzate per immettere l'oligomicina, ottenendo i risultati mostrati in Figura 2.1b2b



**Figura 2.1b2b:** Effetto del DMSO sull'attività Mg-ATPasi in branchie e mantello in *M. galloprovincialis*

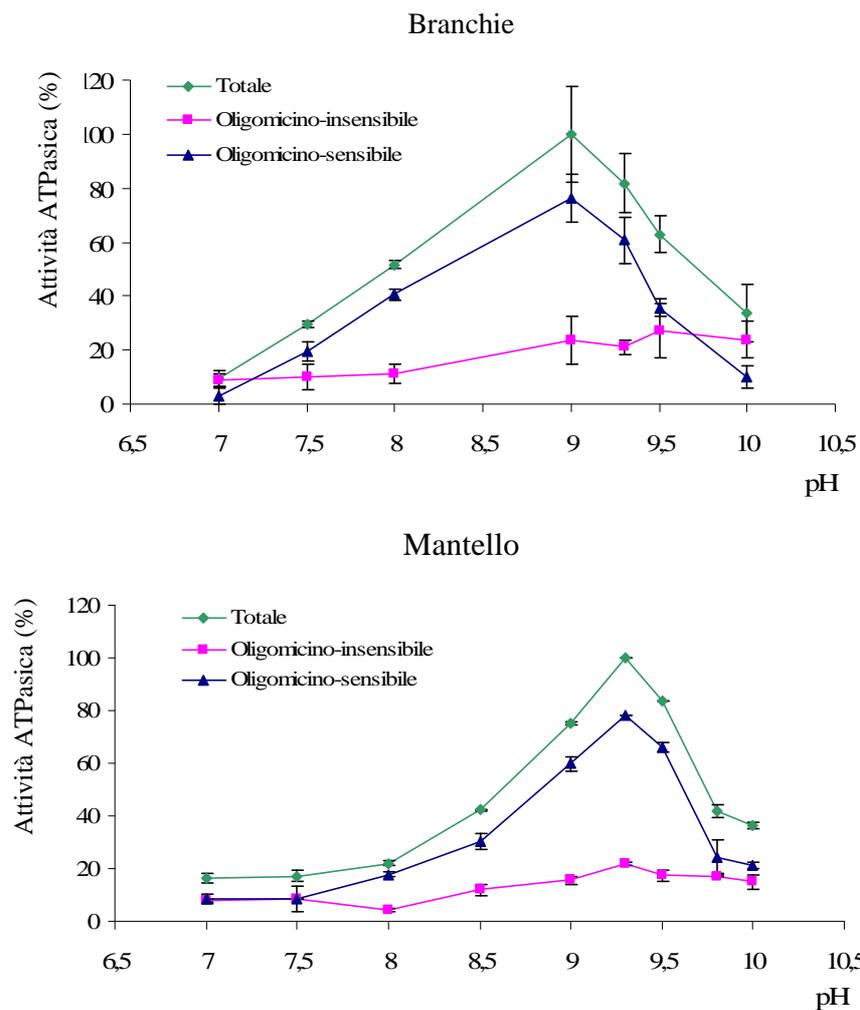
Mentre nel mantello la Mg-ATPasi è risultata praticamente refrattaria al DMSO a qualsiasi concentrazione saggiata, nelle branchie è stata osservata inibizione dell'attività enzimatica per concentrazioni di DMSO superiori a 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

La concentrazione di oligomicina utilizzata nelle prove sperimentali è stata di 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : questa concentrazione induce sicuramente la massima inibizione dell'attività

enzimatica sensibile all'oligomicina, come riportato nella sezione 1.6b2 e nel contempo implica l'utilizzo della minore quantità possibile di DMSO, ovvero di 1  $\mu$ L in un sistema di reazione di 1 mL.

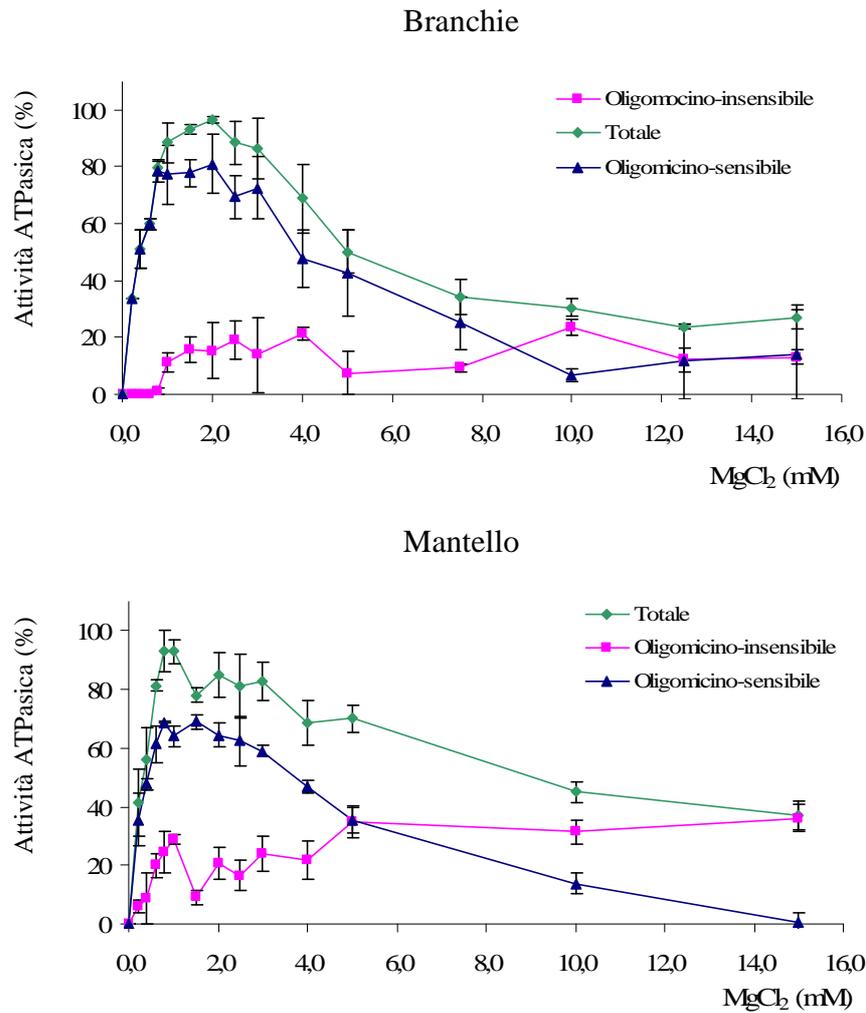
In Figura 2.1b2c-d-e sono rappresentati gli andamenti dell'attività enzimatica Mg-dipendente al variare di diversi parametri: pH, concentrazione di  $MgCl_2$  e di substrato attivante ATP. Nei grafici sono riportati gli andamenti di tre attività enzimatiche: l'attività Mg-dipendente totale valutata in assenza di oligomicina, l'attività enzimatica oligomicino-insensibile determinata in presenza di oligomicina, infine l'attività oligomicino-sensibile risultante dalla sottrazione delle prime due. L'attività oligomicino-sensibile determinata in questo modo è riferibile all'attività della ATP sintasi mitocondriale nella sua funzione di idrolisi dell'ATP. Tale attività enzimatica è stata utilizzata per saggiare la risposta al TBT. Le attività enzimatiche sono state riportate in percentuale dell'attività massima ottenuta per permettere un miglior confronto tra branchie e mantello.

Dagli andamenti riportati nelle Figure 2.1b2c e 2.1b2d si vede chiaramente che pH e concentrazione di  $MgCl_2$  nel sistema di reazione hanno una forte influenza sull'attività enzimatica.



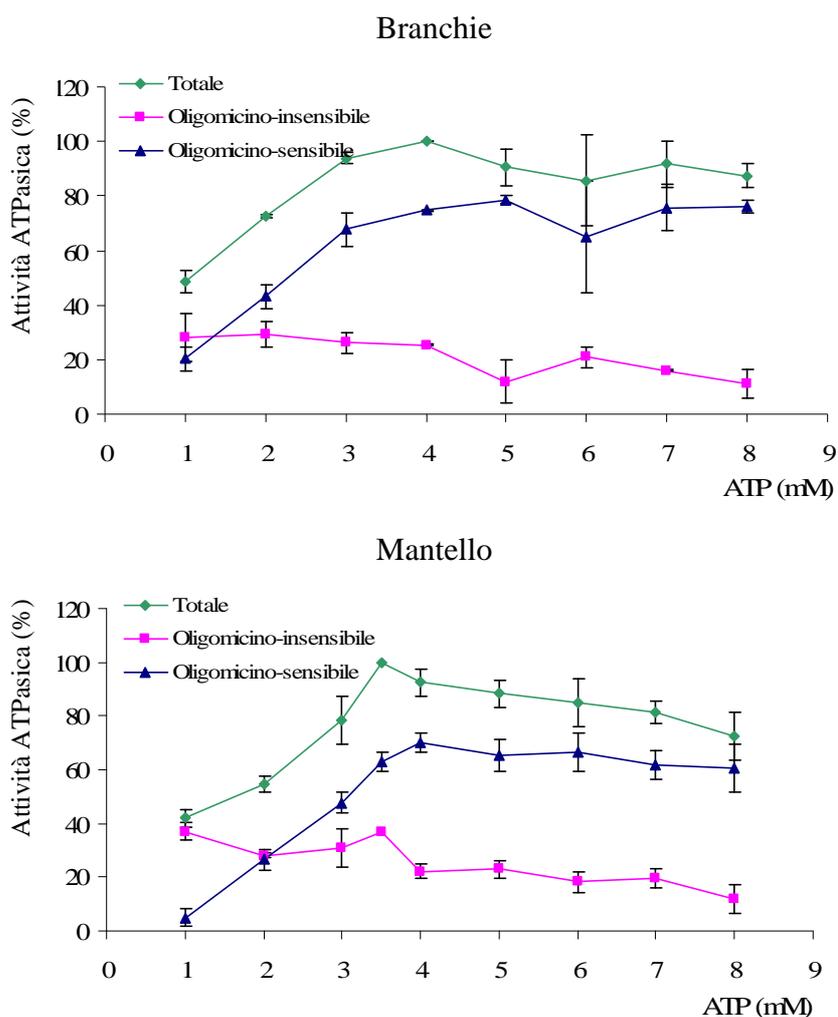
**Figura 2.1b2c:** Dipendenza dell'attività Mg-ATPasica di branchie e mantello dal pH in *M. galloprovincialis*

Il pH ottimale per la determinazione enzimatica è risultato di 9,3 nelle branchie ( riquadro superiore) e di 9,0 nel mantello ( riquadro inferiore). Si nota inoltre che l'attività oligomicino-insensibile rimane pressoché inalterata al variare del pH, che mostra invece forte influenza sull'attività oligomicino-sensibile.



**Figura 2.1b2d:** Dipendenza dell'attività Mg-ATPasica di branchie e mantello da MgCl<sub>2</sub> in *M. galloprovincialis*

I dati riportati in Figura 2.1b2d confermano che l'attività ATPasica riscontrata è sempre magnesio-dipendente, in quanto in assenza di Mg<sup>2+</sup> non si osserva attività enzimatica sensibile e insensibile all'oligomicina. Le concentrazioni ottimali per la determinazione della Mg-ATPasi mitocondriale sono 0,8 – 2,0 mM nelle branchie (riquadro superiore) e di 1,0 – 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> nel mantello (riquadro inferiore).



**Figura 2.1b2e:** Dipendenza dell'attività Mg-ATPasica di branchie e mantello dall'ATP in *M. galloprovincialis*

La concentrazione ottimale del substrato attivante ATP risulta di 5,0 mM nelle branchie e 4,0 mM nel mantello. Si nota in questo caso che all'aumentare delle concentrazione del substrato nel sistema di reazione l'attività enzimatica rimane pressoché costante fino alla massima concentrazione saggiata di 8,0 mM.

In Tabella 2.1b2a vengono riassunte le condizioni ottimali di saggio dell'attività Mg-ATPasica sensibile all'oligomicina nei due tessuti considerati.

	Branchie	Mantello
pH	9,0	9,3
Magnesio (mM)	0,8 – 2,0	1,0 – 2,0
ATP (mM)	5,0	4,0

**Tabella 2.1b2a:** Condizioni ottimali di saggio per la Mg-ATPasi mitocondriale oligomicino-sensibile di *M. galloprovincialis*

Utilizzando le condizioni ottimali di saggio riportate in Tabella 2.1b2a sono state ottenute le attività enzimatiche riportate in Tabella 2.1b2b

Attività Mg-ATPasica ( $\mu\text{moli Pi} \cdot \text{mg proteina}^{-1} \cdot \text{ora}^{-1}$ )	Branchie	Mantello
Totale	$18,6 \pm 1,2$	$35,1 \pm 8,0$
Oligomicino-insensibile	$3,5 \pm 0,7$	$5,0 \pm 1,1$
Oligomicino-sensibile	$15,2 \pm 0,7$	$30,0 \pm 8,9$

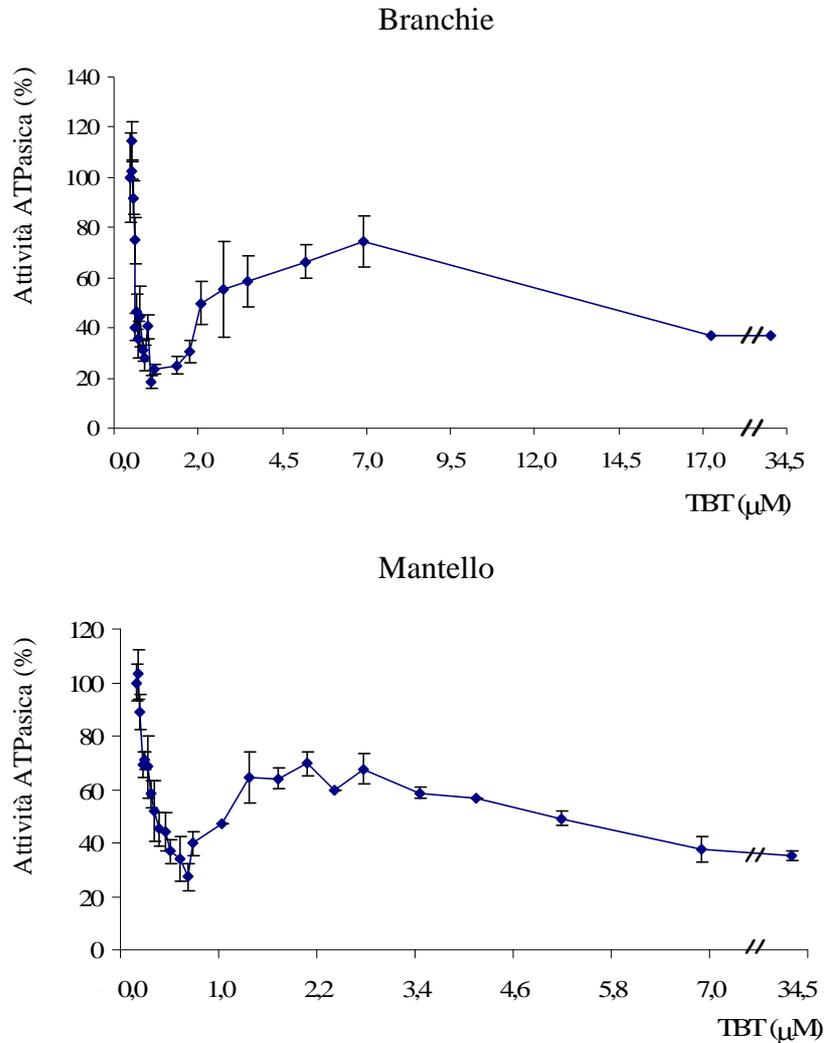
**Tabella 2.1b2b:** Attività Mg-ATPasiche di *M. galloprovincialis*

I valori di Tabella 2.1b2b come pure i grafici delle Figure 2.1b2c-d-e mostrano che la frazione predominante dell'attività Mg-ATPasica totale è costituita dall'attività ATPasica oligomicino-sensibile che costituisce circa l'86% dell'attività totale nel mantello e circa l'81% nelle branchie. Ciò è indice dell'ottenimento di preparazioni mitocondriale soddisfacenti, in cui la Mg-ATPasi oligomicino-sensibile risulta prevalente. Si osserva inoltre che l'attività Mg-ATPasica oligomicino-sensibile nel mantello risulta essere doppia rispetto a quella riscontrata nelle branchie.

Le condizioni di saggio determinate come ottimali e riportate in Tabella 2.1b1a sono state utilizzate per tutte le determinazioni della Mg-ATPasi in presenza e assenza di TBT.

## Interazione con il TBT

L'effetto di concentrazioni di TBT nell'intervallo di 0 – 34,5  $\mu\text{M}$  sulla Mg-ATPasi oligomicino-sensibile di branchie e mantello di *M. galloprovincialis* è mostrato in Figura 2.1b2f.



**Figura 2.1b2f:** Risposta al TBT della Mg-ATPasi di branchie e mantello in *M. galloprovincialis*

Sia nel tessuto di branchie che nel mantello, si osserva una progressiva inibizione dell'attività enzimatica fino ad una concentrazione di contaminante pari a 0,62  $\mu\text{M}$ .

Nelle branchie ( riquadro superiore) l'inibizione massima risulta essere di circa l'82% (attività enzimatica ridotta al 18% di quella determinata in assenza di contaminante). Nell'intervallo di concentrazioni 0,62 – 6,91  $\mu\text{M}$  di TBT si osserva una diminuzione dell'inibizione dell'attività enzimatica fino al valore del 26%

(corrispondente ad un'attività del 74% dell'attività enzimatica in assenza di inibitore). Aumentando ancora la concentrazione di TBT si osserva un'ulteriore aumento dell'inibizione fino a 17,3  $\mu\text{M}$  alla quale l'inibizione risulta essere del 63% (corrispondente ad un'attività enzimatica del 37% di quella in assenza di TBT).

Anche nel mantello (riquadro inferiore) si rileva un andamento simile a quello riscontrato per la Mg-ATPasi di branchie. In questo caso l'inibizione massima raggiunta a 0,62  $\mu\text{M}$  di TBT risulta essere del 73% (attività enzimatica ridotta al 27% di quella determinata in assenza di contaminante). Aumentando la concentrazione di TBT nell'intervallo 0,62 - 1,4  $\mu\text{M}$  TBT l'inibizione enzimatica diminuisce fino al valore del 32% (corrispondente ad un'attività del 68% dell'attività enzimatica in assenza di inibitore). Infine per concentrazioni da 2,8  $\mu\text{M}$  a 6,9  $\mu\text{M}$  di TBT l'inibizione enzimatica aumenta progressivamente all'aumentare della concentrazione dell'inibitore fino a raggiungere un valore del 63% (pari ad un'attività enzimatica del 37% dell'attività in assenza di inibitore).

Aumentando ulteriormente la concentrazione di TBT fino alla massima concentrazione saggiata di 34,5  $\mu\text{M}$  le attività enzimatiche Mg-dipendenti di branchie e mantello rimangono costanti.

Al fine di studiare la cinetica di inibizione della Mg-ATPasi sensibile all'oligomicina da parte del TBT nell'intervallo di concentrazioni 0 – 0,62  $\mu\text{M}$ , in cui come abbiamo visto l'inibizione aumenta progressivamente all'aumentare della concentrazione di inibitore, sono stati calcolati i valori dei coefficienti di Hill, riportati in Tabella 2.1b2c.

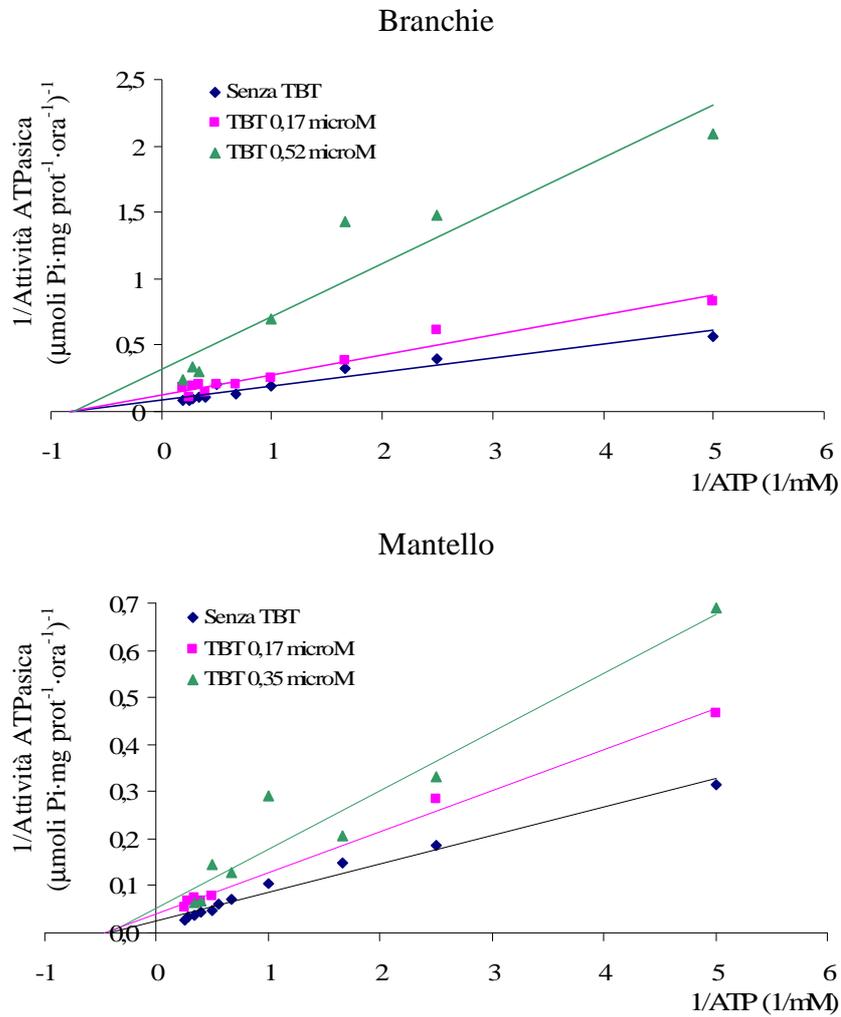
	Branchie	Mantello
$n_h$	$1,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$

**Tabella 2.1b2c:** Valori di  $n_h$  per l'inibizione da TBT della Mg-ATPasi di *M. galloprovincialis*

Sia in branchie che in mantello la cinetica di inibizione da TBT è risultata di tipo micheliano ( $n_h$  circa 1,0).

Per studiare la cinetica di inibizione del TBT sono inoltre stati determinati i valori di attività enzimatica nell'intervallo di concentrazioni di ATP attivanti, e valutati in presenza e assenza di due diverse concentrazioni inibenti di TBT. Questo ha permesso di costruire i diagrammi di Lineweaver-Burk, dai quali sono stati calcolati i parametri cinetici  $K_m$  e  $V_m$ , riportati in Tabella 2.1b2d.

Esempi rappresentativi degli andamenti ottenuti per branchie e mantello sono riportati in Figura 2.1b2g,



**Figura 2.1b2g:** Diagrammi di Lineweaver-Burk rappresentativi per branchie e mantello di *M. galloprovincialis*

		<b>K<sub>m</sub></b> (mM)	<b>V<sub>m</sub></b> ( $\mu\text{moli Pi}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$ )
<b>Branchie</b>	Controllo	1,5 $\pm$ 0,1 a	12,1 $\pm$ 0,8 a
	TBT 0,17 $\mu\text{M}$	1,6 $\pm$ 0,4 a	8,7 $\pm$ 1,2 b
	TBT 0,52 $\mu\text{M}$	1,5 $\pm$ 0,3 a	3,5 $\pm$ 0,7 c
<b>Mantello</b>	Controllo	2,8 $\pm$ 0,9 a	38,9 $\pm$ 3,3 a
	TBT 0,17 $\mu\text{M}$	2,1 $\pm$ 0,9 a	24,9 $\pm$ 2,4 b
	TBT 0,35 $\mu\text{M}$	1,9 $\pm$ 0,1 a	19,1 $\pm$ 1,4 c

**Tabella 2.1b2d:** Valori di  $K_m$  e  $V_m$  della Mg-ATPasi in presenza di diverse concentrazioni di TBT di *M. galloprovincialis*. All'interno di ogni tessuto in ogni colonna lettere differenti indicano valori significativamente differenti ( $p \leq 0,05$ ).

Dai diagrammi di Lineweaver-Burk si vede chiaramente che, all'aumentare della concentrazione di TBT, sia nelle branchie che nel mantello, i valori di  $K_m$  rimangono invariati, mentre i valori di  $V_m$  diminuiscono significativamente, mostrando un'inibizione del TBT di tipo non competitivo.

Per calcolare i valori della costante di inibizione ( $K_i$ ) sono stati utilizzati i diagrammi di Dixon. A tal fine l'attività enzimatica è stata determinata a concentrazioni crescenti di TBT e a diverse concentrazioni di ATP. Gli andamenti ottenuti sono risultati del tipo atteso, in base ad una cinetica di inibizione non competitiva.

Un esempio rappresentativo dei diagrammi di Dixon della Mg-ATPasi di branchie e mantello è mostrato in Figura 2.1b2h.

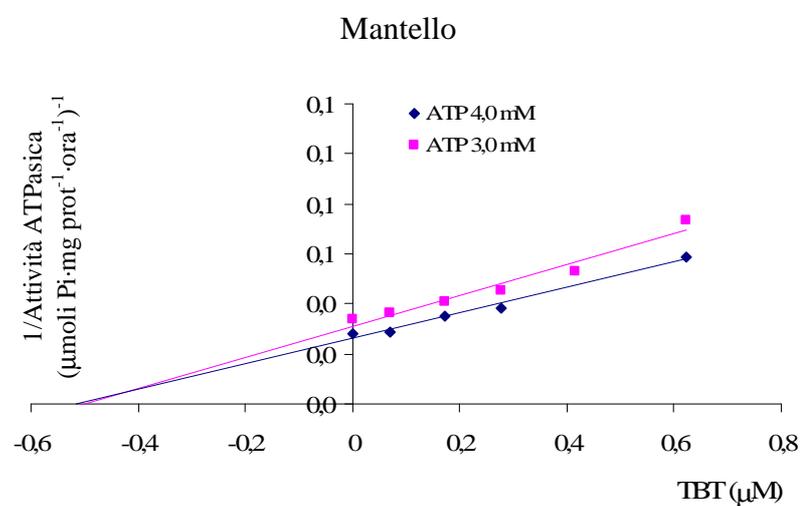
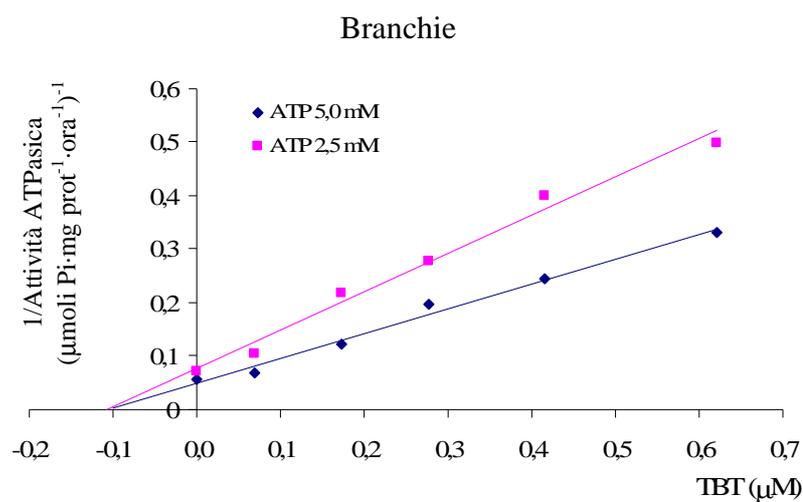


Figura 2.1b2h: Diagrammi di Dixon rappresentativi della Mg-ATPasi di branchie e mantello di *M. galloprovincialis*

I valori di  $K_i$  ottenuti calcolando l'intercetta delle rette con l'asse delle ascisse sono mostrati in Tabella 2.1b2e. Questi valori sono significativamente più bassi per la Mg-ATPasi di branchie rispetto a quella di mantello indicando che nel primo tessuto l'enzima mostra una maggiore affinità per il TBT rispetto al mantello.

	ATP (mM)	Ki ( $\mu$ M)
Branchie	5,0	0,15 $\pm$ 0,05 a
	2,5	0,19 $\pm$ 0,05 a
Mantello	4,0	0,41 $\pm$ 0,06 b
	3,0	0,35 $\pm$ 0,07 b

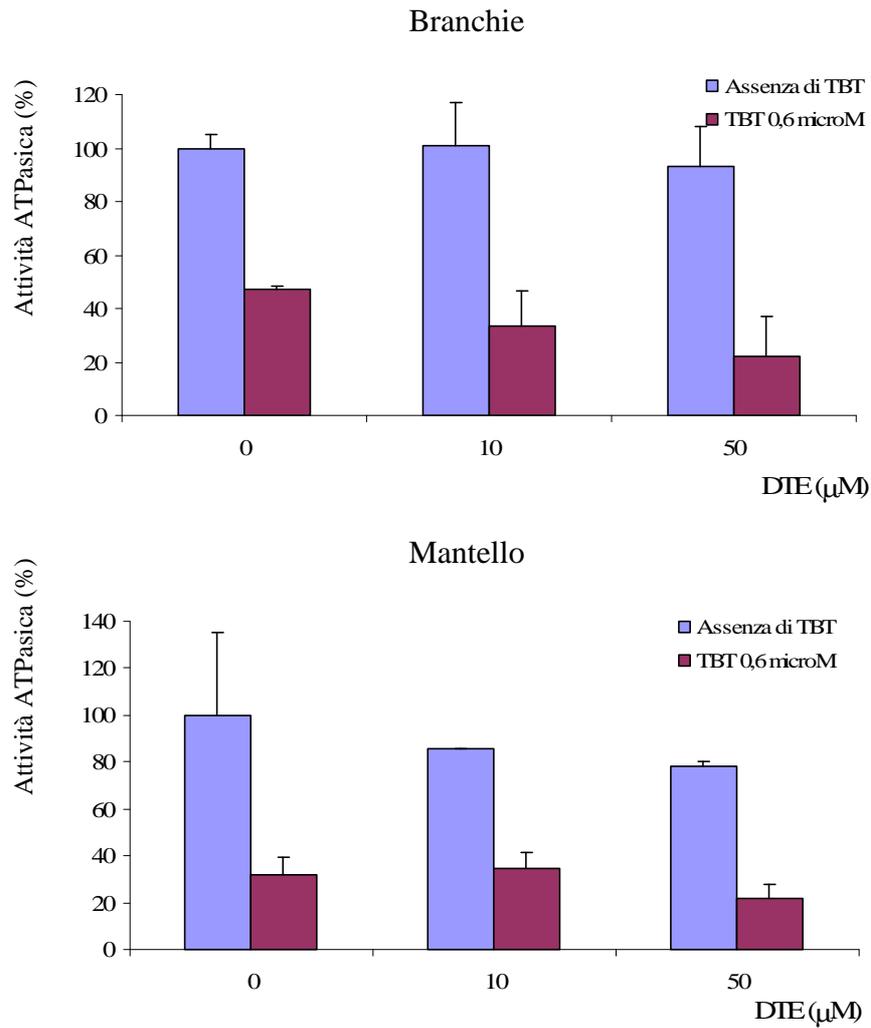
**Tabella 2.1b2e:** Valori di Ki per il TBT della Mg-ATPasi di *M. galloprovincialis*

Per ogni tessuto in ogni colonna lettere differenti indicano valori significativamente differenti ( $p \leq 0,05$ ).

### **Ditioli e inibizione enzimatica da TBT**

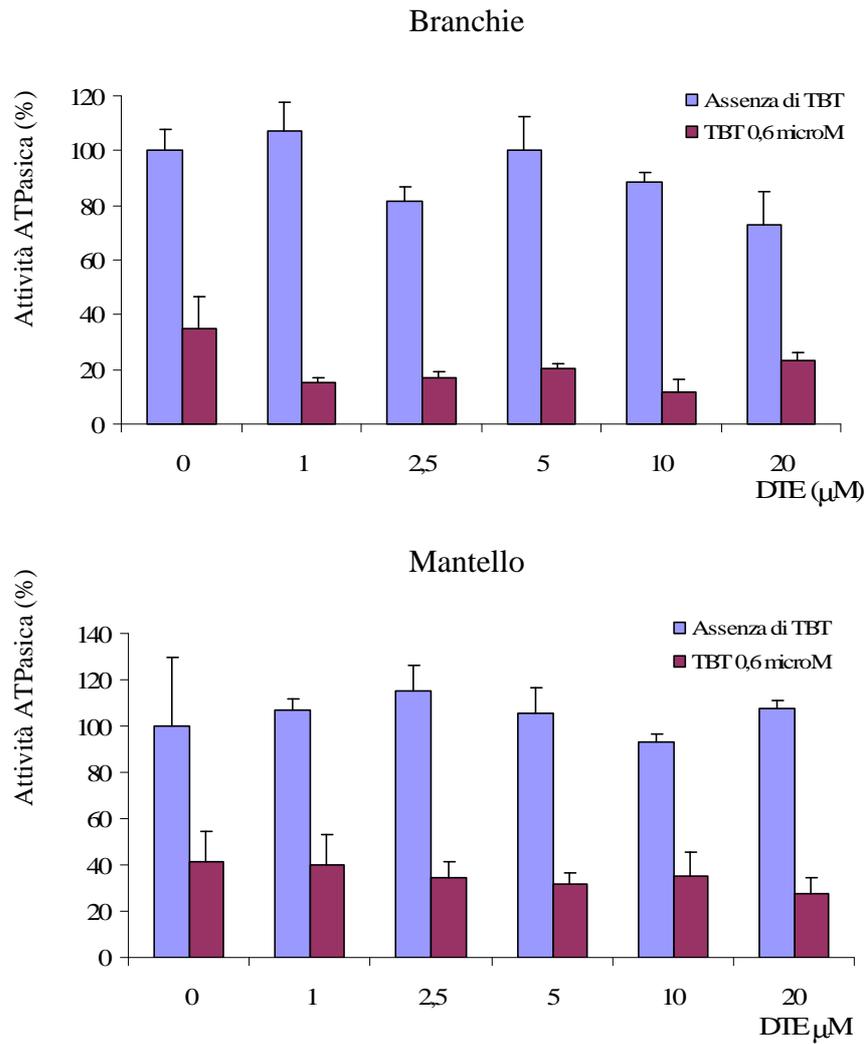
Anche per la Mg-ATPasi è stata valutata la capacità del DTE di impedire l'inibizione dell'enzima da parte del TBT, immettendo il DTE a diverse concentrazioni nel sistema di reazione analogamente a quanto è stato effettuato per la Na,K-ATPasi. Anche in questo caso il DTE è stato immesso con due modalità distinte in modo analogo a quelle precedentemente riportate per la Na,K-ATPasi di *M. galloprovincialis*

Procedendo in modo analogo alle prove svolte nel caso della Na,K-ATPasi, sono state quindi effettuate prove di preincubazione del DTE con la frazione mitocondriale aggiungendo il TBT al sistema di reazione. I risultati sono mostrati in Figura 2.1b2i.



**Figura 2.1b2i:** Risposta dell'attività Mg-ATPasica al TBT in presenza di diverse concentrazioni di DTE preincubate con la frazione mitocondriale di branchie e mantello in *M. galloprovincialis*

Sia nelle branchie ( riquadro superiore), che nel mantello ( riquadro inferiore) l'azione del DTE, anche a stretto contatto con il complesso enzimatico, non impedisce l'inibizione da parte del TBT diversamente da quanto è stato riscontrato per la Na,K-ATPasi.



**Figura 2.1b21:** Risposta dell'attività Mg-ATPasica al TBT in presenza di diverse concentrazioni di DTE nel sistema di reazione di branchie e mantello di *M. galloprovincialis*

Si osserva che la presenza del DTE nel sistema di reazione non modifica sostanzialmente il grado di inibizione dell'attività enzimatica esercitata dal TBT. Come peraltro osservato per la Na,K-ATPasi la presenza del DTE nel sistema di reazione quindi non è sufficiente ad impedire l'interazione del TBT con la proteina enzimatica.

## 2.2 Sperimentazione in ambiente controllato

### 2.2a Analisi sui molluschi

#### Mortalità

La mortalità non è risultata significativa per tutta la durata della sperimentazione con al massimo 2 o 3 animali complessivamente deceduti per vasca. La mortalità evidenziata, mai superiore al 4-5%, è risultata comunque indipendente dai trattamenti sperimentali a cui erano sottoposti i mitili, dal momento che i dati non sono risultati significativamente diversi rispetto ai controlli ( $p \leq 0,05$ ).

#### Peso, indice di condizione e contenuto d'acqua

La determinazione di tali parametri su un campione di animali dopo 24 e 120 ore di esposizione alle due concentrazioni di TBT definite TBT 1 pari a 0,5  $\mu\text{g/g}$  peso secco e TBT 2 pari a 1,0  $\mu\text{g/g}$  peso secco, ha avuto lo scopo sia di fornire indicazioni di massima di riferimento sul materiale biologico utilizzato nella presente sperimentazione, sia di evidenziare eventuali variazioni imputabili ai trattamenti sperimentali. I dati riportati in Tabella 2.2a1 si riferiscono ai valori dei parametri mediati per i due pool dopo aver verificato che questi non fossero statisticamente diversi tra loro.

	PESO (g)		INDICE DI CONDIZIONE (g ms $\cdot$ 10 <sup>3</sup> /mL)		CONTENUTO D'ACQUA (%/materiale fresco)	
	24 ore	120 ore	24 ore	120 ore	24 ore	120 ore
Controllo	4,90 $\pm$ 0,66	4,86 $\pm$ 0,77	85,7 $\pm$ 24,3	56,2 $\pm$ 10,4	83,70 $\pm$ 0,76	82,80 $\pm$ 1,06
TBT 1	4,23 $\pm$ 0,33	5,94 $\pm$ 0,72	67,6 $\pm$ 14,5	76,0 $\pm$ 8,7	81,90 $\pm$ 0,85	81,36 $\pm$ 1,06
TBT 2	6,16 $\pm$ 0,92	7,18 $\pm$ 1,24	77,9 $\pm$ 7,0	76,1 $\pm$ 1,3	81,74 $\pm$ 0,90	80,35 $\pm$ 1,03

**Tabella 2.2a1:** Peso, indice di condizione e contenuto d'acqua.

Ciascun dato è espresso come valore medio  $\pm$  ES. I valori di peso e contenuto d'acqua sono il risultato di 6 determinazioni, 3 di ogni pool, mentre l'indice di condizione è stato calcolato come valore medio di 2 pool di tre animali ciascuno.

Tutti i parametri considerati non hanno subito variazioni significative durante la sperimentazione. Il contenuto d'acqua degli animali *in toto* è rimasto costante intorno all'80% indipendentemente dal trattamento sperimentale. Anche il peso fresco dei mitili e l'indice di condizione non variano sia rispetto al tempo di esposizione, sia nei diversi trattamenti, benché i mitili non siano stati alimentati durante tutta la prova sperimentale.

## Risposta delle attività ATPasiche

Le attività della Na,K-ATPasi, Na-ATPasi insensibile all'ouabaina e Mg-ATPasi mitocondriale valutate in branchie e mantello di mitili esposti per 24 e 120 ore alle due concentrazioni di TBT (TBT 1 e TBT 2), e in animali non esposti (controllo) sono riportate in Tabella 2.2a2.

		Esposizione 24 ore			Esposizione 120 ore		
		Controllo	TBT 1	TBT 2	Controllo	TBT 1	TBT 2
<b>B</b>	Na,K-ATPasi	2,4±0,4	2,2±0,4	2,0±0,1	1,7±0,3	1,7±0,1	1,8±0,2
	Na-ATPasi	4,0±1,2	3,6±1,0	3,6±1,4	3,8±0,1	4,6±0,4	5,2±0,5
	Mg-ATPasi	12,9±2,3Aa	9,9±0,4Aa	15,9±1,9Ba	15,1±0,8Aa	16,8±0,1Ba	23,4±1,7Cb
<b>M</b>	Na,K-ATPasi	4,2±0,3	4,3±0,9	3,2±0,2	4,8±0,2	5,2±0,3	4,8±0,7
	Na-ATPasi	17,9±0,6Aa	17,3±0,9Aa	12,7±0,6Ab	18,9±1,2Aa	14,9±1,3Ab	15,5±0,9Ab
	Mg-ATPasi	4,8±0,6Aa	4,2±0,4Aa	6,2±0,5Ba	6,2±0,3Aa	8,9±0,8Bb	7,6±0,5Bab

**Tabella 2.2a2:** Attività ATPasiche Na-dipendenti e Mg-ATPasica di branchie (B) e mantello (M), in mitili esposti al TBT.

Le attività ATPasiche sono espresse in  $\mu\text{moli Pi} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{ora}^{-1}$ . Ciascun dato è il valore medio  $\pm$  ES di almeno tre determinazioni in ogni pool. Per ciascuna attività enzimatica e tessuto, lettere maiuscole diverse indicano valori significativamente diversi tra i due prelievi (dopo 24 e 120 ore) nell'ambito di ciascun trattamento sperimentale, mentre lettere minuscole indicano valori significativamente diversi tra trattamenti nell'ambito di uno stesso prelievo ( $p \leq 0,05$ ). L'assenza di lettere indica assenza di differenze significative tra i valori dei tre trattamenti e tra i valori dei due prelievi.

Dall'esame complessivo dei risultati ottenuti si può osservare che sulle attività enzimatiche in studio vi sono stati due tipi di effetti e cioè il trattamento sperimentale effettuato, in pratica la dose di esposizione al contaminante, e il tempo di esposizione.

Sia nelle branchie che nel mantello la Na,K-ATPasi rimane invariata, indipendentemente dai trattamenti sperimentali e dal tempo di esposizione.

La Na-ATPasi insensibile all'ouabaina non mostra alcuna variazione significativa nelle branchie, mentre nel mantello risulta inibita rispetto al controllo nei mitili esposti alla maggiore concentrazione di TBT (TBT 2) dopo 24 ore e in entrambi i trattamenti (TBT 1 e TBT 2) dopo 120 ore, indicando che probabilmente è necessaria un'elevata incorporazione del contaminante o di suoi metaboliti per produrre effetti su questa attività enzimatica.

Infine quando la Mg-ATPasi mitocondriale mostra un effetto riferibile ai trattamenti sperimentali, questo è di stimolazione dell'attività enzimatica e si verifica solo dopo 120 ore di esposizione. Considerando attentamente i risultati ottenuti, si osserva che nelle branchie la Mg-ATPasi non mostra alcuna variazione significativa tra i trattamenti dopo 24 ore di esposizione dei mitili al contaminante, mentre dopo 120 ore di esposizione l'attività enzimatica è superiore a quella del controllo nei mitili TBT 2.

Considerando i valori di attività Mg-ATPasica di branchie nei mitili TBT 1, si osserva inoltre che questi dopo 120 ore di esposizione al contaminante sono significativamente più elevati rispetto a quelli rilevati dopo 24 ore di esposizione, anche se in questo gruppo sperimentale nell'ambito di ciascun prelievo non risultano mai superiori a quelli del controllo. Anche nel mantello l'attivazione della Mg-ATPasi viene evidenziata solo dopo 120 ore di esposizione dei mitili al contaminante e in questo caso in entrambi i gruppi TBT 1 e TBT 2. Vale la pena di osservare anche che l'esposizione protratta al contaminante comporta una stimolazione dell'attività Mg-ATPasica nei mitili TBT 1; i valori di attività enzimatica in questo gruppo nel secondo prelievo (120 ore) risultano infatti significativamente diversi da quelli riscontrati in questo stesso gruppo sperimentale nel primo prelievo, mentre i valori medi di attività enzimatica nei controlli nel primo e nel secondo prelievo sono praticamente sovrapponibili.

### 3. Discussione

Le ricerche svolte in questi tre anni di dottorato hanno portato a molteplici risultati, che indubbiamente possono essere visti come un contributo all'ampliamento delle conoscenze sull'interazione tra inquinanti di origine naturale (azoto ammoniacale, in particolare la sua forma prevalente  $\text{NH}_4^+$ ) e antropica (TBT e derivati) ed attività enzimatiche di membrana di animali acquatici di allevamento, siano esse l'espressione di complessi inseriti nella membrana plasmatica (ATPasi Na-dipendenti) o in quella mitocondriale (Mg-ATPasi).

Per agevolare la discussione dei risultati ottenuti nelle varie fasi e sperimentazioni in cui si è articolata la ricerca complessiva si è preferito suddividere questa sezione in due parti considerando separatamente gli argomenti affrontati.

#### **Interazione delle ATPasi Na-dipendenti con $\text{NH}_4^+$**

L'azoto ammoniacale, costituito dalle due forme all'equilibrio  $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4^+$  è considerato tra i principali contaminanti negli ambienti acquatici di allevamento (Chen e Lin 1992). La forma  $\text{NH}_4^+$ , prevalente nell'acqua di mare e anche a pH fisiologici (Ip et al. 2006) è stata finora poco considerata negli studi di tossicità dell'azoto ammoniacale. I dati ottenuti nella presente ricerca rappresentano uno, se non l'unico a nostra conoscenza, dei tentativi di far luce sull'interazione di questo catione monovalente con le ATPasi coinvolte nella regolazione ionica cellulare nei molluschi bivalvi.

Le prove *in vitro* di sostituzione dei cationi attivanti delle due ATPasi Na-dipendenti, hanno confermato i valori ottimali di concentrazione di  $\text{K}^+$  per la Na,K-ATPasi, e di  $\text{Na}^+$  per la Na-ATPasi insensibile all'ouabaina (Figure 2.1a1a-b) riscontrati precedentemente (Borgatti et al. 1998), ed utilizzati anche nelle prove svolte in questa ricerca, per le determinazioni enzimatiche nei tessuti di *T. philippinarum*. Inoltre lo ione ammonio ha mostrato un'efficienza di attivazione e caratteristiche cinetiche simili a quelle dei cationi sostituiti, ovvero il  $\text{K}^+$  per la Na,K-ATPasi e il  $\text{Na}^+$  per la Na-ATPasi. Le costanti di affinità della Na,K-ATPasi per il  $\text{K}^+$  e per l' $\text{NH}_4^+$ , come i valori dei coefficienti di Hill ( $n_h$ ), che indicano una cinetica di attivazione di tipo micheliano per i due cationi (Tabella 2.1a1a), non sono risultati sostanzialmente differenti da quelli riportati per i crostacei (Furriel 2004).

Il comportamento cinetico simile del  $\text{Na}^+$  e del  $\text{NH}_4^+$  nell'attivazione dell'attività ATPasica insensibile all'ouabaina suggerisce una possibile intersostituibilità dei due cationi nell'attivazione dell'enzima. I valori di  $K_m$  e di  $n_h$  riscontrati per l'attivazione della Na-ATPasi insensibile all'ouabaina sono in accordo con dati precedentemente

trovati in pesci (Ventrella et al. 1987). Vale la pena di osservare che in *M. galloprovincialis* era stata riscontrata invece una cinetica cooperativa di attivazione della ATPasi insensibile all'ouabaina sia per il  $\text{Na}^+$  che per altri cationi attivanti, incluso  $\text{NH}_4^+$  (Ventrella et al. 1992a), ma comunque anche in questa specie la cinetica di attivazione dell'enzima era del tutto simile sia per  $\text{Na}^+$  che per i cationi sostituenti incluso il  $\text{NH}_4^+$ . Risulta quindi confermata la generale aspecificità di attivazione dell'ATPasi insensibile all'ouabaina.

I dati riscontrati nell'attivazione della Na,K-ATPasi da parte di  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  sono in linea con l'ipotesi formulata per il bivalve *Rangia cuneata* (Henry e Magnum 1980), secondo la quale anche nei molluschi la classica pompa del sodio potrebbe essere coinvolta nell'espulsione di azoto ammoniacale dalla cellula. Anche se tutto il processo è probabilmente molto più complesso, il trasporto di  $\text{NH}_4^+$  in competizione con il  $\text{K}^+$  all'interno della cellula attraverso la membrana plasmatica tramite la Na,K-ATPasi rappresenta probabilmente l'evento principale (Martinelle e Haggstrom 1993), essendo l'affinità dell'enzima sostanzialmente uguale per i due cationi. Questo passaggio sarebbe seguito dalla diffusione all'esterno della cellula dell' $\text{NH}_3$ , in equilibrio con lo ione  $\text{NH}_4^+$ , attraverso la membrana, permettendo l'espulsione del contaminante dalla cellula secondo il modello ipotizzato per pesci (Randall e Tsui 2002; Randall e Tsui 1999) e crostacei (Weihrauch et al. 2004, 2002; Masui et al. 2002). Entrambe le attività ATPasiche Na-dipendenti potrebbero essere coinvolte nel trasporto di  $\text{NH}_4^+$  attraverso la membrana plasmatica grazie alla sostituzione del  $\text{K}^+$  con lo ione ammonio nella Na,K-ATPasi e del  $\text{Na}^+$  nella Na-ATPasi insensibile all'ouabaina. L'attività Na-ATPasica apparentemente attivata in modo non specifico da  $\text{Na}^+$  o  $\text{NH}_4^+$ , potrebbe quindi essere direttamente coinvolta nella rimozione dell' $\text{NH}_4^+$  dalla cellula.

Sia in branchie che nel mantello, la Na,K-ATPasi quando è attivata da  $\text{NH}_4^+$  in assenza di  $\text{K}^+$  sembra maggiormente sensibile all'inibitore specifico ouabaina (Figura 2.1a2a). La maggiore sensibilità riscontrata potrebbe essere ipoteticamente attribuita ad una maggiore accessibilità della struttura enzimatica all'inibitore, dovuta ad un cambiamento conformazionale. In presenza di concentrazioni millimolari di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  la conformazione prevalente della Na,K-ATPasi è quella  $\text{E}_2$  (Furriel et al. 2004).

La caratteristica refrattarietà della Na-ATPasi all'ouabaina viene mantenuta anche quando il catione attivante è  $\text{NH}_4^+$ , confermando la diversa sensibilità all'ouabaina delle due ATPasi Na-dipendenti, considerata una delle principali caratteristiche distintive tra le due attività enzimatiche (Proverbio et al. 1981).

## **Risposta delle attività ATPasiche ai composti organostannici**

Per studiare l'effetto di questi contaminanti si ricorda che è stato seguito un duplice approccio, *in vitro* e *in vivo*.

Considerando in primo luogo l'insieme dei risultati ottenuti dalle prove *in vitro* e confrontandoli con i dati precedenti in letteratura emergono alcune osservazioni.

Per quanto riguarda le due ATPasi Na-dipendenti, anche nei molluschi bivalvi la Na,K-ATPasi, viene inibita da concentrazioni crescenti di TBT, e in mitilo anche di DBT, come dimostrato precedentemente in teleostei eurialini (Alkail et al. 2004; Hartl et al. 2001b; Pinkney et al. 1989); questo effetto appare inoltre specifico e limitato alla Na,K-ATPasi, in quanto la coesistente Na-ATPasi ouabaina insensibile appare refrattaria alla presenza di concentrazioni di TBT e DBT che inibiscono la Na,K-ATPasi.

Confermando precedenti osservazioni sull'effetto di contaminanti saggiati *in vitro* (Pagliarani et al. 1996), i composti alchilstannici qui utilizzati hanno mostrato un diverso effetto sulle due attività Na-dipendenti di membrana in queste specie di molluschi bivalvi. Le due ATPasi Na-dipendenti sembrano essere modulate in modo diverso da una varietà di effettori. Dall'esame della letteratura infatti risulta che diversi composti endogeni ed esogeni sono stati dimostrati in grado di avere un diverso effetto sulla Na,K-ATPasi e sulla Na-ATPasi insensibile all'ouabaina; inoltre sia in vertebrati che in invertebrati le due attività ATPasiche sono state dimostrate modulate in modo diverso da condizioni di saggio quali pH, ATP,  $Mg^{2+}$  e concentrazione di  $Na^+$  (Pagliarani et al. 1999; Ventrella et al. 1992; Proverbio et al. 1991; Borgatti et al. 1985). Le due attività enzimatiche sono state trovate infatti diversamente sensibili, oltre che all'ouabaina, inibitore specifico per la Na,K-ATPasi, anche a svariate sostanze farmacologicamente attive a diversa struttura come il diuretico furosemide e l'acido etacrinico (Proverbio et al. 1991; Borgatti et al. 1985), saponine (Silva et al. 2005) ed ad alcuni modulatori endogeni (Caruso-Neves et al. 2004; De Souza et al. 2004). Si può cercare di interpretare questa differenza nella risposta delle due ATPasi a vari effettori in termini di accessibilità dei vari composti saggiati alla struttura di membrana inclusi i recettori (De Souza et al. 2004) e/o alla diversa interazione degli xenobiotici con il microambiente lipidico di membrana delle due ATPasi (Silva et al. 2005; Chicano et al. 2002), non per ultima, a una possibile diversa struttura dei siti catalitici dei due complessi enzimatici. Nonostante il meccanismo coinvolto nella diversa risposta delle due ATPasi Na-dipendenti a questi composti sia ancora da chiarire, la diversa sensibilità delle due attività enzimatiche a substrati e inibitori è stata usata per differenziare le due attività enzimatiche, e ha fatto ipotizzare un differente ruolo delle due attività

enzimatiche nella modulazione di meccanismi fisiologici quali l'adattamento ai cambiamenti di salinità nei pesci teleostei eurialini (Borgatti et al. 1985) e il riassorbimento renale di sodio nei mammiferi (De Souza et al. 2004). In quest'ottica, la diversa risposta della Na,K-ATPasi e della Na-ATPasi ai composti organostannici saggiati costituisce nei molluschi bivalvi un ulteriore fattore distintivo tra le due attività ATPasiche.

Anche se l'inibizione della Na,K-ATPasi da parte del TBT, e nel mitilo anche del DBT, è evidente sia nelle branchie che nel mantello, in entrambe le specie l'attività enzimatica sembra più sensibile nelle branchie rispetto al mantello, specialmente considerando la più alta concentrazione saggiata. La risposta dell'attività Na,K-ATPasica al TBT, diversa nei due tessuti, in entrambe le specie, può essere spiegata, almeno in parte, considerando la diversa composizione lipidica nei due tessuti. La composizione in acidi grassi dei fosfolipidi di membrana infatti, oltre che la struttura delle teste polari, è stata riscontrata di fondamentale importanza nel favorire o meno l'incorporazione dei composti organostannici nelle membrane. (Bertoli et al. 2001). Su queste basi, la diversa composizione in acidi grassi della membrana plasmatica riscontrata in branchie e mantello di mitilo (Trigari et al. 2001) potrebbe essere tale da favorire nelle branchie l'incorporazione e l'interazione del TBT con il complesso enzimatico. In generale comunque, come precedentemente osservato in un'altra sperimentazione (Pagliarani et al. 1996), il comportamento tessuto-specifico mostrato nella inibizione delle attività enzimatiche da contaminanti può essere riferibile a meccanismi di incorporazione e detossificazione diversi a seconda del tessuto. Sembra inoltre importante rilevare che la determinazione della Na,K-ATPasi avviene a pH 7 al quale il TBT è presente principalmente nella sua forma lipofila neutra e quindi in grado di interagire con le biomembrane che rappresentano il bersaglio della tossicità acuta di questi composti (Hunziker et al. 2001).

Sembra inoltre che la risposta dell'attività ATPasica ai diversi composti alchilstannici dipenda dalla natura stessa del composto saggiato. Diversi lavori sperimentali hanno mostrato come l'effetto dei composti organostannici sulle proteine enzimatiche possa essere messo in relazione alla natura della specie chimica del contaminante (Appel 2004). La differente inibizione dell'attività Na,K-ATPasica promossa dagli alchilstannici saggiati può essere correlata con la diversa struttura e con la polarità delle molecole e quindi con la loro capacità di interagire con i fosfolipidi (Chicano et al. 2002) e con gli altri componenti della membrana. È stato dimostrato che l'interazione degli organostannici con le membrane biologiche dipende dal carattere anfipatico di questi composti (Przestalski et al. 2000) e che tale interazione può causare

alterazioni della funzionalità dei complessi enzimatici legati alla membrana. Probabilmente i composti alchilstannici trisostituiti come il TBT, considerato tra gli inquinanti ambientali maggiormente tossici (Fent 2004), hanno una struttura molecolare particolarmente adatta per interagire con i complessi enzimatici e/o con lo stato fisico del microambiente lipidico. Diversi composti alchilstannici infatti, possono localizzarsi in modo diverso nel doppio strato lipidico (Bertoli et al. 2001). A parte le forme neutre, anche le forme cationiche, come il  $TBT^+$ , sono in grado di essere incorporate nei liposomi ed interagire con gruppi carichi delle macromolecole (Hunziker et al. 2001). Inoltre considerando che le interazioni tra lipidi e Na,K-ATPasi sono di origine sia elettrostatica che non (Esmann e Marsch 2006) anche le forme cariche del contaminante potrebbero avere una certa influenza sul microambiente lipidico e quindi sulle attività enzimatiche di membrana. Su queste basi l'inefficacia del TeET nell'inibire l'attività Na,K-ATPasica può essere attribuita così alla sua completa apolarità che potrebbe impedire o diminuire la sua interazione a livello delle strutture di membrana (Dopp 2007). Considerando gli altri composti saggiati sulle attività ATPasiche di *M. galloprovincialis* il fatto che l'MBT non inibisca la Na,K-ATPasi, così come la minor efficacia del DBT rispetto al TBT, potrebbe essere interpretata considerando che queste molecole potrebbero disporre di una combinazione inadeguata di cariche elettriche e struttura che potrebbe diminuire la loro accessibilità alle membrane microsomiali (Przestalski et al. 2000) e/o diminuire la loro interazione *in vitro* con le proteine enzimatiche. Ranke e Jastorff (2000) hanno messo in relazione l'effetto di diversi organostannici sui canali ionici di membrana con una combinazione favorevole di cariche positive ed elevata lipofilicità. Come già suggerito (Srivastava 1990), l'inibizione da parte di composti organostannici della Na,K-ATPasi, potrebbe rappresentare una delle basi biochimiche della loro tossicità; l'ordine di efficienza dei composti saggiati nell'inibire la Na,K-ATPasi è infatti lo stesso dell'efficienza come biocidi (Appel 2005; Rudel 2003).

Per quanto riguarda la Mg-ATPasi mitocondriale, le proprietà emerse durante la sua caratterizzazione in *M. galloprovincialis*, e cioè la dipendenza da magnesio e l'inibizione da parte dell'inibitore specifico oligomicina, permettono di attribuire l'attività ATPasica riscontrata all'enzima ATP sintasi. I parametri di saggio risultati come ottimali per la determinazione enzimatica quali concentrazione di  $MgCl_2$ , di substrato attivante ATP e di oligomicina, sono in linea con quelli riscontrati per la determinazione di questa attività enzimatica sia in mammiferi (Saad-Neheme et al. 2001; Zheng e Ramirez 1999; Bhatnagar e Ramalah 1998), che in pesci (Sørensen 1985). L'unico parametro che si discosta sensibilmente dai parametri di saggio riportati

in altre specie animali (attorno a 8) è il valore di pH, che in *M. galloprovincialis*, risulta più alto (attorno a 9).

La Mg-ATPasi mitocondriale da lungo tempo è stata considerata un bersaglio dei contaminanti organostannici (Saxena 1987); anche nel caso di *M. galloprovincialis* come già riscontrato in mammiferi (Matsuno-Yagi e Hatefi 1993), batteri (von Balmoos 2004) e lieviti (Cain e Griffiths 1977), questa attività enzimatica risulta fortemente inibita dal TBT. L'inibizione della Mg-ATPasi operata dal TBT risulta molto più pronunciata rispetto a quella della Na,K-ATPasi; in questo caso infatti la massima inibizione si raggiunge a concentrazioni di contaminante minori. L'ipotesi che l'interazione del TBT con la proteina enzimatica avvenga in un sito diverso rispetto a quello del substrato attivante ATP (Ueno 2005), è appoggiata dalla cinetica di inibizione non competitiva della Mg-ATPasi di mitilo.

La Mg-ATPasi, come la Na,K-ATPasi è stata riscontrata maggiormente sensibile al TBT nelle branchie rispetto al mantello, come indicano i valori di  $K_i$  (Tabella 2.1b2e). Anche in questo caso probabilmente ancora la diversa composizione dell'intorno lipidico, fondamentale nel modulare la Mg-ATPasi (Itoi et al. 2003; Sørensen 1986; Calanni Rindina et al. 1986) e nel favorire l'incorporazione del contaminante (Chicano et al. 2002; Bertoli et al. 2001) può avere un suo ruolo nel determinare la diversa sensibilità dell'attività enzimatica nei due tessuti. Ammettendo che il TBT venga incorporato nella membrana mitocondriale interna e interagisca con la struttura enzimatica, si può ipotizzare che in presenza di una diversa incorporazione del contaminante nella membrana, l'attività Mg-ATPasica possa risultare più o meno inibita. Questo meccanismo potrebbe render conto almeno in parte l'andamento osservato per l'inibizione della Mg-ATPasi.

Se l'interazione dei composti organostannici con le membrane biologiche è stata ampiamente studiata, seppure nella maggior parte dei casi in sistemi modello, il meccanismo di interazione di tali composti con le strutture enzimatiche di membrana è tuttora da chiarire. Oltre alla perturbazione del microambiente lipidico, l'interazione dei composti organostannici con le strutture enzimatiche di membrana potrebbe rappresentare un ulteriore meccanismo che contribuisce alla loro tossicità (Lo et al. 2003). Alcune ricerche indicano che l'inibizione di alcuni complessi enzimatici da parte di composti organostannici potrebbe coinvolgere l'alterazione di gruppi tiolici attraverso l'interazione con residui di cisteina con la possibile formazione di un complesso penta-coordinato (Saxena 1987; Smith et al. 1979). Tale interazione porterebbe alla modificazione dei legami disolfurici essenziali per la normale struttura e funzionalità dell'attività enzimatica (Cima e Ballarin 2005; Lo et al. 2003; Ohhira et al.

2003). La capacità del DTE, immesso a contatto con la frazione microsomale, di impedire l'inibizione della Na,K-ATPasi da TBT, come riscontrato nelle prove *in vitro*, appare in accordo con questa ipotesi (Figura 2.1b1d). Nel caso della Na,K-ATPasi quindi il TBT potrebbe interagire direttamente con i gruppi -SH presenti nella struttura enzimatica.

L'interazione dei composti organostannici con i sistemi biologici appare comunque più complessa: se infatti la loro interazione con proteine enzimatiche attraverso i residui disponibili di cisteina sembra interpretare in molti casi il meccanismo di azione di tali composti, in alcune proteine è stato dimostrato che nessun residuo di cisteina è coinvolto nell'interazione con i composti organostannici trisostituiti (Powers e Beavis 1991). Questo ha fatto supporre che i composti come il TBT siano in grado di interagire con le proteine enzimatiche attraverso diversi meccanismi, alcuni dei quali non implicano necessariamente la presenza di residui specifici. Altri meccanismi prevedono la costituzione di strutture anche complesse in cui i composti organostannici interagiscono con residui amminoacidici che non coinvolgono gruppi tiolici (Powers e Beavis 1991; Saxena 1987). D'altra parte il fatto che composti ditiolici non sempre siano in grado di impedire l'azione dei composti organostannici è indice dell'ampia variabilità di affinità di tali composti per le diverse proteine enzimatiche (Powers e Beavis 1991). Infatti diversamente dalla Na,K-ATPasi il mancato effetto del DTE nell'impedire l'inibizione della Mg-ATPasi da TBT (Figura 2.1b2i) sembra dimostrare che in questo caso l'inibizione del contaminante si esplica attraverso meccanismi diversi dall'interazione con i gruppi -SH della proteina. Tali dati inoltre sono in accordo con le osservazioni di von Ballmoos et al. (2004) secondo cui la natura dell'interazione tra enzima e TBT non coinvolgerebbe gruppi tiolici e sarebbe di tipo non covalente.

Per quanto riguarda le prove *in vivo* con esposizione dei mitili al TBT, è importante sottolineare che, data la trascurabile mortalità riscontrata in tutte le vasche, le concentrazioni di contaminante utilizzate, pur essendo elevate, sono risultate in pratica non letali, confermando la nota resistenza di questi molluschi ad ambienti fortemente contaminati. Inoltre l'assenza di differenze rispetto ai controlli anche per i parametri considerati (indice di condizione, contenuto d'acqua) confermano le buone condizioni in cui si presentavano gli animali, anche dopo 120 ore di esposizione al TBT. Le prove *in vivo*, condotte in presenza di diverse concentrazioni di TBT riscontrabili anche nell'ambiente naturale (Barroso et al. 2004; Bortoli 2003) hanno mostrato una diversa e complessa risposta delle attività ATPasiche di mitilo solo in parte in linea con quanto osservato nelle prove *in vitro*, facendo intravedere un quadro più complesso. Una diversa risposta delle attività di membrana ATPasiche Na-dipendenti a diversi

contaminanti *in vivo* e *in vitro* è già stata riscontrata da diversi autori (Pagliarani et al. 1996; Maier e Costa 1990; Watson e Beamish 1981). L'assenza di inibizione della Na,K-ATPasi in entrambi i tessuti considerati dopo esposizione dei mitili al TBT indipendentemente dalla dose e dal tempo di esposizione è in accordo con prove di esposizione al TBT effettuate su pesci (Hartl 2001c) e crostacei (Lignot et al. 1998), secondo le quali nessuna variazione dell'attività Na,K-ATPasica è riscontrata rispettivamente dopo sei e quattro giorni di esposizione.

La Na-ATPasi ha confermato la sua refrattarietà al contaminante nelle branchie confermando l'ipotesi di un suo ruolo fondamentale nel mantenimento della regolazione ionica in questo tessuto. Abbastanza sorprendente è l'inibizione della Na-ATPasi di mantello, confermata nelle 2 replicazioni, riscontrata dopo 24 ore di esposizione al TBT nei mitili del gruppo TBT 2 e 120 ore in entrambi i trattamenti sperimentali, vista la generale refrattarietà di questa attività enzimatica ai contaminanti organostannici saggiati, sia *in vitro* che *in vivo*. Dobbiamo comunque tener presente che, in concomitanza al primo prelievo, è stata riscontrata una diminuzione di pH (Figura 1.3b1) che potrebbe avere favorito una diversa speciazione del contaminante con probabile comparsa, almeno in parte, della forma  $TBT^+ Cl^-$  che potrebbe aver interagito diversamente con le strutture di membrana rispetto a quelle neutre prevalenti a pH 8 come riportato in letteratura (Fent 2004). *In vitro* era stata riscontrata una lieve, anche se non significativa ( $p \leq 0,05$ ) inibizione della Na-ATPasi da DBT; possiamo pensare che una volta incorporato nei tessuti il TBT venga in parte dealcolato (Rivaro et al. 1996), per cui dobbiamo considerare che le risposte registrate nelle prove di esposizione sono in realtà la risultante degli effetti prodotti da TBT e derivati e non dal solo TBT immesso nell'acqua di mantenimento. Anche se i meccanismi in gioco sono ancora da chiarire, possiamo ipotizzare che la Na-ATPasi di mantello possa avere risentito di una concomitanza di effetti, a cui forse non è estraneo l'abbassamento del pH ambientale dopo 24 di trattamento, che può avere favorito interazioni del contaminante, inducendo quindi una minore attività enzimatica rispetto ai controlli. La composizione di membrana del mantello potrebbe essere risultata in questo caso, e a quel pH, più favorevole all'incorporazione del contaminante rispetto a quella delle branchie, tessuto in cui in generale nelle prove *in vitro* la Na,K-ATPasi si è rivelata invece più sensibile. L'interazione del contaminante potrebbe aver prodotto una diminuzione permanente dell'attività enzimatica che di fatto risulta inferiore a quella del controllo anche nel prelievo successivo. Vale la pena di osservare che ancora una volta le due attività ATPasiche Na-dipendenti mostrano una diversa risposta al contaminante.

Una risposta particolarmente interessante è quella mostrata dalla Mg-ATPasi che, dopo 120 ore di esposizione, ha rivelato sia nelle branchie che nel mantello un'attività enzimatica superiore a quella riscontrata nei controlli. Un'attivazione enzimatica in mitili esposti a contaminanti era già stata riscontrata per le ATPasi Na-dipendenti (Pagliarani et al. 1996) e attribuita all'incorporazione del contaminante nel microambiente lipidico di membrana.

Il diverso effetto ottenuto sulla Mg-ATPasi non è comunque necessariamente attribuibile all'azione del TBT, ma potrebbe essere causato dall'azione di altri metaboliti incorporati nella membrana mitocondriale. Tale incorporazione potrebbe aver influito sullo stato fisico di membrana favorendo conformazioni del complesso enzimatico e portando ad una stimolazione dell'attività enzimatica, in modo analogo a quanto riscontrato per altri xenobiotici (Gordon et al. 1980).

## 4. Conclusioni

Dall'esame dei risultati ottenuti complessivamente nella presente ricerca si possono trarre alcune osservazioni di rilievo, relative più in generale all'interazione dei contaminanti con le ATPasi di membrana, che, come ampiamente motivato nella parte introduttiva, sono state studiate in vongole e mitili.

Un discorso a parte merita l'interazione dello ione ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ), la forma prevalente dell'azoto ammoniacale che costituisce il principale contaminante in acquacoltura, con le due attività ATPasiche attivate da  $\text{Na}^+$  della membrana plasmatica. La dimostrata capacità di sostituzione dei cationi monovalenti attivanti specifici, e cioè  $\text{K}^+$  nell'attivazione della Na,K-ATPasi, e  $\text{Na}^+$  in quella della ATPasi insensibile all'ouabaina, da parte del  $\text{NH}_4^+$ , che in qualche modo conferma dati di letteratura in vertebrati (Ventrella et al. 1987) e invertebrati (Ventrella et al. 1992a), anche se scarsi per la Na-ATPasi, ancora in generale poco studiata, apre interessanti prospettive sul ruolo che le due attività ATPasiche potrebbero svolgere nel trasporto della forma carica  $\text{NH}_4^+$  attraverso la membrana plasmatica. Vale la pena notare che per la Na,K-ATPasi questo ruolo è stato già prospettato e correlato all'escrezione azotata in pesci (Randall e Tsui 2002; Wood 1993) e crostacei (Santer e Phillips 2002; Weihrauch et al. 2002) e anche individuato come un possibile meccanismo di tossicità dell'ammoniaca, attraverso l'alterazione del gradiente ionico tra i due compartimenti intra- ed extracellulare (Randall e Tsui 2002). Al contrario per l'ATPasi insensibile all'ouabaina, finora non studiata sotto questo aspetto, non sono state riportate osservazioni in proposito e quindi la presente ricerca può essere vista come un primo passo in questa direzione. Sembra infatti possibile, anche considerando gli scarsi dati disponibili in letteratura, che tuttavia mostrano una sensibilità di questa attività enzimatica all'azoto ammoniacale, diversa da quella della coesistente Na,K-ATPasi (Pagliarani et al. 1996), ipotizzare che anche la Na-ATPasi possa essere coinvolta nel trasporto di  $\text{NH}_4^+$ , e quindi nella regolazione cellulare di cationi monovalenti. In questi processi entrambe le attività enzimatiche potrebbero in qualche modo cooperare nell'escrezione dell'azoto ammoniacale in condizioni di particolare accumulo di ammoniaca, specie nei molluschi bivalvi, in cui generalmente l'attività ATPasica insensibile all'ouabaina si mostra relativamente elevata rispetto alla coesistente Na,K-ATPasi (Trombetti et al. 1992). Su queste basi, può non essere troppo azzardato pensare che, oltre alla Na,K-ATPasi, anche la Na-ATPasi insensibile all'ouabaina potrebbe essere compresa tra i meccanismi attraverso cui si spiega la tossicità dell'azoto ammoniacale.

Più variamente articolato è stato il lavoro svolto sull'effetto di contaminanti organostannici TBT e derivati sulle due ATPasi Na-dipendenti della membrana plasmatica e sulla Mg-ATPasi mitocondriale, già indicata come bersaglio dell'azione tossica di questi contaminanti (von Ballmoos 2004).

Il primo dato che emerge dai risultati ottenuti è la diversità di risposta agli effettori saggiati tra le due attività ATPasiche Na-dipendenti. Infatti, mentre la Na,K-ATPasi è inibita dal TBT e, in modo meno rilevante, dal DBT, la Na-ATPasi si è mostrata refrattaria a questi contaminanti in tutti i tessuti saggiati (branchie e mantello) e in entrambe le specie (vongole e mitili). Pertanto la diversa sensibilità ai composti organostannici può essere vista come un ulteriore tassello che si aggiunge al mosaico di effetti diversi sulle due attività ATPasiche riportati in letteratura, esercitati da parametri di saggio (Pagliarani et al. 1999; Ventrella et al. 1992; Proverbio et al. 1991; Borgatti et al. 1985) e svariate specie chimiche, comprendenti contaminanti ambientali (Pagliarani et al. 1996), modulatori endogeni (Caruso-Neves et al. 2004; De Souza et al. 2004) ed esogeni (Proverbio et al. 1991; Borgatti et al. 1985). Gli effetti di tutti questi composti, a cui ora possiamo aggiungere a pieno titolo gli organostannici studiati, hanno contribuito a caratterizzare come funzionalmente distinte le due attività ATPasiche Na-dipendenti, riscontrate, anche se con un ampio spettro di variazioni nei rapporti reciproci, in un gran numero di specie animali, dagli invertebrati ai Mammiferi (Proverbio et al. 1981).

E' interessante notare che, dal momento che l'efficienza di inibizione della Na,K-ATPasi dei contaminanti nell'ordine: TBT >DBT >>>>MBT = TeET (nessun effetto), evidenziata nei tessuti di mitilo, segue l'ordine di tossicità riportata in letteratura per questi composti (Appel 2005; Rudel 2003). L'inibizione della Na,K-ATPasi, finora considerata in modo limitato nell'ampia letteratura dedicata agli effetti dei composti organostannici (Samuel et al. 1998; Machera et al. 1996; Srivastava 1990), potrebbe portare all'alterazione della regolazione ionica cellulare, e con essa alla conseguente perturbazione dei meccanismi biochimico-fisiologici legati al gradiente ionico transmembrana; questo potrebbe quindi rappresentare un meccanismo di tossicità dei composti alchilostannici, come già osservato per lo stesso azoto ammoniacale (Randall e Tsui 2002).

Un'altra osservazione degna di nota, considerando l'inibizione della Na,K-ATPasi della membrana plasmatica e della Mg-ATPasi mitocondriale, riguarda la diversità dei meccanismi prospettati nell'inibizione enzimatica da TBT. Indubbiamente è un dato di fatto che ambedue le attività ATPasiche vengono inibite dal TBT, come hanno dimostrato costantemente le prove *in vitro*, in linea con i dati di letteratura che indicano principalmente e da lungo tempo la Mg-ATPasi come bersaglio di TBT e derivati (Ueno

et al. 2005; Hunziker et al. 2002; Papa 1982; Cain et al. 1977), e, nelle poche specie di animali acquatici considerati (Hartl et al. 2001b; Pinkney et al. 1989), riportano inibizione della Na,K-ATPasi. Mentre però l'inibizione della Na,K-ATPasi sembra dovuta, almeno in base alle prove effettuate utilizzando reagenti tiolici (DTE), ad una possibile interazione con i gruppi -SH della proteina enzimatica, meccanismo già ampiamente indicato per TBT e derivati (Smith et al. 1979; Saxena 1987), quella della Mg-ATPasi mitocondriale non risulta impedita da reagenti tiolici e segue inoltre una cinetica non competitiva nei confronti del substrato ATP. Ammettendo che nei molluschi la struttura e funzione della Mg-ATPasi mitocondriale non siano sostanzialmente diversi da quanto riportato in batteri, funghi e mammiferi (von Balmoos et al. 2004), come del resto la sua spiccata sensibilità all'inibitore specifico oligomicina e i pochi dati di letteratura disponibili sulla catena respiratoria mitocondriale nei mitili sembrano indicare (Powers e Beavis 1991), il tipo di inibizione evidenziato per la Mg-ATPasi mitocondriale di *M. galloprovincialis* potrebbe essere simile a quello dimostrato per microorganismi. In questi, il TBT sembra inserirsi nel canale protonico della subunità  $\alpha$ , probabilmente grazie ad interazioni non covalenti, bloccando il flusso protonico e quindi la funzione del complesso enzimatico (Ueno et al. 2005).

A questo punto bisogna tener conto del fatto che, come del resto già ribadito ripetutamente dalla letteratura (Pellerito et al. 2006; Saxena 1987), l'interazione del TBT con le proteine enzimatiche si possa attuare attraverso diversi tipi di legame. Quindi le due attività ATPasiche di membrana inibite da TBT nel presente studio, la Na,K-ATPasi e la Mg-ATPasi, potrebbero rappresentare esempi di diversi meccanismi di interazione del TBT. Per le attività enzimatiche di membrana occorre considerare inoltre un altro meccanismo di possibile modulazione dell'attività enzimatica che prevede l'incorporazione di contaminanti lipofili nel doppio strato lipidico (Appel 2004). A questo proposito occorre tener presente che l'incorporazione dei composti organostannici nelle membrane cellulari e la capacità di attraversamento di queste, processo indispensabile per la manifestazione degli effetti citotossici (Dopp et al. 2007), è stata dimostrata dipendere da una varietà di fattori. Tra questi, la composizione di teste polari e di catene aciliche, e quindi di acidi grassi, dei fosfolipidi che costituiscono il doppio strato di membrana sembra rivestire un ruolo primario (Chicano et al. 2002; Bertoli et al. 2001). Su tali basi, la diversa composizione di membrana nei diversi tessuti e specie animali, limitando o meno l'incorporazione del contaminante, potrebbe spiegare non solo la diversa entità degli effetti o anche effetti discordanti osservati nella presente sperimentazione, ma anche talune apparenti discrepanze negli effetti degli

alchilstannici riportate in letteratura in diverse condizioni sperimentali. Pertanto, nel considerare i risultati ottenuti, è opportuno sempre tener presente il ventaglio di possibili meccanismi attraverso cui si esplica l'interazione di TBT e derivati con le proteine enzimatiche. Si può ipotizzare che il prevalere dell'una o dell'altra di queste modalità di interazione possa rendere ragione dei diversi tipi di inibizione riscontrati e anche della diversa entità di inibizione registrata in materiali biologici e condizioni sperimentali diverse.

Com'era in parte da attendersi, la sperimentazione *in vivo* con esposizione dei mitili al TBT ha mostrato effetti poco sovrapponibili con quanto riscontrato nelle prove *in vitro*, utilizzando animali della stessa specie, e anche evidenziato risultati diversi nei due campionamenti effettuati dopo 24 e 120 ore di esposizione al contaminante. Come accennato prima, queste differenze non sorprendono più di tanto, in quanto spesso effetti di contaminanti saggiati *in vitro* e *in vivo* sulle stesse attività enzimatiche hanno mostrato risultati diversi (Pagliarani et al. 1996; Maier e Costa 1990; Watson e Beamish 1981). Sicuramente, essendo i mitili eccellenti filtratori ed essendo confinati in un ambiente limitato in cui veniva progressivamente aggiunto TBT, dobbiamo assumere che i loro tessuti direttamente esposti al mezzo esterno quali branchie e mantello siano venuti a contatto con il contaminante e l'abbiano incorporato. E' noto che l'incorporazione di xenobiotici e la loro interazione con strutture enzimatiche può produrre inibizione o attivazione enzimatica, anche tramite l'induzione di variazioni conformazionali della struttura del complesso enzimatico o di parte di esso (Ueno 2005). Pertanto non appare strano che in alcuni casi negli animali esposti al TBT l'attività Mg-ATPasica risulti maggiore rispetto ai controlli. Nel considerare questi risultati e nel confrontarli con quelli ottenuti nelle prove *in vitro*, dobbiamo tuttavia tener presente che il TBT non rimane inalterato nei tessuti (Rivarolo et al. 1996) e quindi probabilmente anche i suoi derivati parzialmente dealchilati concorrono a produrre gli effetti osservati. Per ciascuna delle attività enzimatiche considerate, gli effetti riscontrati *in vivo* sono quindi la risultante non solo dei diversi tipi di interazione del TBT con le proteine enzimatiche, come osservato per le prove *in vitro*, ma anche della pluralità di effetti esercitati da metaboliti, mediati dai processi metabolici di adattamento dell'animale. Nonostante queste difficoltà di interpretazione degli effetti osservati, le prove *in vivo* rimangono fondamentali nel considerare effetti di contaminanti ambientali, in quanto riproducono sia pure in modo estremamente semplificato e in condizioni controllate, situazioni di contaminazione dell'ambiente naturale e quindi possono fornire indicazioni sull'effetto dell'esposizione a breve termine ai contaminanti.

Ambedue i tipi di approccio sperimentale, *in vivo* e *in vitro*, hanno mostrato che le attività ATPasiche in studio sono sensibili ai composti organostannici e quindi sembra ragionevole pensare che queste attività enzimatiche possano rappresentare meccanismi attraverso cui si esplica l'azione tossica di questi contaminanti.

Concludendo, i dati raccolti complessivamente in questa ricerca possono rappresentare un tentativo di far luce sui meccanismi biochimici implicati, a livello di attività ATPasiche di membrana coinvolte in processi biologici chiave quali la regolazione ionica cellulare e la fosforilazione ossidativa mitocondriale, nella tossicità di contaminanti ambientali nei confronti di specie marine, che costituiscono i primi anelli della catena trofica e sono molto poco studiati sotto questo aspetto.

Anche se ovviamente molti studi sono ancora necessari per arrivare a definire le interazioni dei contaminanti considerati con le proteine enzimatiche, vista la complessità dei meccanismi coinvolti, la pluralità di fattori che possono sovrapporsi e, non ultimo, la scarsità di dati disponibili in letteratura su queste ATPasi di membrana nei molluschi bivalvi, non sembra azzardato affermare che la presente ricerca pone le basi per ulteriori passi in questa direzione.

## 5. Bibliografia

- A.A. VV., 1990. *Tapes philippinarum* – Biologia e sperimentazione. Regione Veneto E.S.A.V.
- Ali F. and Nakamura K. 2000. Metabolic characteristics of the Japanese clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve) during aerial exposure. *Aquaculture Research* 31 157-165.
- Alkail A.R.A.A, Askar A.I., Younis L.K., El-Gendy K.S., Abbas M.M., Marei A.S.M. 2004. Risk assessment of tributyltin oxide in aquatic environment: a. Toxicity and sublethal effects on brain AChE and gill ATPases activity of tilapia fish, *Oreochromis niloticus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(7), 1117-1120.
- Alzieu C., Sanjuan J., Michel P., Borel M., Dreno J.P. 1989. Monitoring and assessment of butyltins in Atlantic coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 20 22-26
- Appel K.E., 2004. Organotin compounds: toxicokinetic aspects. *Drug Metabol. Rew.* 36 (3 & 4) 763-786.
- ARPA–Regione Emilia-Romagna, 2002. Eutrofizzazione delle acque costiere dell'Emilia Romagna, rapporto annuale. Struttura oceanografica Daphne. Assessorato ambiente studi e documentazione.
- Arthur J.W., West C.W., Allen K.N., Hedtke S.F., 1987. Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrates species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38 324-331.
- Baccetti B., Bedini C., Capanna E., Cobolli M., Ghirardelli E., Giusti F., Minelli A., Ricci N., Ruffo S., Sarà M., Zullini A., 1994. Lineamenti di zoologia sistematica. Zanichelli Bologna 200-212.
- Barroso C.M., Mendo S., Moreira M.H. 2004. Organotin contamination in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Portuguese coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 48 1145-1167.
- Bayne B.L., 1976. *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press.
- Bernat P. e Dlużoński J., 2006. Acceleration of tributyltin chloride (TBT) degradation in liquid cultures of the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Chemosphere* 62. 3-8
- Bhatnagar V. e Ramalah A. 1998 Characterization of Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity in isolated B16 murine melanoma melanosomes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 189 99-106.
- Biancotto R., Rado N., Zanon F. 2004. I composti organostannici studio triennale sull'accumulo nell'ecosistema della laguna di Venezia. *Giornale dell'Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto* 1 8-9.
- Blanco G. e Mercer R.W. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 275 F633-F650.
- Blanco G., 2000. The Na/K ATPase. A family of isozymes with different function. IV Biophysics Congress of Southern Cone, 19-22 Campinas SP, Brazil.
- Borgatti A.R., Pagliarani A., Pirini M., Trigari G., Trombetti F., Ventrella V., 1998. Effetto dell'ambiente marino costiero sulle caratteristiche biochimiche della regolazione ionica e

- della catena respiratoria dei mitili in allevamento. *Biologia marina mediterranea* 5 (3) 1070-1079.
- Borgatti A.R., Trigari G., Pagliarani A., Ventrella V., 1985. Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-stimulation of a microsomal Mg<sup>2+</sup>-ATPase in gills of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 81A 127-135.
- Bortoli A., Troncon A., Dariol S., Pellizzato F., Pavoni B. 2003. Butyltins and phenyltins in biota and sediments from the Lagoon of Venice. *Oceanologia* 45 (1) 7-23.
- Boscolo R., Cacciatore F., Berto D., Marin M.G., Giani M. 2004. Contamination of natural and cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* from the northern Adriatic Sea by tributyltin and dibutyltin compounds. *Appl. Organometal. Chem* 18 614-618.
- Bouchard N., Pelletier E., Fourniers M. 1999. Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. *Environment. Toxicol. Chem.* 18 519-522.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1/2) 248-254.
- Bragadin M., Marton D., Manente S., Scutari G., Toninello A. 2003. Tributyltin and mitochondria: new evidence in support of an uncoupling mechanism and further characterisation of the transport mechanism. *Inorganica Chimica Acta* 348 225-228.
- Bragadin M., Marton D., Manente S., Scutari G., Toninello A. 2003 C'è già nel capitolo 2
- Breber P., 1985. L'introduzione e l'allevamento dell'arsella del Pacifico *Tapes semidecussatus* Reeve. *Oebalia* 11 (2) 75-680.
- Broude N.E., Modyanov N.N., Monastyrskaya G.S., Svrdbov E.D., 1989. Advances in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase studies: from protein to gene and back to protein. *FEBS Letters* 257 1-9.
- Brownes S.J., McQuaid C.D. 2006 Will the invasive mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamark replace the indigenous *Perna perna* L. on the south coast of South Africa?" *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 338 140-151.
- Buk-Koehntop B.A., Porcelli F., Lewin J.L., Cramer C.J., Veglia G. 2006. Biological chemistry of organotin compounds: interactions and dealkylation by dithiols. *Journal of Organometallic Chemistry* 691 1748-1755.
- Cain K., Hyams R.L., Griffiths D.E. 1977. Studies on energy-linked reactions: inhibition of oxidative phosphorylation and energy-linked reactions by dibutyltin dichloride. *Febs Letters* 82 (1) 23-28.
- Calanni Rindina F., Baracca A., Solaini G., Rabbi A., Parenti Castelli G. 1986 Effects of cholesterol on the kinetics of mitochondrial ATPase. *FEBS Lett.* 198 (2) 353-356.
- Camargo J.A., Alonso A., 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* 32, 831-849.

- Carbajo R.J., Kellas F.A., Runsiwick M.J., Montgomery M.G., Walzer J.E., Neuhaus D. 2005. Structure of the F1-binding domain of the stator of bovine F1F0-ATPase and how it binds an  $\alpha$ -subunit. *J. Mol. Biol.* 351 824-838.
- Caruso-Neves C., Rangel L.B.A., Vives D., Vieyra A., Coka-Guevara S., Lopes A.G., 2000. Ouabain-insensitive  $\text{Na}^+$ -ATPase activity is an effector protein for cAMP regulation in basolateral membranes of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* 468 107-114.
- Caruso-Neves C., Sequeira A.S.E., Iso-Choen G., Lopes A.G. 1999. Bradykinin modulates the ouabain-insensitive  $\text{Na}^+$ -ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* 1431 483-491.
- Cesari P. e Pellizzato M., 1990. *Tapes philippinarum* biologia e sperimentazione. *ESAV* 23-39.
- Chandrinou S., Stasinakis A.S., Nikolaou A., Wegener J.W. 2007 Distribution of organotin compounds in the bivalves of the Aegean Sea, Greece. *Environment International* 33 (2) 226-232.
- Charnock J.S., Simpson L.P., Dryden W.F., 1980. Seasonal variation in myocardial ( $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$ )-ATPase activity and [ $^3\text{H}$ ] ouabain binding in hibernating mammal: positive correlation with the pharmacological effects of ouabain. *Comp. Biochem. Physiol.* 65 B 681-686.
- Chen J.C. e Lay S.H., 1992. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus japonicus* adolescent exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 120 C (1) 129-133.
- Cima F., Marin M.G., Matozzo V., Da Ros L., Ballarin L. 1999. Biomarkers for TBT immunotoxicity studies on the cultivated clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). *Marine Pollution Bulletin* 39, 112-115.
- Clausen T., Van Hardevelde C., Everets M.E., 1991. Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. *Physiol. Rev.* 71 (3) 733-774.
- Coelho M.R., Bebianno M.J., Langston W.J. 2002. Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus* as vectors of TBT uptake. *Marine Environment Research* 54 179-192.
- Coelho M.R., Langston W.J., Bebianno M.J. 2006. Effect of TBT on *Ruditapes decussatus* juveniles. *Chemosphere* 63 (9) 1499-1505.
- Cognetti G., 1992. Inquinamenti e protezione del mare. *Calderini* 9-12.
- Connerton I.F., Griffiths D.E. 1989. Organotin compounds as energy-potentiated uncouplers of rat liver mitochondria.
- Cornelius F. 2001. Modulation of  $\text{Na},\text{K}$ -ATPase and  $\text{Na}$ -ATPase activity by phospholipids and cholesterol. I. steady-state kinetics. *Biochemistry* 40 8842-8851.
- Corsini E., Viviani B., Marinovich M., Galli C.L. 1998. Primary role of mitochondria and calcium ions in the induction of reactive oxygen species by external stimuli such as triorganotins. *Toxicology in vitro* 12 551-556.
- Cortes V.F., Veiga-Lopes F.E., Barrabin H., Alves-Ferreira M., Fontes C.F.L. 2006. The  $\gamma$  subunit of  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase: Role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 1901-1913.

- Dai S., Huang G., Chen C., 1998. Fate of  $^{14}\text{C}$ -labeled tributyltin in an estuarine microcosmos. *Appl. Organometal. Chem.* 12, 585-590.
- De Souza A.M., Lara L.S., Previato J.O., Lopes A.G., Caruso-Neves C., da Silva B.P., Parente J.P. 2004 Modulation of sodium pumps by steroidal saponins. *Z. Naturforsch.* 59c 432-436.
- de Vooy C.G.N. e Geenevasen J.A.J., 2002. Biosynthesis and role in osmoregulation of glycine-betaine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* LMK. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 132 409-414.
- de Zwaan A., Mathieu M. 1992 Cellular Biochemistry and endocrinology. In "The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture". Gosling E., Elsevier. Amsterdam 223-293.
- Del Castillo J.R. e Robinson J.W.L., 1985.  $\text{Na}^+$ -stimulated ATPase activities in basolateral plasma membranes from guinea-pig small intestinal epithelial cells. *Biochim. et Biophys. Acta* 812 413-422.
- Del Castillo J.R., Marín R., Proverbio T., Proverbio F., 1982. Partial characterization of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent-insensitive,  $\text{Na}^+$ -stimulated ATPase activity of kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 692 61-68.
- Devier M-H., Augagneur S., Budzinski H., Mora P., Narbonne J-F., Garrigues P. 2003. Microcosm tributyltin bioaccumulation and multibiomarker assessment in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (11) 2679-2687.
- Dietz S., Ábalos M., Bayona J.M. 2002. Organotin contamination in sediments from the western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. *Water Research* 36 905-918.
- Dietz T.H. e Findley A.M., 1979. Ion-stimulated ATPase activity and  $\text{NaCl}$  uptake in the gills of freshwater mussels. *Can. J. Zool.* 58 917-923.
- Dietz T.H., Wilcox S.J., Byrne R.A., Silverman H., 1997. Effects of hyperosmotic challenge on freshwater mussels. *Can. J. Zool.* 58 917-923.
- Dixon M. e Webb E.C. 1979. *Enzymes*. Academic Press.
- Dopp E., Hartmann L.M., von Recklinghausen U. Florea A.M., Rabieh S., Shokouhi B., Hirner A., Obe G., Rettenmeier A. 2007 The cyto- and genotoxicity of organotin compounds is dependent on the cellular uptake capability. *Toxicology* (in stampa)
- Dubey S.K. e Roy U., 2003. Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. *Appl. Organometal. Chem.* 17, 3-8.
- Dunbar L.A. e Caplan M.J., 2000. The cell biology of ion pumps; sorting and regulation.. *Eur. J. Cell. Biol.* 79 557-563.
- Emanuel E.L., Carver M.A., Solaini G.C. Griffiths D.E. 1984. Differential inhibition of  $\text{F}_0\text{-F}_1$ -ATPase-catalysed reactions in bovine-heart submitochondrial particles by organotin compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 766 (1) 209-214.
- Emerson K.R., Russo R.C., Lund R.E., Thurston R.V., 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *J. Fish. Res. Board Can.* 32 2379-2383.

- EPA 1999. 1999 update of Ambient water quality criteria for ammonia. U.S. Environmental Protection Agency. Da: <http://www.epa.gov/ost/standars/ammonia/99update.pdf>
- Evans S.M. e Nicholson G.J. 2000. The use of imposex to assess tributyltin contamination in coastal water and open sea. *The Science of the Total Environment* 258 73-80.
- Fent 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters* 140-141 353-365
- Fent 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* 205 223-240.
- Fent K. e Looser P.W. 1995. Bioaccumulation and bioavailability of tributyltin chloride: influence of pH and humic acids. *Wat. Res.* 27 (7) 1631-1637.
- Fiske C.G. e Subbarow Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66 375-400.
- Focardi S. e Leonzio C., 2000. I biomarcatori nel monitoraggio costiero. *Biol. Mar. Medit.* 8 (2) 136-145.
- Fossi M.C., 2000. "Biomarkers: strumenti di diagnosi e prognosi ecotossicologica dell'ambiente marino costiero". *Biol. Mar. Medit.* 8 (2) 146-154.
- Furriel R.P.M., Masui D.C., McMamara J.C., Leone F.A. 2004. Modulation of gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by ammonium ions: putative coupling of nitrogen excretion and ion uptake in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Journal of Experimental Zoology* 301A 63-74.
- Gabbianelli R., Moretti M., Carpenè E., Falcioni G. 2006 Effect of different organotins on DNA of mollusk (*Scapharca inaequivalvis*) erythrocytes assessed by the comet assay. *Science of the Total Environment* 367 163-169.
- Gadd G.M. 2000. Microbial interaction with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. *The Science of the Total Environment* 258 119-127.
- Gennari A., Viviani B., Galli C.L., Marinovich M., Pieters R., Corsini E. 2000. Organotins induce apoptosis by disturbance of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 169 185-190.
- Gilles R., 2000. Osmoregulation des liquides extracellulaires" In "Physiologie animale organismique et cellulaire". Da: <http://www.ulg.ac.be/physioan/traite.htm>
- Glynn I.M., 1993. All hands to the sodium pump. *J. of Physiol. Acta* 988 185-220.
- Gogvadze V., Stridh H., Orrenius S., Cotgreave I. 2002 Tributyltin causes cytochrome c release from isolated mitochondria by two discrete mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292 (4) 904-908.
- Gordon K.M., Sauerheber R.D., Esgate J.A., Dipple I., Marchmont R.J., Houslay M.D. 1980. The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 255 (10) 4519-4527.

- Guolan H, Yong W. 1995. Effects of tributyltin chloride on marine bivalve mussels. *Wat. Res.* 29 (8) 1877-1884.
- Harino H., O'Hara S.C.M., Burt G.R., Chesman B.S., Langston W.J. 2005 Distribution of organotin compounds in tissue of mussel *Mytilus edulis* and clam *Mya arenaria*. *Chemosphere* 58 877-881.
- Hartl M.G.I., Hutchinson S., Hawkins L.E., Grand D.I. 2001b. Environmental levels of sediment-associated tri-n-butyltin chloride (TBTCI) and ionic regulation in flounders during seawater adaptation. *Marine Biology* 138, 1121-1130.
- Hartl M.G.J., Hutchinson S., Hawkins L.E. 2001a. Organotin and osmoregulation: quantifying the effects of environmental concentrations of sediment-associated TBT and TPhT on the freshwater-adapted European flounder, *Platichthys flesus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256 267-278.
- Hartl M.G.J., Hutchinson S., Hawkins L.E. 2001c Sediment-associated tri-n-butyltin chloride and its effects on osmoregulation of freshwater-adapted 0-group European flounder, *Platichthys flesus* (L.) *Aquatic Toxicology* 55 125-136.
- Henry R.P., Mangum C.P., 1980. Salt and water balance in the oligohaline clam, *Rangia cuneata* I. Anisotonic extracellular regulation. *Journal of Experimental Zoology*, 211 (1) 1-10.
- Hickey C.W., Martin M.L. 1999. Chronic toxicity of ammonia to the freshwater bivalve *Sphaerium novaezelandiae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36 38-46.
- Hoch M., 2001. Organotin compounds in the environment an overview. *Appl. Geochem.* 16, 719-743.
- Horiguchi T. 2006. Masculinization of female gastropod mullusk induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex. *Environ. Sci.* 13 (2) 77-87.
- Hosler J.P., Ferguson-Miller S., Mills D.A. 2006 Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu. Rev Biochem.* 75 165-187.
- Howland J.L. e Faus I. 1985. Cation-sensitive ATPase from gills of the salt water mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81 B 551-553.
- Hunziker R.W., Escher B.I., Schwarzenbach R.P. 2002 Acute toxicity of triorganotin compounds: different specific effects on the energy metabolism and role of pH. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (6) 1191-1197.
- Ip Y.K., Loong A.M., Hiong K.C., Wong P.W., Chew S.F., Reddy K. 2006. Light induces an increase in the pH of and a decrease in the ammonia concentration in the extrapallial fluid of the giant clam *Tridacna squamosa*. *Physiological and Biochemical Zoology* 79 (3) 656-664.
- Itoi S., Kawahara S., Kondo H., Sakai T., Watabe S. 2003. Changes in mitochondrial fatty acid composition following temperature acclimation of carp and their possible effects on FoF1-ATPase activity. *Physiology and Biochemistry* 29 237-244.

- Johansson O. e Wedborg M., 1980 The ammonia-ammonium equilibrium in seawater at temperatures between 5 and 25°C. *Journal of Solution Chemistry* vol. 9 (1) 37-44.
- Jorgensen P.L., Håkansson K.O., Karlsh S.J.D. 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65 817-849.
- Jurkiewicz M., Averill-Bates D.A., Marion M., Denizeau F. 2004. Involvement of mitochondrial and death receptor pathways in tributyltin-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1693 15-27.
- Kater B.J., Dubbeldam M., Postma J.F. 2006. Ammonium toxicity at high pH in a marine bioassay using *Corophium volutator*. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 51 347-351.
- Ko Y.H., Hong S., Pedersen P.L. 1999. Chemical Mechanism of ATP Synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (4) 28853-28856.
- Kofman E.K., 1986. Anion transport system in the plasma membrane of vertebrate cells. *Biochim. Biophys. Acta* 864 1-31.
- Kurtz I. e Balaban R.S., 1986. Ammonium as a substrate for Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in rabbit proximal tubules. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 250 F497 – F502.
- Lagerspetz K.Y.H. e Senius K.E.O., 1979. ATPase stimulated by Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> in gills of the freshwater mussel *Anodonta*. *Biochem. Physiol.* 62 B (3) 291-293.
- Lagerspetz K.Y.H., Pivovarova N.B., Senius K.E.O. 1992. Monovalent cation activated ouabain-insensitive ATPase in the gills of freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem. Physiol.* 103 B (4) 903-908.
- Le Gal Y., 1988. *Biochimie marine*. Masson Paris 68-89.
- Le Gal Y., 1988. *Biochimie marine*. Masson Paris. 68-89.
- Lee R.F., 1991. Metabolism of tributyltin by marine animals and possible linkages to effects. *Marine Environ. Res.* 32, 29-35.
- Lee R.F., Valkirs A.O., Selingman P.F., 1989. Importance of microalgae in the biodegradation of tributyltin in estuarine waters. *Environ. Sci. Technol.* 23, 1515-1518.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. 1994. *Principi di biochimica*. 2° edizione Zanichelli Bologna 560-563.
- Lenaz G., Fato R., Genova M.L., Bergamini C., Bianchi C., Biondi A. 2006 Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757 1406-1420.
- Leung K.M.Y., Kwong, Ng W.C., Horiguchi T., Qiu J.W., Yang R., Song M., Jiang G., Zheng G.J., Lam P.K.S. 2006. Ecological risk assessments of endocrine disrupting organotin compounds using marine neogasteropods in Hong Kong. *Chemosphere* 65 922-938.
- Lingrel J.B. e Kuntzweiler T., 1994. Na/K-ATPase. *J. of Biological Chemistry* 269 (31) 19695-19662.
- Livingstone D.R. & Pipe R.K., 1992. Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. In *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Gosling, Elsevier Amsterdam 425-464.

- Lo S., Alléra A., Albers P., Heimbrecht J., Jantzen E., Klingmüller D., Steckelbroeck S. 2003. Dithioerythritol (DTE) prevents inhibitory effects of triphenyltin (TPT) on the key enzymes of the human sex steroid hormone metabolism. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 84 569-576.
- Lopez L.B., Quintas L.E.M., Noël F., 2002. Influence of development on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase expression: isoform- and tissue-dependency. *Comp. Bioch. and Physiol. Part A* 131 323-333.
- Machera K., Cotou E., Anastassiadou P. 1996. Fenbutatin acute toxicity on *Artemia nauplii*: effects of sublethal concentrations on ATPase activity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56 159-164.
- Maier W.E. e Costa L.G. 1990 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in rat brain and erythrocytes as a possible target and marker, respectively, for neurotoxicity: studies with chloredacone, organotins and mercury compounds. *Toxicology Letters* 51 175-188.
- Marín M.G., Nesto N., Da Ros L., 2001. Evaluation of biological stress indices in *Tapes philippinarum* from the lagoon of Venice through monitoring of natural populations and trasplantation experiments In *Mediterranean ecosystems, structures and processes*. Faranda F.M., Guglielmo L., Spezie G., Springer-Verlag 91-99.
- Marín R., Proverbio T., Proverbio F., 1983. Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-stimulated ATPase activity associated to basal-lateral plasma membranes of rat kidney cells. *Acta Cient. Venezuela* 34 322-328.
- Marín R., Tiskow G., Rodriguez G., Proverbio F., Proverbio T., 2000. Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase activity and rat kidney ischemia. IV Biophysics Congress of the Southern Pole, Campinas, Brazil S4-2.
- Martin A.W., 1983. Excretion In *The mollusca* vol. 5 Physiology part 2 Saleuddin A.S.M. & Wilbur K.M. Academic Press New York London 378-382.
- Martinelle K, Haggstrom L. 1993. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes. *Journal of Biotechnology*, 30 339-350.
- Masui D.C., Furriel R.P.M., McNamara J.C., Mantelatto F.L.M., Leone F.A., 2002. Modulation by ammonium ions of gill microsomal (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicology e Pharmacology* 132 (4) 471-482.
- Masui D.C., Furriel R.P.M., Silva E.C.C., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C., Barrabin H., Scofano H.M., Fontes C.F.L., Leone F.A. 2005. Gill microsomal (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: interactions at cationic sites. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 2521-2535.
- Matozzo V., Ballarin L., Marin M.G. 2002. In vitro effects of tributyltin on functional response of haemocytes in the clam *Tapes philippinarum*. *Appl. Organometal. Chem.* 16 169-174.
- Matsuda T. e Iwata H., 1986. Difference in phospholipid dependence between two isozymes of brain (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase *Biochim. Biophys. Acta* 860 620-625.
- Matsuno-Yagi A., Hatefi Y. 1993. Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (9) 6168-6173.

- McDonald D.G., Reader J.P., Dalziel T.R.K., 1989. The combined effects of pH and trace metals on fish ion regulation In "Acid toxicity to aquatic animals" Morris R., Taylor E.W., Brown D.J.A., Brown J.A. Cambridge University Press, Cambridge 221-242.
- Mengoli A., 1998. Aspetti morfo funzionali di mitili. Laguna 4 12-19.
- Mičić M., Bihari N., Labura Ž., Muller W.E.G., Batel R. 2001. Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-*n*-butyltin chloride. Aquatic Toxicology 55, 61-73.
- Middelton P., Rankin S., Esmann M., Watts A., 2000. Structural insight into the binding of cardiac glycosides to the digitalis receptor revealed by solid-state NMR. Proc. Natl. Sci. U.S.A. 97 (25) 13602-13607.
- Missiroli M.L. 2000 Metabolismo anaerobico in bivalvi marini Il Pesce Agosto
- Missiroli M.L., 2000. Metabolismo anaerobico in bivalvi marini. Il pesce no. 4. Da: <http://www.ilpesce-online.com>
- Mondovì B., 1977. Biochimica Applicata. Utet Torino.
- Morcillo Y. e Porte C. 2000 Evidence of endocrine disruption in clams *Ruditapes decussata* transplanted to a tributyltin-polluted environment. Environmental Pollution 107 47-52.
- Morcillo Y. e Ronis M.J.J., Porte C. 1998. Effects of tributyltin on the phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam *Ruditapes decussata*. Aquatic Toxicology 42 1-13.
- Morris J.G., 1987. Chimica fisica applicata alle scienze biomediche. Guerrieri F., Lorusso M., Papa S. Editoriale Grasso Bologna 210-213.
- Morton B., 1992. The evolution and success of the heteromyarian form in the mytiloida. In "The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture". Gosling E., Elsevier. Amsterdam 21-48
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. 2000 Harper Biochimica Edizioni McGraw-Hill.
- Nagyvary J. Bechert J. 1999. New insights into ATP synthesis. Biochemical Education 27 193-199
- Nelson D.L. e Cox M.M. 2006. I principi di biochimica di Lehninger. Quarta edizione. Ed. Zanichelli
- Nishikimi A., Kira Y., Kasahara E., Sato E.F., Kanno T. 2001. Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome c release. Biochem. J. 356 621-626.
- Ohno S., Nakajima Y., Nakajin S. 2005 Triphenyltin and Tributyltin inhibit pig testicular 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity and suppress testicular testosterone biosynthesis. Steroids 70 645-651.
- Omae I., 2003. Organotin antifouling paints and their alternatives. Appl. Organometal. Chem. 17, 81-105
- Paesanti F. e Pellizzato M., 2000. *Tapes philippinarum* – Manuale sulla vongola verace d'allevamento. ESAV Padova: 5-18.

- Pagliarani A., Manuzzi M.P., Ventrella V., Pirini M., Trombetti F., Trigari G., Borgatti A.R. 2002. Variazioni delle attività ATPasiche Na<sup>+</sup>-dipendenti in molluschi bivalvi del mare adriatico settentrionale. *Biologia Marina Mediterranea* 9 (1) 690-692.
- Pagliarani A., Trombetti F., Pirini M., Ventrella V., Trigari G., Borgatti A.R., 1991. Cation stimulated ATPase activities in the midgut gland and other tissues from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* (L.). vol. 2. 36° Congresso Nazionale S.I.B., Ferrara. I.B.S.T. 308.
- Pagliarani A., Trombetti F., Ventrella V., Manuzzi M., Pirini M., Trigari G., Borgatti A.R. 1999. Na<sup>+</sup>-dependent ATPase activities in bivalve molluscs from the Adriatic Sea. *Italian Journal of Biochemistry* 48(4), 285-286.
- Pagliarani A., Ventrella V., Trombetti F., Pirini M., Manzi M.P., Trigari G., Borgatti A.R. 2003. Ammonia-N effects on the Na-ATPases in the clam *Tapes philippinarum*: putative involvement of the two enzyme activities under stressful culture condition. *Proceedings 22th ESCPB Annual Congress, Alessandria 4-18 dicembre* 11
- Pagliarani A., Ventrella V., Trombetti F., Pirini M., Trigari G., Borgatti A.R., 1996. Mussel microsomal Na<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase sensitivity to waterborne mercury, zinc and ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 113 C (2) 185-191.
- Pagliarani A., Ventrella V., Trombetti F., Trigari G., Borgatti A.R., 1988. (Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>)-ATPase and Na<sup>+</sup>-stimulated Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase activities in kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 90 B (1) 41-52.
- Palasis M., Kuntzweiler T.A., Argüello J.M., Lingrel J.B., 1996. Ouabain interaction with the H5-H6 hairpin of the Na-K ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. *Am. Soc. Biochem. Molec. Biol.* 271 (24) 14176-14182.
- Papa S., Guerrieri F., De Gomez Puyou T.M., Barranco J., Gomez Puyou A. 1982. Studies on the mechanism of action of tripheniltin on proton conduction by the H<sup>+</sup>-ATPase of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 128 1-7.
- Pellerito C., Nagy L., Pellerito L., Szorcisk A. 2006. Biological activity studies on organotin (IV)<sup>nt</sup> complexes and parent compounds. *Journal of Organometallic Chemistry* 691 1733-1747.
- Pellizzato F., Centanni E., Marin M.G., Moschino V., Pavoni B. 2004. Concentration of organotin compounds and imposex in the gastropod *Hexaplex trunculus* from the Lagoon of Venice. *Science of the Total Environment* 332 89-100.
- Penefsky H.S., 1985. Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 1589-1593.
- Pernet F., Tremblay R., Gionet C., Landry T. 2006. Lipid remodelling in wild and selective bred hard clams at low temperatures in relation to genetic and physiological parameters. *The journal of Experimental Biology* 209 4663-4675.
- Petrosyan V.S., Gracheva Yu.A., Tyurin V.Yu., Grigor'ev E.V., Milaeva E.R., Pellerito L. 2003. Effect of organotin compounds and their complexes with phosphatidilcholine on peroxide

- oxidation of lipid structural fragments. Russian Journal of Organic Chemistry 39 (3) 353-356.
- Pfeiler E. e Kirschner L.B., 1972. Studies on gill ATPase of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Comp. Physiol. 124 97-104.
- Pinkney A.E., Wright D.A., Jepson M.A., Towle D.W. 1989 Effects of tributyltin compounds on ionic regulation and gill ATPase activity in estuarine fish. Comparative Biochemistry and Physiology 92C, 125-129.
- Pivovarova N.B., Lagerspetz K.Y.H., Skulskii I.A. 1992. Effect of cadmium on ciliary and ATPase activity in the gills of freshwater mussel *Anodonta cygnea*. Comp. Biochem. Physiol 103C (1) 27-30.
- Powers M.F. e Beavis A.D. 1991 Triorganotins inhibit the mitochondrial inner membrane anion channel. The Journal of biological chemistry 266 (26) 17250-17256
- Prosser C.L., 1986. Adaptation biology: molecules to organism. Wiley J. & Sons. New York.
- Proverbio F. e Del Castillo J.R., 1981. Na<sup>+</sup>-stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta 646 99-108.
- Proverbio F., Condresco-Guidi M., Whitembury G., 1975. Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-stimulation of an Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase in kidney tissue. Biochim. Biophys. Acta 394 281-292.
- Proverbio F., Marín R., Proverbio T., 1991. The ouabain-insensitive sodium pump. Comp. Biochem. Physiol. 99 A (3) 279-283.
- Proverbio F., Marín R., Yaris G.I., Proverbio T., 2000. Ouabain-insensitive Na-ATPase: modulation by cell volume and norepinephrine. Atti IV Biophysics Congress of the Southern Cone. 19-22 Campinas, SP, Brazil.
- Proverbio F., Proverbio T., Marín R., 1985. Ion transport and oxygen consumption in young and old rat kidney cortex slices. Gerontology 31 166-173.
- Proverbio T., Marín R., Proverbio F., 1988. Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-stimulated ATPase activity in squid gill microsome. Comp. Biochem. Physiol. 90B (2) 341-345.
- Prusch R.D., 1983. Evolution of invertebrate homeostasis: osmotic and ionic regulation. Comp. Biochem. Physiol. 76A 753-761.
- Puccia E., Messina C.M., Cangialosi M.V., D'Agati P., Mansueto C., Pellerito C., Nagy L., Mansueto V., Scopelliti M., Fiore T., Pellerito L. 2005. Lipid and fatty acid variations in *Ciona intestinalis* ovary after tri-n-butyltin(IV)chloride exposure. Appl. Organometal. Chem. 19 23-29.
- Randall D.J. e Tsui T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. Marine Pollution Bulletin 45 17-23.
- Randall L. e Weber J.H. 1986 Adsorptive behaviour of butyltin compounds under simulated estuarine condition. Sci. Total. Environ. 57 191-203.
- Rangel L.B.A., Caruso-Neves C., Lopes A.G. 2000. Evidences of a new G protein involved on the modulation of Na-ATPase of proximal tubules by angiotnsin II. Atti IV Biophysics Congress of the Southern Cone. August 19-22 Campinaz Brasil S4-13

- Regoli L., Chan H.M., de Lafontaine Y., Mikaelian I. 2001. Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and sediments of the Quebec City Harbour area of the St. Lawrence River. *Aquatic Toxicology* 53 115-126.
- Robinson J.D. e Flashner M.S., 1979. "The (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) activated ATPase dependence and transport properties. *Biochim. Biophys. Acta* 549 145-176.
- Rüdel H. 2003. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56 180-189.
- Russo R.C. 1985 Ammonia, nitrite and nitrate. In Rand G.M., Petrocelli S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washinton: H.P.C. Mc Graw-Hill 455-471.
- Saad-Neheme J., Silva J.L., Meyer-Fernandes J. R. 2001. Osmolytes protect mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase complex against pressure inactivation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1546 164-170.
- Sadiki A-I. and Williams D.T. 1999. A study on organotin levels in canadian drinking water distributed through PVC pipes. *Chemosphere* 38(7) 1541-1548.
- Saintsing D.G. e Towle D.W., 1978. Na-K ATPase in the osmoregulating clam *Rangia cuneata*. *J. Exp. Zool.* 206 435-441.
- Samuel P.M., Roy S., Jaiswai K.A., Rao J.V. 1998. Differential effects of organometallic tin compounds on Na,K-ATPase activity. *Journal of Applied Toxicology* 18, 383-386.
- Santer R. e Phillips K., 2002. Waste disposal, crab style. *J. Experim. Biol.* 205 802.
- Saxena A.K. 1987 Organotin compounds: toxicology and biomedical applications *Applied Organometallic Chemistry* 1 39-56.
- Scheeberg A. e Apell H.J. 2001. Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: II. competition of various cations. *Membrane Biol.* 179 263-273.
- Schuermans Stekhoven T.J.M. e Bonting S.L., 1981. Transport adenosine triphosphates: properties and functions. *Physiol. Rev.* 61 7-76.
- Seed R. e Suchanek T.H., 1992. Population and community ecology of *Mytilus* In "The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture". Gosling E., Elsevier Amsterdam 87-169
- Skou J.C. 1988. *Methods in enzymology a cura di Fleischer S. & Fleischer B. Part P 156* 1-25. Academic Press New York.
- Skou J.C. e Esmann M., 1992. The Na/K ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24 (3) 249-261.
- Smith P.J., Crowe A.J., Das V.K., Duncan J. 1979. Structure-activity relationship for some organotin molluscicides. *Pestic. Sci.* 10 419-422.
- Solaini G., Baracca A., Gabellieri E., Lenaz G. 1997. Modification of mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase ε subunit, enhancement of the ATPase activity of the IF<sub>1</sub>-F<sub>1</sub> complex and IF<sub>1</sub>-binding dependence of the conformation of the ε subunit. *Biochem. J.* 327 443-448. *Applied Organometallic Chemistry* 3 (6) 545-551.
- Sook-Bae K. e Berdanier C.D. 1999. Oligomycin sensitivity of mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase in diabetes-prone BHE/Cdb rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 277 E702-E707.

- Sørensen P.G. 1986. The effect of changes of the content of membrane cholesterol and effect of benzyl alcohol on the activity of the intrinsic  $Mg^{2+}$ -ATPase from the erythrocyte plasma membrane of the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 83 B 2 467-473.
- Srivastava S.C. 1990 In vivo effects of di-n-butyltin dichloride on some enzymes and lipids of rat liver plasma membrane. *Toxicology Letters* 52, 287-291.
- Strand J. e Jacobsen J.A. 2005 Accumulation and trophic transfer of organotins in a marine food web from the Danish coastal waters. *Science of the Total Environment* 350 72-85.
- Stridh** H., Kimland M., Jones D.P., Orrenius S., Hampton M.B. 1998. Cytochrome *c* release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis *FEBS Letters* 429 (3) 351-355
- Stryer L. 1996 *Biochimica*. Quarta edizione Ed. Zanichelli
- Stucchi Zucchi A. e Salamao L.C., 1998. The ionic basis of membrane potentials and adaptation to hyposmotic stress in *Perna perna*, an osmoconforming mollusc. *Comp. Biochem. Physiol.* 121 A (2) 143-148.
- Sweadner K.J., 1989. Isozymes of the  $Na^+/K^+$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 988 185-220.
- Takahashi S., Mukai H., Tanabe S., Sakayama K., Miyazaki T, Masuno H. 1999. Butyltin residues in liver of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. *Environmental Pollution* 106 213-218.
- Thain J.E. e Waldock M.J. 1986. The impact of tributyltin (TBT) antifouling paints on molluscan fisheries. *Water Sci. Technol.* 18 193-202.
- Therien A.G. e Blostein R., 2000. Mechanism of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.* 279 (3) C541-C566.
- Thomas L.E. e Del Castillo J.R., 2000. The second sodium pump. Identification of a furosemide-induced phosphoprotein in basolateral plasma membranes of small intestinal □ependence cells. *Atti IV Biophysics congress of the southern cone*. Campinas, SP, Brazil.
- Thurston R.V., Phillips G.R., Russo R.C., Hinkins S.M., 1981. Increased toxicity of ammonia to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) resulting from reduced concentrations of dissolved oxygen. *Can. J. Fisher. Aquatic Sci.* 39 983-988.
- Tiano L., Fedeli D., Santoni G., Davies I., Falcioni G. 2003. Effect of tributyltin on trout blood cells: changes in mitochondrial morphology and functionality. *Biochimica et Biophysica Acta* 1640 105-112.
- Tolosa I., Readman J.W., Blaevoet A., Ghilini S., Bartocci J., Horvat M. 1996. Contamination of Mediterranean (Côte d'Azur) coastal waters by organotins and irgarol 1051 used in antifouling paints. *Marine Pollution Bulletin* 32 (4) 335-341.
- Tomasso J.R., Goudie C.A., Simco B.A., David K.B., 1980. Effects of environmental pH and calcium on ammonia toxicity in channel catfish. *Transaction of the American Fisheries Society* 109 229-234.

- Trigari G., Borgatti A.R., Pagliarani A., Ventrella V. 1985b. Characterization of gill (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 80 B (1) 23-33
- Trigari G., Solaini G., Borgatti A.R., 1985a. Parziale purificazione e prime osservazioni sulle caratteristiche della (Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>)- e Na<sup>+</sup>-ATPasi da branchie di spigola (*Dicentrarchus labrax* L.). *Proc. 1st Symposium of Marine Biochemistry* a cura Viviani R. Cesenatico, Italy, 125-128.
- Trigari G., Solaini G., Borgatti A.R., 1986. Ricerche sulla separazione di due attività ATPasiche Mg<sup>2+</sup>-dipendenti, attivate da Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e da solo Na<sup>+</sup> in branchie di spigola."Abstract 32<sup>nd</sup> Natn. Conf. It. Soc. Biochem. Messina Giardini Naxsos, Italy, 130.
- Trombetti F., Pagliarani A., Ventrella V., Manuzzi M.P., Pirini M., Trigari G., Borgatti A.R. 2000. Na<sup>+</sup>-dependent ATPase activities in *Mytilus galloprovincialis* and *Scapharca inaequivalvis*. *Italian Journal of Biochemistry* 49(3-4), 97-98.
- Trombetti F., Ventrella V., Pagliarani A., Trigari G., Borgatti A.R., 1990. Mg<sup>2+</sup>-dependent (Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>)-ATPase in the kidneys of the gilthead (*Sparus auratus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 97B (2) 343-354.
- Trombetti F., Ventrella V., Pagliarani A., Trigari G., Borgatti A.R., 1992. Attività ATPasiche stimulate da cationi monovalenti in microsomi di mantello di *Mytilus galloprovincialis* (L.). *Atti 23° Congresso S.I.B.I.M.*, Ravenna.
- Ueno H., Suzuki T., Kinoshita K., Yoshida M. 2005 ATP-driven stepwise rotation of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (5) 1333-1338
- Valbonesi P., Caselli F., Capuzzo A., Fabbri E. 2004. Modulation of adenylyl cyclase activity in the gills of *Tapes philippinarum*. *Journal of Experimental Zoology* 301A 952-960.
- Ventrella V., Pagliarani A., Pirini M., Trigari G., Trombetti F., Borgatti A.R. 1992a. Occurrence of Mg<sup>2+</sup>-dependent monovalent cation-sensitive ATPase activities in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Italian Journal of Biochemistry* 41, 268A-269A.
- Ventrella V., Pagliarani A., Pirini M., Trigari G., Trombetti F., Borgatti A.R., 1993. Lipid composition and microsomal ATPase activities in gills and kidneys of warm- and cold-acclimated sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Physiol. and Biochem.* 12 (4) 293-304.
- Ventrella V., Pagliarani A., Trigari G., Trombetti F., Borgatti A.R., 1987. Na<sup>+</sup>-like factor effect of monovalent cations in the stimulation of sea bass gill Mg<sup>2+</sup>-dependent Na<sup>+</sup>-stimulated ATPase. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B (2) 691-695.
- Ventrella V., Proverbio B., Marín R., Proverbio T., Pagliarani A., Trombetti F., Trigari G., Borgatti A.R., 1997. Phosphorylated intermediate associated with the ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase of plasma membranes from rainbow trout gills. *IBST vol 9. 42° Congresso Nazionale SIB*, Ancona.
- Ventrella V., Trombetti F., Pagliarani A., Trigari G., Pirini M., Borgatti A.R., 1990 Gill (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)- and Na<sup>+</sup>-stimulated Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase activities in the gilthead bream (*Sparus auratus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 95B (1) : 95-105.

- Ventrella V., Trombetti F., Pagliarani A., Trigari G., Pirini M., Borgatti A.R., 1992b Salinity dependence of the ouabain-insensitive  $Mg^{2+}$ -dependent  $Na^+$ -ATPase in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) adapted to fresh and brackish water. *Comp. Biochem. Physiol.* 101B 1-7.
- von Ballmoos C. Brunner J., Dimroth P. 2004 The ion channel of F-ATP syntase is the target of toxic organotin compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (31) 11239-11244.
- Wall S.M., Davis B.S., Hassell K.A., Mehta P., Park S.J., 1999. In rat t-IMCD,  $NH_4^+$  uptake by  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase is critical to net acid secretion during chronic hypokalemia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 277 F866-F874.
- Wallace K.B. e Starkov A.A. 2000. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40 353-388.
- Wang X., 1989. Tollerance of the blood Cockle (*Anadara ganosa*) and Philippine clam (*Ruditapes philippinarum* Adam & Reeve) to ammonia in sediments. *Mar. Sci./Haiyang Kexue* (6) 51-54.
- Watson T.A: e Beamish F.W.H. 1981. The effects of zinc on branchial adenosine triphosphatase enzymes in vitro from rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Phisiol.* 68 C 167-173.
- Weihrauch D., Morris S., Towle D.W. , 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *The Journal of Experimental Biology*, 207, 4491-4504.
- Weihrauch D., Ziegler A., Siebers D., Towle D.W. 2002. Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: participation of  $Na^+/K^+$ -ATPase, V-type  $H^+$ -ATPase and functional microtubules. *J. Experim. Biol.* 205 2765-2775.
- Weirich C.R., Tomasso J.R., Smith T.I.J., 1993. Toxicity of ammonia and nitrite to sunshine bass in selected environments. *Journal of Aquatic Animal Health* 5 64-72.
- Whittembury G. e Proverbio F., 1970. Two models of Na extrusion in cells from guinea-pig kidney cortex slices. *Pflügers Arch.* 316 1-25.
- Widdow S. and Donkin 1992. "Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture.* Gosling, Elsevier Amsterdam 383-398.
- Willmer P., Stone G., Jonston I. 2003. *Fisilogia ambientale degli animali.* Ed. Zanichelli
- Wood C.M., 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion" in " *The physiology of fishes.* Evans D.M. CRC Press, Boca Raton, FL. 379-425.
- Wright S.H., 1985. *Transport processes iono- and osmoregulation.* Gilles & Baillen. Springer Verlag Berlin Heidelberg New Yor Tokio.
- Yang R., Zhou Q., Liu J., Jiang G. 2006. Butyltins compounds in molluscs from Chinese Bohai coastal waters. *Food Chemistry* 97 637-643.
- Zheng J. e Ramirez V.D. 1999. Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton F0F1-ATPase activity by estrogens: comparison with  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase of porcine cortex. *European Journal of Pharmacology* 368 95-102.