

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

XXIII CICLO
DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE E FARMACEUTICHE

STUDIO DELLA TOSSICITÀ DA PALITOSSINA E COMPOSTI ANALOGHI MEDIANTE MODELLI *IN VITRO E IN VIVO*

Settore scientifico-disciplinare: BIO/15

DOTTORANDO

MARCO
DE BORTOLI

RESPONSABILE DOTTORATO DI RICERCA (Direttore Scuola)
PROF. *ENZO ALESSIO*

FIRMA: _____

RELATORE
PROF. *AURELIA TUBARO*
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

FIRMA: _____

SUPERVISORE
PROF. *AURELIA TUBARO*
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

FIRMA: _____

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

Dottorando:

MARCO DE BORTOLI

Titolo della tesi:

**STUDIO DELLA TOSSICITÀ DA PALITOSSINA
E COMPOSTI ANALOGHI MEDIANTE MODELLI
*IN VITRO E IN VIVO***

RIASSUNTO

La Palitossina (PLTX), una delle biotossine marine più tossiche finora note, è saltata agli onori della cronaca in seguito al suo frequente rilevamento in campioni di una microalga tropicale, *Ostreopsis ovata*, ormai diffusa anche in Mar Mediterraneo, dove sono stati segnalati più volte problemi respiratori in concomitanza alla sua presenza. La tossina è stata rilevata anche in molluschi ed altri prodotti ittici, che possono fungere da vettori per l'ultimo anello della catena alimentare, l'uomo. Poiché in paesi tropicali sono stati segnalati casi di intossicazione gravi, anche letali, in seguito all'ingestione di pesci e crostacei contaminati con PLTXs, si rende necessario monitorare la presenza di questi composti nei prodotti ittici e/o nelle microalghe produttrici, anche in assenza di una legislazione in merito.

All'inizio di questo lavoro erano disponibili solo pochi dati relativi alla tossicità acuta di questo composto, spesso purificato con protocolli non perfezionati. Poiché anche i dati clinici disponibili

non permettevano un'esatta definizione dell'Acute Reference Dose (ARfD), necessaria per determinare i livelli massimi di tossina ammissibili nei prodotti ittici, si è deciso inizialmente di studiare la tossicità acuta della PLTX (e di un analogo 42-OH-PLTX) dopo somministrazione orale nel topo. I sintomi e le analisi cliniche condotte sui topi hanno indicato un coinvolgimento del sistema neuromuscolare. Questo studio, insieme ad altri pubblicati nel frattempo, hanno permesso agli esperti dell'EFSA di definire la concentrazione di 30 µg di tossina per Kg di polpa di molluschi quale livello al di sopra del quale si possano manifestare effetti tossici nell'uomo.

Si è proceduto poi alla messa a punto di due saggi per la determinazione di questi composti: un saggio strutturale di tipo ELISA ed uno funzionale, il saggio emolitico.

Il saggio ELISA (sandwich indiretto) è stato messo a punto utilizzando l'anticorpo monoclonale 73D3, e un anticorpo policlonale di coniglio prodotto presso l'Università di Trieste. Il saggio rileva la PLTX in un range di concentrazioni che vanno da 1,25 a 40 ng/ml ed è in grado di quantificare con la stessa sensibilità anche la 42-OH-PLTX, isolata e caratterizzata dal punto di vista chimico durante questo periodo di dottorato dal gruppo del prof. E. Fattorusso (Università di Napoli Federico II), in un campione di palitossina gentilmente fornitoci dal dr. M. Poli (Maryland, USA). Il saggio ELISA è in grado di rilevare anche l'Ostreocina-d, un altro analogo della PLTX, ma a concentrazioni maggiori rispetto a quelle della PLTX (≥ 40 ng/ml). Il mancato rilevamento di acido okadaico, acido domoico, brevetossina-3, saxitossina e yessotossina (tossine che possono essere presenti insieme alla PLTX nei prodotti ittici contaminati) indica la specificità del saggio.

Siamo poi passati alla messa a punto del saggio emolitico, ampiamente usato in letteratura per il rilevamento di PLTX e di composti palitossino-simili. Questo saggio sfrutta la capacità della tossina di indurre emolisi tardiva probabilmente tramite l'alterazione della Na^+/K^+ -ATPasi (NAKA). In letteratura, però, non è disponibile un protocollo standardizzato e la variabilità dei risultati riportati è notevole. Si è pertanto proceduto a realizzare il saggio emolitico, esplorando le variabili che ne influenzano la performance, ottenendo una $\text{EC}_{50} = 13,2$ pM per la PLTX. Gli anticorpi monoclonale

e policlonale anti-PLTX hanno inibito con equa potenza l'emolisi indotta da PLTX e possono quindi essere usati per verificare la specificità dell'emolisi in campioni incogniti.

Dopo aver verificato che anche la 42-OH-PLTX condividesse lo stesso recettore della PLTX mediante un saggio di binding indiretto alla NAKA (EC_{50} di 28.2 nM e 29.4 nM rispettivamente per 42-OH-PLTX e PLTX), è stato eseguito il saggio emolitico anche sulla 42-OH-PLTX, ottenendo dei risultati analoghi ($EC_{50} = 7.6$ pM) a quelli della PLTX.

Nell'ottica di un utilizzo di questo saggio in situazioni di monitoraggio si è valutata la possibilità di ridurre i suoi tempi di esecuzione e in tal senso, cambiando la concentrazione salina della soluzione tampone al 62 % di quella normale, si è riusciti a ridurre il tempo di incubazione di 4 volte (1 h anziché 4 h). La curva concentrazione-risposta ottenuta dopo incubazione di 1 h con la PLTX in tampone al 62 % è risultata perfettamente sovrapponibile a quella ottenuta dopo 4 h di incubazione della tossina in tampone 100%. Al contrario, nessuna delle concentrazioni di PLTX testate ha dato emolisi dopo incubazione di 1 h della tossina in tampone 100%. Questo aspetto è particolarmente interessante perché permetterebbe di distinguere l'emolisi dovuta a palitossina da una emolisi aspecifica, semplicemente conducendo il saggio in 1 ora in parallelo nei due tamponi 62 % e 100 %, evitando l'uso di anticorpi anti-PLTX. In particolare, nel caso di un campione ignoto che dia emolisi in PBS al 62 % e non in PBS al 100 %, il risultato fornirebbe un primo indizio della presenza di palitossina, da confermare con metodi di riferimento (LC-MS). Se invece l'emolisi avviene ad entrambe le concentrazioni di PBS, dopo incubazione per 1 ora, essa potrebbe dipendere da un'azione aspecifica non imputabile alla sola palitossina.

La presenza di una proliferazione massiccia (6.700.000 di cellule/litro) di *Ostreopsis* cf. *ovata* nel Golfo di Trieste, ci ha permesso di utilizzare gli anticorpi monoclonale e policlonale per la localizzazione immunocitochimica delle tossine nelle singole cellule di microalghe. Per la prima volta è stata così visualizzata la presenza delle palitossine in cellule di *Ostreopsis* cf. *ovata*, che risultano distribuite in tutto il citoplasma. La positività per le tossine è stata verificata in tutte le cellule di *Ostreopsis* analizzate, mentre nessuna cellule di *Coolia monotis* osservate è risultata

positiva, a conferma della specificità verso la PLTX del segnale degli anticorpi. L'analisi HR LC-MS ha evidenziato la presenza di ovatossine-a, -b, -c, -d/-e, con una forte prevalenza di ovatossina-a (circa 80%, 45-64 pg/cellula), mentre per la prima volta in un campione naturale non è stata rilevata la presenza di PLTX. Questi risultati ci hanno permesso di concludere che entrambi gli anticorpi utilizzati sono in grado di riconoscere anche le ovatossine, analoghi della palitossina preponderanti nel Mar Mediterraneo. Inoltre, la tecnica immunocitochimica eseguita direttamente sulle microalghe potrebbe permettere un'allerta precoce della presenza di palitossine, ad esempio prima del loro ingresso/accumulo nella catena alimentare, evitando eventuali problemi per la salute pubblica.

Un altro approccio per il rilevamento della tossina è stato fatto utilizzando la spettroscopia Raman. La palitossina (il cui spettro Raman è stato qui registrato per la prima volta) è stata ricercata in singole cellule di *Ostreopsis*, depigmentate con acetone-esano 1:1. Non sono stati riscontrati segnali univocamente attribuibili alle palitossine negli spettri Raman di *Ostreopsis*, probabilmente a causa della loro uniforme diffusione citoplasmatica, come visualizzato in immunocitochimica. Nelle cellule non depigmentate con acetone:esano 1:1 è stata confermata la presenza del carotenoide peridinina. L'analisi Raman di cellule in coltura di *Ostreopsis cf. ovata* nelle diverse fasi di crescita ha evidenziato forti segnali associabili ad acidi grassi polinsaturi, già riscontrati in *Ostreopsis cf. ovata* con altre tecniche.

L'analisi HR LC-MS delle cellule in coltura nelle varie fasi di crescita ha mostrato, analogamente alle relative popolazioni naturali, un elevato contenuto di ovatossina-a (circa 55%, 7.5–19.7 pg/cellula) e minori quantità di altre ovatossine, con la palitossina presente in tracce (< 0,1 pg/cellula). Si è osservato che il contenuto di tossine aumenta con l'età della coltura, con le cellule in fase senescente (giorno 25 dall'avvio della coltura) contenenti circa il doppio di tossina delle cellule in fase stazionaria (giorno 18). Quindi, analogamente a quanto si verifica per altri metaboliti secondari negli organismi vegetali, l'accumulo di queste tossine raggiunge il massimo generalmente verso la fine del ciclo vitale.

	Pag.	
1	INTRODUZIONE	1
1.1	Scoperta e diffusione delle palitossine	1
1.2	Struttura e proprietà chimiche	2
1.3	Meccanismo d'azione molecolare ed effetti cellulari	5
1.4	Tossicità della palitossina in modelli animali e tessuti isolati	10
1.5	Casi di tossicità umana attribuita alle palitossine	13
1.6	Metodi di rilevazione delle palitossine	17
2	SCOPO DELLA TESI	23
3	MATERIALI E METODI	26
3.1	Studio della tossicità acuta per via orale della palitossina e della 42-idrossi-palitossina	26
3.2	Misurazione del "binding" di palitossina e 42-idrossi-palitossina alla Na ⁺ /K ⁺ -ATPasi	28
3.3	Messa a punto di un saggio immunoenzimatico (ELISA) per il dosaggio delle palitossine	29
3.4	Messa a punto di un metodo funzionale per il rilevamento delle palitossine: saggio emolitico	35
3.5	Studio eco-tossicologico sulle microalghe produttrici di palitossine nel Golfo di Trieste	38
4	RISULTATI	43
4.1	Tossicità acuta dopo somministrazione orale della PLTX	43
4.1.1	Mortalità osservata e sintomi registrati	43
4.1.2	Alterazioni ematocliniche	44

4.1.3	Alterazioni all'analisi necroscopica, istologica ed ultrastrutturale	44
4.1.4	Implicazioni di sicurezza alimentare	47
4.2	Caratterizzazione della 42-idrossi-palitossina	48
4.2.1	Scoperta e caratterizzazione strutturale del nuovo analogo della palitossina	48
4.2.2	Tossicità acuta per via della 42-idrossi-palitossina nel topo	49
4.2.3	“Binding” della 42-OH-PLTX e della PLTX alla Na ⁺ /K ⁺ -ATPasi	50
4.2.4	Attività emolitica della 42-OH-PLTX e della PLTX	51
4.3	Test ELISA	52
4.3.1	Curva concentrazione-risposta iniziali	52
4.3.2	Reattività nei confronti degli analoghi della palitossina	53
4.3.3	Reattività nei confronti di altre tossine algali	54
4.3.4	Reattività nei confronti della palitossina biotinilata ed effetto del tampone	55
4.3.5	Miglioramenti metodologici del saggio immunoenzimatico	58
4.4	Saggio emolitico	60
4.4.1	Curva concentrazione-risposta ottenuta in saggio emolitico	60
4.4.2	Inibizione dell'emolisi da anticorpi anti-palitossina	60
4.4.3	Emolisi da parte degli analoghi della palitossina	61
4.4.4	Effetto della origine degli eritrociti	62
4.4.5	Effetto di cofattori	63
4.4.6	Miglioramento metodologico: effetto dell'osmolarità del tampone	65
4.5	Indagine eco-tossicologica	68
4.5.1	Proliferazione di <i>Ostreopsis</i> nel golfo di Trieste (settembre 2009)	68

4.5.2	Analisi immunocitochimica	69
4.5.3	Spettroscopia Raman	70
4.5.4	Dati di HR LC-MS sul contenuto di tossine	72
5	DISCUSSIONE	73
5.1	Tossicità da palitossine e implicazioni di salute pubblica	73
5.2	Metodi per la rilevazione e lo studio delle palitossine e degli organismi produttori	78
6	BIBLIOGRAFIA	88

1 INTRODUZIONE

1.1 Scoperta e diffusione delle palitossine

La palitossina (PLTX) è una tra le più potenti tossine marine non proteiche conosciute, essendo seconda per tossicità intraperitoneale *in vivo* solo alla maitotossina (Yasumoto, 2001). La PLTX è stata isolata per la prima volta da Moore e Scheuer nei primi anni '70 (Moore e Scheuer, 1971). L'attività dei due ricercatori era guidata dalla leggenda Hawaiana dell'alga tossica di *Hana* (dall'originale "*limu make o Hana*"), un tempo utilizzata dagli indigeni per avvelenare le loro lance. Nel corso delle analisi condotte nel 1971 fu isolato un prodotto tossico associato non alle macroalghe presenti nel sito, ma a celenterati del genere *Palythoa*, da cui il nome della tossina (Figura 1A). La prima specie di *Palythoa* in cui è stata identificata la palitossina è stata *P. toxica*, ma in seguito la tossina è stata trovata anche nella specie giapponese *P. tuberculosa* (Kimura et al., 1972) ed in altri coralli del genere *Palythoa*, sia del Pacifico che dei Caraibi (Kaul et al., 1974; Quinn et al., 1974).

Nei primi anni novanta è stata identificata una correlazione strutturale tra le tossine prodotte dalle microalghe bentoniche del genere *Ostreopsis* (Figura 1B) e quelle tipicamente prodotte dai coralli del genere *Palythoa*: il primo analogo della palitossina individuato in questi dinoflagellati è stato l'ostreocina-D (Ost-D) tossina prodotta dalla microalga *O. siamensis* (Usami et al., 1995). Delle tossine prodotte da microalghe del genere *Ostreopsis*, Ost-D è l'unica la cui struttura sia stata completamente delucidata (Ukena et al., 2001) e che sia stata isolata in quantità tali da permetterne una caratterizzazione chimico-biologica. Alla famiglia degli analoghi della PLTX si sono aggiunte negli anni le mascarenotossine-a e -b prodotte da *O. mascarenensis* (Lenoire et al., 2004) e le ovatossine-a, -b, -c, -d, -e prodotte da *O. ovata* (Ciminiello et al., 2010a; Rossi et al., 2010).

L'elenco degli analoghi della palitossina presenti in *Ostreopsis* ha continuato ad allungarsi proporzionalmente all'uso di tecniche analitiche sempre più approfondite (Ciminiello et al., 2010a; Rossi et al., 2010), ed è probabile attendersi ancora nuove scoperte, data la complessità della molecola e l'assenza di dati su intermedi di biosintesi.

La presenza di composti palitossino-simili in specie filogeneticamente così distanti come coralli del genere *Palythoa* e microalghe del genere *Ostreopsis*, i numerosi analoghi identificati e le differenze nelle concentrazioni di tossine riscontrate nei vari organismi, portano ad ipotizzare che il reale organismo produttore della palitossina possa essere una specie batterica simbiote che viva a stretto contatto con questi organismi superiori, i quali si limiterebbero ad accumulare la tossina batterica o eventualmente a metabolizzarla. La letteratura offre in tal senso pochi ma interessanti riferimenti di una possibile origine batterica della palitossina (Frolova et al., 2000; Seemann et al., 2009) e l'argomento, unitamente alla via biosintetica della palitossina, rimane un campo attivo di esplorazione.

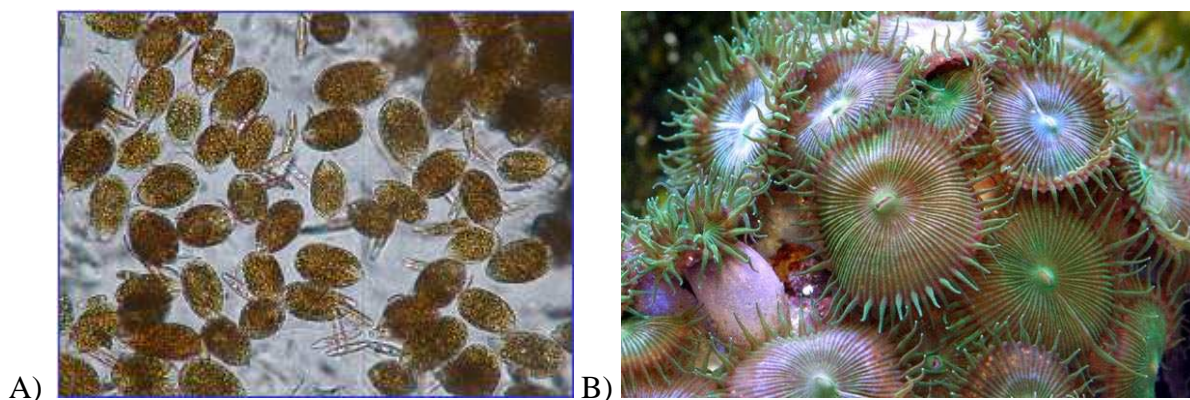


Figura 1. Organismi fonti di palitossine. A) *Ostreopsis ovata*, ingrandimento 250×; B) *Palythoa toxica*.

1.2 Struttura e proprietà chimiche

Sin dalle prime procedure di isolamento del 1971 è emerso che la palitossina non possedeva subunità ripetute, né parti aminoacidiche o glucidiche e che la sua struttura, con un peso molecolare di quasi 3000 Dalton, era particolarmente complessa. La struttura della PLTX (Figura 2; formula

minima $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$; peso molecolare 2680,14 Dalton) è convenzionalmente suddivisa in una catena alifatica poli-idrossilata di 115 atomi di carbonio (la più lunga tra i composti naturali, detta palitossina acido carbossilico) e una coda di 3-amido-N-(3-idrossipropil)-acrilamide, unita al C1 della catena alifatica da un legame ammidico (Figura 2).

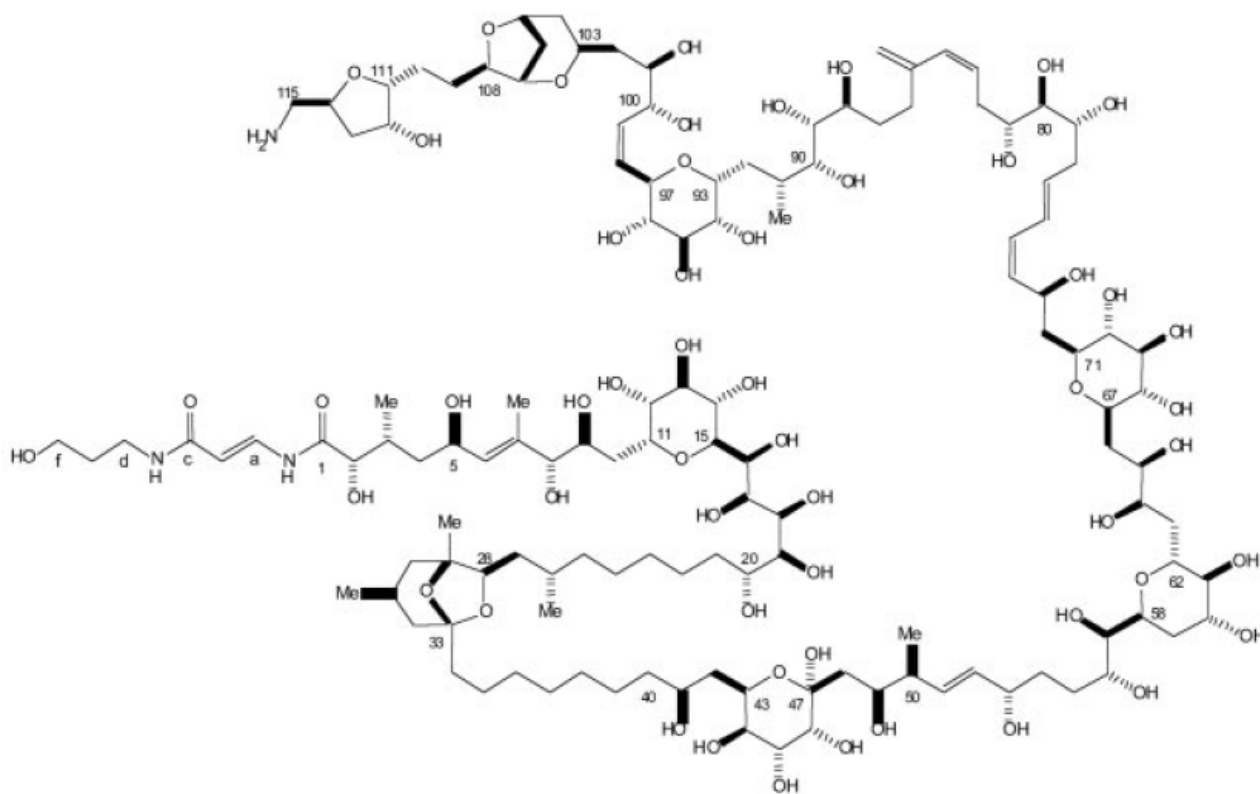


Figura 2. Struttura chimica della palitossina isolata da *P. tuberculosa*, riportata da Cha et al. (1982), modificata da Hilgemann (1993).

La caratterizzazione della sua complessa struttura è stata una sfida scientifica per anni e si è ottenuta nel 1981 da parte di due gruppi indipendenti, analizzando estratti di *Palythoa* hawaiani, tahitiani e giapponesi (Moore e Bartolini, 1981; Uemura et al., 1981). In una serie di studi successivi è stata definita la stereochimica dei suoi 64 centri chirali (Cha et al., 1982; Moore et al., 1982; Uemura et al., 1985).

Il componente quantitativamente maggiore estratto da *Palythoa tuberculosa* possiede 42 gruppi ossidrilici responsabili della sua idrosolubilità (Figura 2). I pochi anelli eterici lungo la struttura e l'ibridazione sp^3 di quasi tutti gli atomi di carbonio della molecola conferiscono alla PLTX una

notevole libertà conformazionale (Yasumoto, comunicazione personale). I gruppi più reattivi della molecola sono i 2 dieni coniugati (C83, C74), i 2 gruppi chetali (C33 chetale e C47 emichetale) ed il gruppo amminico terminale (C115) che conferisce proprietà basiche alla tossina.

Negli ultimi decenni sono stati individuati numerosi analoghi della palitossina. In *P. tuberculosa*, oltre alla palitossina, sono state identificate la omopalitossina, la bisomopalitossina, la neopalitossina e la deossipalitossina, che differiscono a livello dell'estremità idrossiterminale o del diene coniugato al C74 (Uemura et al., 1985). La recente identificazione di un nuovo analogo, la 42-idrossi-palitossina (42-OH-PLTX), in estratti di *P. toxica* e *P. tuberculosa* (Ciminiello et al., 2009) è discussa tra i risultati di questa tesi. Come accennato in precedenza, gli analoghi della palitossina comprendono anche tossine individuate in microalghe del genere *Ostreopsis*: l'ostreocina-D, unica tra queste la cui struttura sia stata determinata, è risultata essere una 42-idrossi-3,26-didemetil-19,44-dideossi-palitossina (Ukena et al., 2001).

In letteratura, anche se trattasi di dati ottenuti precedentemente alla determinazione strutturale della palitossina, è riportata la perdita della tossicità *in vivo* del composto, per via intraperitoneale, in ambiente fortemente acido o alcalino (NaOH > 0.1 N; HCl > 0.1 N) o in seguito all'ossidazione indotta da sodio ipoclorito al 5 %, entro 15 minuti (Wiles et al., 1974). La perdita, per idrolisi, del cromoforo a 263 nm all'estremità OH-terminale (Moore et al., 1975), la modificazione del gruppo amminico all'estremità opposta (Hirata et al., 1979; Ohizumi e Shibata, 1980) o l'idrogenazione catalitica a peridropalitossina (Hirata et al., 1979) sembrano ridurre gli effetti biologici della tossina, compresa la tossicità *in vivo*.

La tossina, come prevedibile dalla sua struttura polioidrossilata, è scarsamente solubile in cloroformio, acetone, etere, mentre presenta una buona solubilità in metanolo, etanolo, piridina, dimetilsolfossido (DMSO) e acqua. Per la presenza della porzione idrofobica C21-C40 affiancata dalle zone polioidrossilate, il carattere della palitossina in soluzione acquosa è essenzialmente anfipatico. A causa della sua natura amorfa, non è stato possibile ancora cristallizzare la PLTX per ottenere informazioni sulla sua struttura tridimensionale dalla cristallografia a raggi X. Tuttavia,

utilizzando tecniche di “Small Angle X-ray Scattering” (SAXS) si sono avute informazioni sul comportamento in soluzione acquosa: essa forma un dimero a forma di otto (∞), mentre il blocco del gruppo amminico impedisce la dimerizzazione, con la conseguente presenza della forma monomerica a ferro di cavallo (\subset) (Inuzuka et al., 2007, 2008).

Secondo dati di letteratura sembra che la molecola, similmente ad altre tossine di origine naturale, tenda ad adsorbirsi su superfici plastiche, nello specifico di polietilene (Taylor et al., 1991).

1.3 Meccanismo d'azione molecolare ed effetti cellulari

Il principale recettore molecolare della palitossina è stato identificato nella Na^+/K^+ -ATPasi di membrana (NAKA), un trasportatore attivo espresso in tutte le cellule animali (Chhatwal et al., 1983; Ishida et al., 1983; Bottinger et al., 1986; Scheiner-Bobis et al., 1994; Redondo et al., 1996). Il ruolo fisiologico di questa pompa ionica è quello di mantenere il corretto gradiente ionico tra l'ambiente intra- ed extracellulare trasportando, contro gradiente, tre ioni Na^+ all'esterno e due ioni K^+ all'interno della cellula, utilizzando l'energia data dall'idrolisi dell'ATP. Il mantenimento del corretto gradiente ionico tra l'interno e l'esterno è essenziale per la sopravvivenza della cellula e l'attività della NAKA arriva a coprire dal 30 al 70% (neuroni) della produzione cellulare di ATP. In Figura 3 è riportato il meccanismo con cui la NAKA accoppia il legame degli ioni Na^+ e K^+ con l'idrolisi dell'ATP: l'enzima passa attraverso i due stati conformazionali E1 (a maggiore affinità per il sodio) ed E2 (a maggiore affinità per il potassio) ed è dotato di due “gates”, uno extracellulare e uno intracellulare, la cui apertura è mutuamente esclusiva. Questo meccanismo di azione è detto ciclo di Albers-Post (Post et al., 1972).

La palitossina sembra legarsi alla NAKA dal lato extracellulare impedendo al trasportatore di controllare la chiusura selettiva dei “gates” che, di conseguenza, si vengono a trovare contemporaneamente aperti, favorendo un flusso ionico secondo gradiente (Figura 3, in basso). La NAKA si verrebbe così a convertire in un canale ionico aspecifico, permeabile ai cationi monovalenti come Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ (Habermann, 1989); la permeabilità del canale, indotto da

palitossina, nei confronti di cationi bivalenti o cationi organici di maggiore ingombro sterico sembra invece essere scarsa o nulla (Castle e Strichartz, 1988; Ikeda et al., 1988).

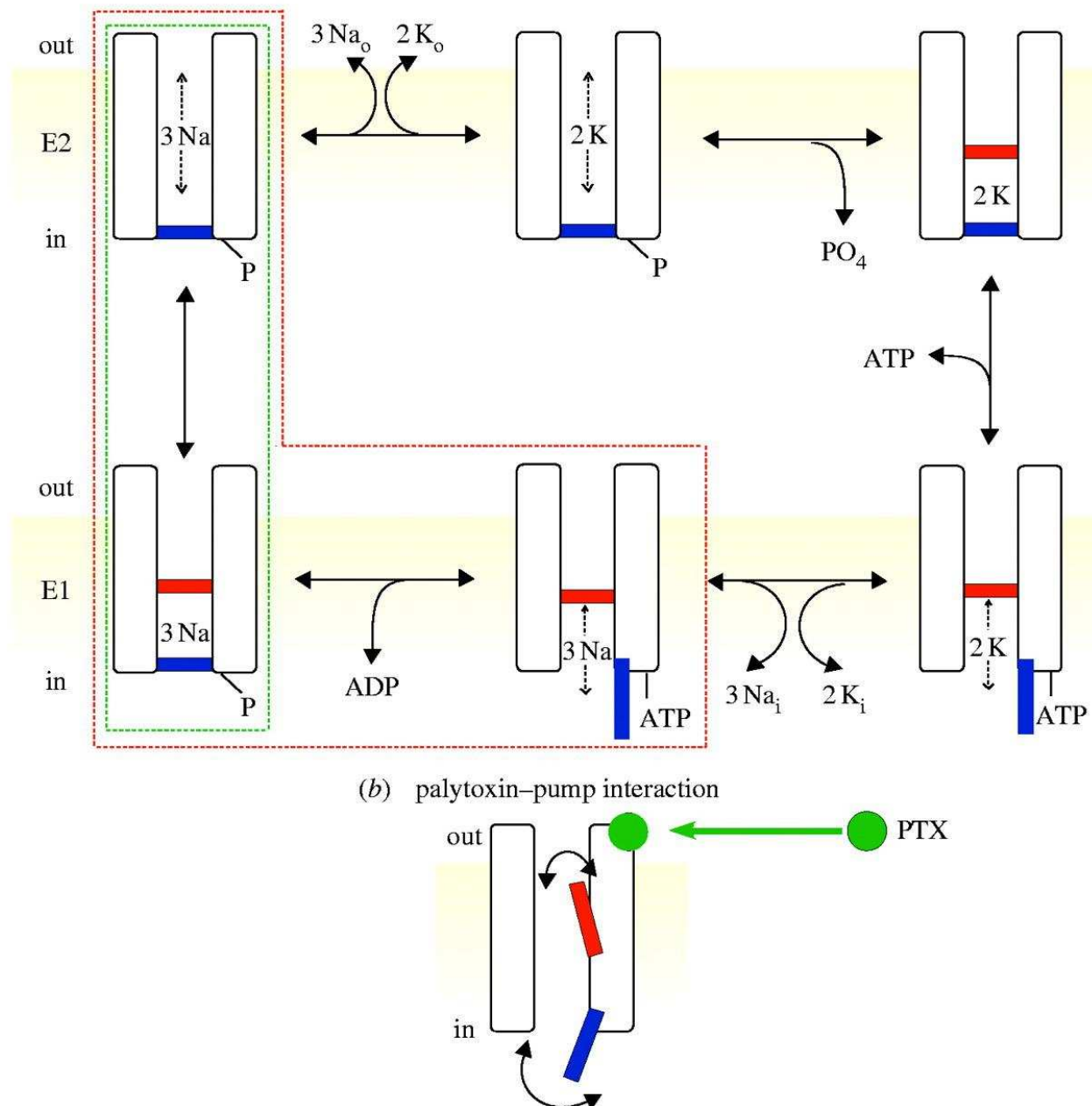


Figura 3. Meccanismo di scambio della NAKA secondo il ciclo di Albers-Post e (in basso) la sua alterazione da parte della PLTX (Gadsby et al., 2009, modificato).

Mentre la formazione del canale cationico a livello della NAKA si manifesta a concentrazioni di PLTX molto basse (~1 pM, a seconda del modello sperimentale), il blocco dell'attività ATPasica

del trasportatore sembra essere un evento marginale, apprezzabile solo a concentrazioni molto più elevate di tossina (> 100 nM) (Habermann, 1989; Harmel e Apell, 2006).

A livello cellulare, la conversione della NAKA in un canale ionico si traduce nell'impossibilità di mantenere i corretti gradienti ionici nella cellula, con un ingresso di sodio e una perdita di potassio dalla cellula che determinano alterazioni dell'omeostasi ionica (Habermann et al., 1989). In letteratura sono numerosi gli studi che analizzano gli effetti della palitossina su cellule eccitabili (Rayner et al., 1975; Dubois e Cohen, 1977; Ito et al., 1977, 1979; Kudo e Shibata, 1980; Ecault e Sauviat, 1991). Tra le più comuni conseguenze dell'alterata omeostasi ionica indotta dalla palitossina vi è la depolarizzazione della membrana plasmatica a cui segue generalmente l'apertura dei canali voltaggio dipendenti e un aumento della concentrazione intracellulare di ioni calcio ($[Ca^{2+}]_i$). L'aumento di $[Ca^{2+}]_i$ può indurre diversi effetti, tra cui la liberazione di neurotrasmettitori da parte delle cellule neuronali o la contrazione delle cellule muscolari (Posangi et al., 1994; Rayner et al., 1975).

Nelle cellule non eccitabili l'effetto preponderante della formazione del canale ionico a livello della NAKA sembra essere un rigonfiamento cellulare mediato dell'ingresso di sodio e acqua, con formazione di vacuoli nel citoplasma, seguiti, a lungo termine, dalla lisi cellulare. Questi effetti sono stati osservati in diversi tipi cellulari, tra cui cellule embrionali di ratto 3Y1 (Oku et al., 2004), cellule muscolari lisce di aorta di ratto A7r5 (Sheridan et al., 2005), cellule epiteliali renali di maiale LLC-PK1 (Mullin et al., 1991), cellule endoteliali di aorta di bovino (Schilling et al., 2006) e linfociti umani (Falciola et al., 1994). Inoltre, l'aumento del $[Ca^{2+}]_i$ sembra giocare un ruolo chiave nella depolimerizzazione del citoscheletro di actina, facilitando il rigonfiamento, il distacco dal substrato e la lisi cellulare (Ares et al., 2005), e nell'attivazione della fosfolipasi A_2 (PLA₂), che presiede alla liberazione di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana. L'acido arachidonico è il precursore di mediatori dell'infiammazione, come le prostaglandine, la cui produzione aumenterebbe in risposta alla palitossina (Ohuchi et al., 1985; Levine et al. 1986). In mastociti di ratto, invece, è stato osservato il rilascio di istamina indotto da concentrazioni di palitossina non

superiori a 0.05 µg/ml, mentre concentrazioni di tossina superiori a 5 µg/ml ne inibiscono il rilascio (Chhatwal et al. 1982).

Un campo attivo di ricerca sugli effetti cellulari della palitossina è quello che analizza le sue proprietà come promotore tumorale (Fujiki et al., 1986). Sembra che il meccanismo alla base della promozione tumorale sia un'alterazione delle vie di trasduzione del segnale intracellulare mediato dalle kinasi attivate da mitogeni (MAPK). In particolare, la palitossina sarebbe in grado di attivare le kinasi ERK1/2, JNK, p38 e ERK5 in seguito all'interazione con la NAKA (Charlson et al., 2009; Wattenberg, 2010), ma, a differenza di altri comuni promotori tumorali come il 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), non indurrebbe l'attivazione della protein-kinasi C (PKC) (Wattenberg, 2007).

Una considerazione particolare meritano gli studi condotti per valutare gli effetti della PLTX sugli eritrociti, sui quali si è concentrato soprattutto il gruppo del Prof. E. Habermann negli anni ottanta (Habermann et al., 1981a, 1981b, 1989; Ahnert-Hilger et al., 1982; Habermann e Chhatwal, 1982). La semplicità di reperimento di queste cellule, rispetto ad altri modelli *in vitro*, ha sicuramente facilitato l'acquisizione di dati sugli effetti cellulari della palitossina e sull'interazione con la NAKA. Inoltre, poiché la lisi di queste cellule indotta da palitossina è facilmente osservabile e misurabile per il rilascio di emoglobina, gli eritrociti si sono rivelati un potenziale strumento, rapido e sensibile, per rilevare la palitossina in campioni naturali (Bignami, 1993).

Come negli altri modelli di cellule non eccitabili, la palitossina induce negli eritrociti una perdita di potassio cellulare entro pochi minuti di incubazione. Una lisi tardiva (che raggiunge il plateau dopo 4 ore di incubazione a 37°C, per gli eritrociti di topo) si manifesta come conseguenza dell'impossibilità per la cellula di mantenere l'equilibrio osmotico (Habermann et al., 1981a). Tale emolisi ha dunque un meccanismo diverso da quella indotta dalle comuni tossine batteriche e dalle saponine che generalmente agiscono formando dei pori direttamente sulla membrana delle cellule o alterando il doppio strato fosfolipidico e danno lisi immediata. L'emolisi dipende, oltre che dalla

concentrazione di palitossina, da variabili termodinamiche (tempo e temperatura di incubazione) e dalla composizione ionica del tampone in cui sono sospese le cellule (concentrazioni di Na^+ e K^+). Eritrociti di diverse specie animali hanno diversa sensibilità all'emolisi da palitossina in funzione dei rapporti tra le concentrazioni intra- ed extracellulari di sodio e potassio. Gli stessi studi hanno anche indicato come la presenza di calcio e di borati nel tampone di incubazione sembri aumentare il potere emolitico della palitossina, probabilmente favorendone il legame alla NAKA (Habermann, 1983).

Anche se non si può escludere la presenza di ulteriori recettori per la tossina (Bottinger e Habermann, 1984; Frelin e Van Renterghem, 1995; Scheiner-Bobis et al., 2002), data l'importanza della NAKA per la sopravvivenza cellulare e la serie di effetti secondari provocati dalla sua conversione in canale, il meccanismo d'azione descritto rende conto della maggior parte degli effetti tossici causati dalla PLTX, sia sulle cellule eccitabili che non eccitabili (Habermann, 1989).

Noti bloccanti dell'azione della palitossina sono i glicosidi cardioattivi, farmaci formati da una parte glicosidica e da una steroidea, in grado di legare la NAKA dal lato extracellulare competendo con la tossina per il legame (Ishida et al., 1985; Habermann e Chhatwal, 1982; Bottinger e Habermann, 1984). Anche se non è completamente definito il sito di legame della palitossina alla NAKA, ad impedire l'interazione tossina-pompa sembra essere la componente glicosidica dei glicosidi cardioattivi, in quanto la sola subunità steroidea non è sufficiente a ridurre gli effetti della tossina (Ozaki et al., 1984). Il glicoside cardioattivo più utilizzato in letteratura come inibitore della PLTX è la ouabaina, la cui struttura è visualizzata in Figura 4A in confronto con quella della palitossina (Figura 4B): è interessante notare la grande differenza strutturale tra questi due composti naturali. A sottolineare il differente meccanismo d'azione di ouabaina e palitossina sulla NAKA si può considerare che la sensibilità di un modello cellulare o di un organismo alla ouabaina non è necessariamente correlata alla sua sensibilità alla palitossina (Anner e Moosmayer, 1994): ad esempio gli eritrociti di topo, specie nota per essere poco sensibile all'azione dei glicosidi

cardioattivi (Ozaki et al., 1984), sono comunque classificati tra quelli più sensibili all'emolisi da palitossina (Habermann et al., 1981a).

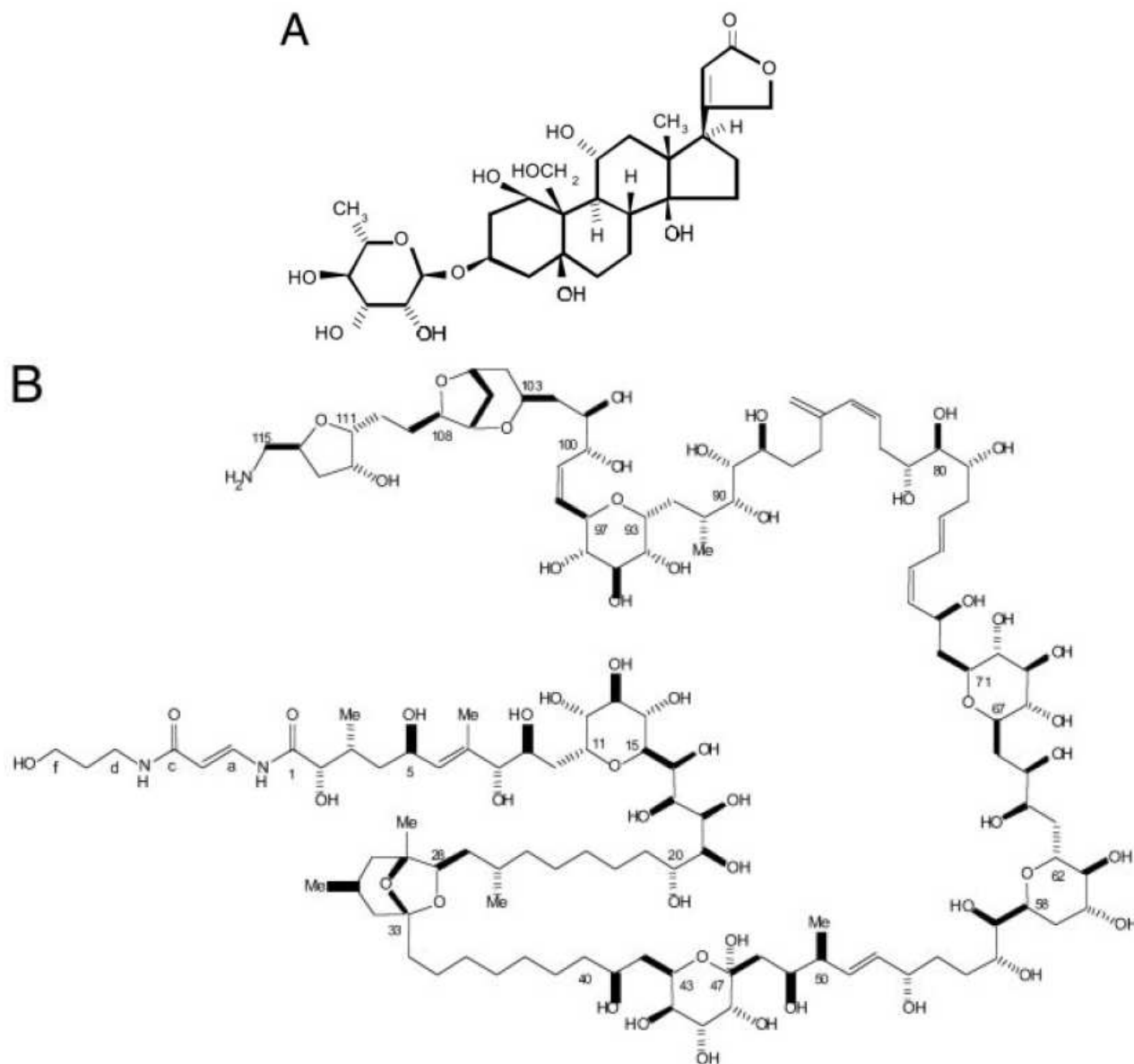


Figura 4. Struttura del glicoside cardioattivo ouabaina (A) e confronto con la struttura della palitossina (B) tratta da Cha et al., 1982 con modifiche (Hilgemann, 1993).

1.4 Tossicità della palitossina in modelli animali e tessuti isolati

I primi studi sulla tossicità da palitossina sono stati effettuati immediatamente dopo la sua scoperta (Moore e Scheuer, 1971), prima della sua completa caratterizzazione strutturale (Cha et al., 1982; Moore et al., 1982; Uemura et al., 1985). Poiché all'epoca le tecniche estrattive per la palitossina

non erano ancora perfezionate e la potenza delle tossine isolate variava molto da estratto ad estratto, il materiale utilizzato andrebbe considerato come una frazione (la formula stimata era $C_{145}H_{264}N_4O_{78}$, rispetto a quella reale della palitossina $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$) ed è possibile si trattasse di una frazione tossica non completamente purificata. Tuttavia, questi studi sono stati citati anche recentemente da molti autori per il confronto di potenza con le diverse vie di somministrazione in diverse specie animali (Tabella 1; Wiles et al., 1974). Questi primi studi hanno fatto emergere l'elevata potenza della palitossina quando somministrata per via parenterale (DL_{50} per via intravenosa nel topo pari a $0.45 \mu\text{g}/\text{kg}$ – la DL_{50} è la dose che risulta letale nel 50 % degli animali trattati), mentre la tossicità dopo somministrazione per via orale è risultata molto minore (DL_{50} per via intragastrica nel ratto $> 40 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Studi successivi impiegando tossine sempre più purificate sono stati effettuati per ampliare la mole di conoscenze sulla tossicità della palitossina in modelli animali (Tabella 1), in particolar modo per via intraperitoneale nel topo, ma un dato conclusivo della tossicità acuta dopo somministrazione orale è a lungo mancato ed è stato uno dei risultati ottenuti nella presente tesi.

In seguito alla somministrazione intraperitoneale della tossina nel topo, si sono manifestate difficoltà nei movimenti, con atassia e paralisi degli arti posteriori, perdita del riflesso di raddrizzamento e difficoltà respiratorie che hanno portato alla cianosi (Rhodes et al., 2002; Riobò et al., 2008a; Munday, 2010).

A livello istologico, la somministrazione intraperitoneale acuta di palitossina ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$) nel topo sembra indurre la formazione di edema e necrosi dei villi intestinali, con emorragie; la formazione di vacuoli è riportata a livello cellulare nell'epitelio intestinale, nel fegato, nei reni e nel pancreas, con tracce di necrosi cellulare a livello cardiaco (Terao et al., 1992; Ito et al., 1996). Più recentemente è stata riportata, dopo somministrazione intratracheale o sublinguale di palitossina nel topo, la formazione di edema polmonare e di emorragie alveolari (Ito e Yasumoto, 2009).

Tabella 1. Tossicità della PLTX attraverso varie vie di somministrazione in diversi modelli animali (adattato da Munday, 2010).

Via di somministrazione	Modello sperimentale	DL ₅₀ (µg/kg) in 24 h	Riferimento
Intravenosa	Topo	0.45	Wiles et al., 1974
Intravenosa	Topo	0.53	Deguchi et al., 1976
Intravenosa	Ratto	0.089	Wiles et al., 1974
Intravenosa	Cavia	0.11	Wiles et al., 1974
Intravenosa	Coniglio	0.025	Wiles et al., 1974
Intravenosa	Cane	0.033	Wiles et al., 1974
Intravenosa	Scimmia	0.078	Wiles et al., 1974
Intravenosa	Cane	0.05-0.06	Ito et al., 1982
Intraperitoneale	Topo	1.0-1.5	Ito et al., 1996
Intraperitoneale	Topo	0.31 (48 h)	Riobò et al., 2008a
Intraperitoneale	Topo	0.72 (48 h)	Rhodes et al., 2002
Intraperitoneale	Ratto	0.63	Wiles et al., 1974
Orale	Topo	510	Munday, 2006
Orale	Ratto	>40 (72 h)	Wiles et al., 1974
Orale (cibo)	Topo	>2500	Munday, 2006
Orale (sublinguale)	Topo	>235	Ito e Yasumoto, 2009
Intramuscolare	Ratto	0.24	Wiles et al., 1974
Intramuscolare	Cane	0.08	Wiles et al., 1974
Sottocutanea	Ratto	0.40	Wiles et al., 1974
Sottocutanea	Topo	1.39	Wiles et al., 1974
Intrarettale	Ratto	>10	Wiles et al., 1974

Da studi *ex vivo* su cani anestetizzati sembra che il decesso degli animali dopo somministrazione parenterale (endovenosa) di palitossina sia ascrivibile ad una intensa e diffusa vasocostrizione, particolarmente a carico delle arterie renali e coronarie, per azione della tossina sulla muscolatura liscia vascolare, con conseguente blocco cardiaco, preceduto da manifestazioni di bradicardia e

aritmia ventricolare (Ito et al., 1982). È riportato che solo la tempestiva iniezione cardiaca intraventricolare di vasodilatatori come papaverina e isosorbide dinitrato è in grado di contrastare la letalità da palitossina (Vick e Wiles, 1975).

Diversi studi analizzano gli effetti della palitossina in tessuti isolati, prevalentemente muscolatura liscia, come sezioni di aorta, coronarie o trachea di ratto, sottolineando la capacità della tossina di indurre contrazione o ridurre l'eventuale rilassamento del muscolo contratto (Ozaki et al., 1983; Nagase et al., 1987; Robinson e Franz, 1991; Taylor et al., 1995; Posangi et al., 1992; Robinson et al., 1992). È riportato, a livello della giunzione neuromuscolare del muscolo anococcigeo di ratto, un marcato rilascio di neurotrasmettitore, con rigonfiamento delle diverse componenti cellulari (Amir et al., 1997).

1.5 Casi di tossicità umana attribuita alle palitossine

La palitossina può accumularsi lungo la catena alimentare dalle fonti note (coralli e microalghe) fino ai prodotti ittici commestibili, quali crostacei, echinodermi, molluschi e pesci, che possono fungere da vettori della tossina, causando possibili intossicazioni alimentari. Casi di intossicazione alimentare, anche fatali, si sono avuti per lo più in paesi tropicali e subtropicali. In Tabella 2 sono riassunti i casi di tossicità alimentare attribuiti a palitossine ed i relativi organismi vettori. I principali sintomi di intossicazione alimentare osservati sono a carico del sistema gastroenterico (nausea, vomito, diarrea, dolori addominali) e neuromuscolare (crampi, mialgia, convulsioni, vertigini, intorpidimento delle estremità), con associate difficoltà respiratorie e cianosi. Nei pazienti ospedalizzati sono state talvolta registrate alterazioni cardiache (aritmia, bradicardia e/o alterazioni elettrocardiografiche), alterazioni dei livelli ematici di enzimi di origine muscolare (creatin-fosfochinasi, lattato deidrogenasi, aspartato transaminasi, alanina transaminasi) e mioglobinuria conseguente a raddomiolisi.

Molti casi di intossicazione alimentare sono stati attribuiti a palitossine solo sulla base dei sintomi osservati o rilievi medici effettuati dopo l'ospedalizzazione, che erano in linea con quelli di altri

casi in cui la presenza di palitossina è stata accertata negli organismi vettori. In questi casi gli organismi coinvolti erano alcune specie di pesci (*Ostracion immaculatus*, *Lactoria diaphana*, pesci serranidi) e granchi (*Daira perlata*) (Llewellyn, 2001; Yamasaki et al., 2003; Shinzato et al., 2008; Taniyama et al., 2009; Arakawa et al., 2010).

Tabella 2. Intossicazioni alimentari umane da palitossina. (a) MBA: saggio biologico in topo, (b) HNA: saggio emolitico con neutralizzazione tramite anticorpi anti-PLTX, (c) LC-MS: spettrometria di massa, (d) RIA: saggio radioimmunologico (da Tubaro et al., 2011 modificato).

Luogo e anno	Vettore	Esito	Rilevazione PLTX	Riferimento
Filippine 1984	<i>Demania reynaudii</i> (granchio)	Decesso uomo di 49 anni	Identificazione per MBA ^a e HPLC nei residui alimentari	Alcala et al., 1988
Giappone 1986	<i>Scarus (Ypsiscarus) ovifrons</i> (pesce)	Uomo di 54 anni (sopravvissuto) e donna di 79 anni (deceduta)	Identificazione per MBA ^a , HPLC e spettro UV nei residui alimentari	Noguchi et al., 1987
Madagascar 1994	<i>Herklotsichthys quadrimaculatus</i> (pesce)	Donna (deceduta)	Identificazione per HNA ^b , cromatografia, MS ^c , nei residui alimentari	Onuma et al., 1999
Giappone 2000	<i>Epinephelus</i> sp. (pesce)	11 persone tra 27 e 57 anni (sopravvissute)	Identificazione per HNA ^b , MBA ^a , nei residui alimentari	Taniyama et al., 2002
Hawaii 1986	<i>Decapterus Macrosoma</i> (pesce)	Uomo (sopravvissuto)	Identificazione per cromatografia, RIA ^d in campioni diversi da quello assunto	Kodama et al., 1989
Giappone 1996	<i>Scarus (Ypsiscarus) ovifrons</i> (pesce)	Uomo di 55 anni (sopravvissuto)	Attribuzione per sintomi e analisi cliniche compatibili per PLTX. Identificazione analitica in campioni diversi da quello assunto	Okano et al., 1998
Giappone 1999	<i>Scarus (Ypsiscarus) ovifrons</i> (pesce)	2 uomini (sopravvissuti)		Yoshimine et al., 2001
Giappone 1988	<i>Scarus (Ypsiscarus) ovifrons</i> (pesce)	2 uomini (sopravvissuti)		Tabata et al., 1989
Giappone 1986	<i>Scarus (Ypsiscarus) ovifrons</i> (pesce)	2 uomini (sopravvissuti)		Ichida et al., 1988

Anche se non sono riportati casi noti di intossicazione alimentare nei paesi del Mediterraneo, la presenza di palitossine sarebbe stata riscontrata in campioni di microalghe del genere *Ostreopsis*, di mitili (*Mytilus galloprovincialis*), di polipi (Aligizaki et al., 2008, 2011) e di ricci di mare (EFSA, 2009). Questo impone uno stretto monitoraggio di tali tossine nei prodotti ittici, anche di quelli raccolti nel mare Mediterraneo.

Poiché coralli del genere *Palythoa* e *Protopalythoa* sono comunemente utilizzati a scopo decorativo per acquari domestici e tra gli appassionati non è sempre nota l'origine e/o tossicità di una data specie, si sono avuti anche casi di intossicazione umana per contatto diretto con questi coralli di origine tropicale, durante la pulizia di acquari domestici. In un caso l'intossicazione è stata di tipo inalatorio, per esposizione all'aerosol proveniente dal corallo durante la sua rimozione con acqua bollente, con rinorrea, tosse, difficoltà respiratorie, dolori al petto (Deeds e Schwartz, 2010); la presenza di palitossine è confermata tramite saggio emolitico, HPLC-UV e LC-MS. In un altro caso si è avuta intossicazione sistemica in un uomo che ha maneggiato coralli del proprio acquario procurandosi dei piccoli tagli alla mano, che potrebbero aver favorito la penetrazione della tossina nel torrente circolatorio. Oltre a formicolio e gonfiore alle dita, i sintomi sono stati anche di tipo sistemico, con mialgia, debolezza, tremori, vertigini, mentre nelle analisi effettuate durante l'ospedalizzazione sono state rilevate alterazioni elettrocardiografiche. La presenza di palitossina è stata confermata tramite saggio emolitico (Hoffmann et al., 2008).

La presenza di palitossine nelle microalghe del genere *Ostreopsis* potrebbe porre un rischio per la salute umana anche in seguito ad esposizione diretta, dermica o inalatoria, ad acqua marina o aerosol (Tichadou et al., 2011; Tubaro et al., 2011). Negli ultimi anni sono state sempre più numerose le proliferazioni nelle acque del Mediterraneo di queste microalghe; palitossine sono state rilevate in campioni algali prelevati lungo la costa ligure nelle estati del 2005 e 2006 (Brescianini et al., 2006; Ciminiello et al., 2006, 2008). Nel luglio 2005, in particolare, oltre 200 persone frequentati la spiaggia per attività lavorative o ricreative, in concomitanza della presenza di *Ostreopsis*, sono ricorsi al pronto soccorso per problemi alle vie aeree superiori (tosse, dispnea,

irritazione alla gola, rinorrea), febbre, mal di testa, nausea, dermatiti e congiuntiviti. Di queste, oltre 40 persone sono state trattenute in osservazione per 24-72 ore (Durando et al., 2007). Mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa, la presenza di palitossina e di un suo analogo (ovatossina-a) è stata rilevata in campioni di *Ostreopsis* raccolti nelle acque antistanti le spiagge in cui avevano soggiornato i pazienti, tanto da far supporre la loro diffusione attraverso l'aerosol marino (Ciminiello et al., 2006, 2008, 2010a). Gli stessi autori hanno escluso la presenza di brevetossine, prodotte da *Karenia brevis*, specie nota per dare sintomi analoghi quando presenti nell'aerosol marino.

In Italia, segnalazioni di simili intossicazioni inalatorie in concomitanza a proliferazioni di *Ostreopsis* si sono avute anche lungo le coste toscane nel 1998, 2000 e 2001 (Sansoni et al., 2003) e vicino a Bari nel 2001, 2003 e 2004 (Di Turi et al., 2003; Gallitelli et al., 2005), anche se è mancata una identificazione analitica della tossina nelle microalghe e/o nell'aerosol.

Nel Mediterraneo, segnalazioni di problemi attribuiti alla presenza di *Ostreopsis* si sono avute lungo le coste della Spagna (2004 in Catalogna, 2006 in Andalusia), della Francia e del Principato di Monaco (2006 vicino a Marsiglia, 2008 e 2009 a Nizza, Villefranche, Monaco). La sintomatologia riportata dalle persone frequentanti l'ambiente costiero in concomitanza alla proliferazione di *Ostreopsis* ha ricalcato quanto descritto per i casi italiani (Vila et al., 2001; Barroso García et al., 2008; Kermarec et al., 2008; Battocchi et al., 2010; Tichadou et al., 2010). Una immagine della distribuzione di *Ostreopsis* nel Mediterraneo, con indicazione degli associati eventi tossici, è riportata in Figura 5 (gentile concessione della Dott.ssa A. Penna).

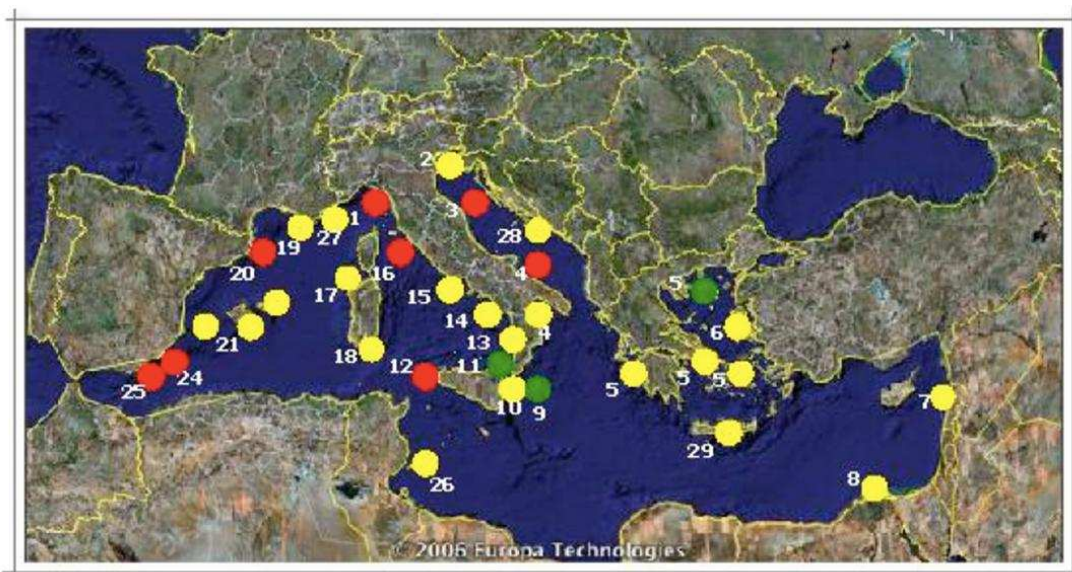


Figura 5. Presenza di *Ostreopsis* nel Mediterraneo. Verde: cellule di *Ostreopsis* rilevate; giallo: proliferazioni massive segnalate; rosso: concomitanti effetti tossici (gentile concessione della Dott.sa A. Penna e S. Fraga).

1.6 Metodi di rilevazione delle palitossine

La tossicità delle palitossine e la frequente presenza anche nelle aree temperate di alghe del genere *Ostreopsis*, potenzialmente produttrici di tali composti, richiede la disponibilità di metodi sensibili per il loro rilevamento nei prodotti ittici, nelle alghe produttrici e nell'acqua marina, come anche in campioni biologici dei pazienti intossicati.

La rilevazione delle palitossine in campioni naturali avviene prevalentemente mediante il saggio emolitico e la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS). Non ci sono ad oggi dei metodi ufficiali riconosciuti per la rilevazione delle palitossine ed ogni laboratorio tende a sviluppare una sua metodologia a seconda della propria specializzazione (Riobò e Franco, 2010); la mancanza di una validazione formale in studi inter-laboratorio è in parte dovuta alla mancanza di standard certificati per le palitossine. Di seguito sono descritti gli approcci analitici per la rilevazione delle palitossine riportati in letteratura.

Spettrometrie:

Nello spettro della luce ultravioletta e visibile, la tossina possiede un picco di assorbimento a 233

nm, determinato dalla presenza nella molecola dei dieni coniugati, e uno a 263 nm, dato dal gruppo 3-amido-N-(3-idrossipropil)-acrilamidico all'estremità idrossiterminale. Il rapporto tra l'assorbimento della molecola a 233 nm e quello a 263 nm è pari a 1.7 ed, essendo caratteristico della palitossina, esso viene considerato un "marker" indicatore di questo composto (Moore e Scheuer, 1971; Moore et al., 1975). In spettrometria a raggi infrarossi (IR) la tossina ha un picco attorno a 1650 cm^{-1} , dato dal gruppo amidico alfa-beta insaturo all'estremità idrossiterminale (Moore e Scheuer, 1971). Lo scarso limite di rilevazione riportato per le tecniche spettrofotometriche ($5\text{ }\mu\text{g/ml}$ di PLTX in acqua) limita l'applicabilità di tali metodi di analisi per campioni naturali (Mereish et al., 1991).

Molto più sensibile e più usata nell'analisi di campioni naturali è la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa, attualmente considerata il metodo più affidabile per l'analisi delle palitossine; il picco caratteristico della PLTX è a 327 m/z, negli ioni bivalenti (m/z 1340) e trivalenti (m/z 912) degli spettri MS/MS. Questo metodo permette di discriminare qualitativamente e quantitativamente anche i diversi analoghi della palitossina. Il limite di sensibilità più recente riportato per questo metodo è di 1.9 ng/ml (Ciminiello et al., 2006, 2010a, 2010b). Il principale limite all'utilizzo di questa tecnica, che deve essere sottoposta al processo di validazione, è il costo della strumentazione e la necessità di personale qualificato.

Cromatografie:

In letteratura è riportato un test per la rilevazione della palitossina con elettroforesi capillare (HPCE) il cui pregio è di analizzare volumi piccolissimi (5 nanolitri) e di rilevare in questi la palitossina fino a 100 ng/ml in soluzioni standard (Mereish et al., 1991); questo metodo non ha trovato però negli anni successivi applicazione all'analisi di campioni naturali. La cromatografia liquida ad elevata prestazione (HPLC) accoppiata alla rilevazione in ultravioletto (HPLC-UV) è stata utilizzata per rilevare la palitossina in estratti di *Ostreopsis*, riportando una sensibilità di 1-2 μg PLTX per iniezione, ma la tecnica non sembra adatta per l'analisi di estratti di mitili a causa del

forte effetto matrice (Riobò et al., 2006; Riobò e Franco, 2010). È stato inoltre messo a punto un metodo per la derivatizzazione fluorescente pre-colonna della palitossina e sua successiva rilevazione in fluorescenza (HPLC-FLD), che mostra una sensibilità di 0.75 ng di palitossina standard per iniezione ed ha ottenuto soddisfacenti valori di “recovery” (95 %) da estratti di *Ostreopsis*; rimangono da testare le prestazioni del test nell’analisi di estratti di molluschi (Riobò et al., 2006).

Test immunologici:

Nel 1988 fu messo a punto un primo test radioimmunologico (RIA) per la palitossina con una sensibilità riportata dell’ordine dei pg/ml (Levine et al., 1988); per questo test sono stati sviluppati per la prima volta degli anticorpi policlonali di coniglio anti-PLTX in grado di inibire i suoi effetti tossici *in vivo* e *in vitro* (Levine et al., 1987).

Lo sviluppo di test immunoenzimatici per la palitossina è stato oggetto di uno studio approfondito dei primi anni novanta (Bignami et al., 1992). In questo lavoro sono stati prodotti anticorpi anti-palitossina sia policlonali in coniglio che monoclonali in topo. Tra le diverse architetture di saggio immunoenzimatico esplorate (diretto o indiretto, competitivo o non competitivo), la migliore è risultata il “sandwich” ELISA indiretto, in grado di rilevare fino a 10 pg di palitossina per test. Gli anticorpi anti-PLTX monoclonali di topo, denominati come 73D3, realizzati in questo lavoro del 1992 hanno trovato utilizzo come inibitori degli effetti della palitossina in numerosi studi successivi, soprattutto nell’analisi di estratti tramite il saggio di neutralizzazione dell’emolisi, come descritto di seguito. Un altro lavoro più recente riporta la produzione di frammenti anticorpali a catena singola (ScFv) anti-PLTX tramite la tecnica del *Phage Display*; tali anticorpi sono stati utilizzati per lo sviluppo di un ELISA competitivo con un limite di rilevabilità indicato a 0.5 pg/ml (Garet et al., 2009). Una architettura di ELISA di tipo diretto, in cui la PLTX è usata come antigene di “coating”, è stata anche riportata, con un range di risposta alla tossina di 6-250 ng/ml (Frolova et al., 2000).

La diffusione di questi metodi per l'analisi di campioni naturali negli anni successivi è stata limitata dalla necessità di ottenere gli anticorpi, disponibili solo su scala di laboratorio. L'acuirsi negli ultimi anni del problema della tossicità da palitossine, in relazione alle proliferazioni di *Ostreopsis*, ha rilanciato l'interesse verso queste tecniche, il cui sviluppo è stato tra gli obiettivi di questa tesi.

Il comune problema dei saggi immunologici è che sono indirizzati verso elementi strutturali delle palitossine, alla ricerca di un determinato epitopo, e non considerano la loro differente potenza biologica; palitossine metabolizzate non più tossiche potrebbero dare comunque positività mentre analoghi della palitossina altrettanto tossici potrebbero non essere riconosciuti a causa della mancanza di un dato epitopo. In tal senso una approfondita conoscenza di struttura e diffusione dei diversi analoghi della palitossina è necessaria per lo sviluppo di queste tecniche.

Saggio biologico nel topo (“mouse bioassay”):

Il “mouse bioassay” valuta la tossicità *in vivo* nel topo di un estratto ottenuto dal campione da analizzare ed è uno dei test più diffusi nel campo delle tossine marine. Questo test rende conto della tossicità globale del campione, ma non consente di discriminare i diversi analoghi della palitossina coinvolti o possibili tossine interferenti. Come descritto in un recente lavoro su questo saggio, la tossicità è attribuita alla palitossina in base all'osservazione di sintomi specifici, come estensione degli arti posteriori, inarcamento della schiena, atassia, debolezza, ridotta locomozione, convulsioni, respiro affannoso (Riobò et al., 2008a). Le attuali tendenze in tossicologia, tuttavia, puntano a limitare l'utilizzo del saggio biologico nel topo per motivi etici e per la variabilità della risposta animale, che rende difficile una quantificazione precisa della tossina.

Test di citotossicità:

I test di citotossicità sono considerati una alternativa all'utilizzo di animali. Hanno il vantaggio di essere sensibili (a livelli di pg/ml) e di rispondere anche contro eventuali analoghi della palitossina,

dando conto della globale tossicità di un campione, ma richiedono attrezzature adeguate, la disponibilità continua di cellule in determinate fasi di crescita e personale specializzato a trattare le colture cellulari. Inoltre, sono più soggetti rispetto ai metodi chimici all'interferenza con altre tossine marine dall'attività citotossica. Spesso per la positività alla PLTX viene richiesta la conferma di un metodo chimico. Lo sviluppo di questi saggi è recente rispetto ad altre tecniche di rilevazione, riflettendo la tendenza al passaggio a metodi *in vitro* piuttosto che *in vivo* per lo studio delle tossine; un riassunto dei test di citotossicità riportati in letteratura è presentato in Tabella 3.

Tabella 3. Saggi di citotossicità riportati per la palitossina.

Modello cellulare	Parametro rilevato	Sensibilità riportata	Note	Riferimento
3Y1 (ratto)	Saggio MTT (vitalità cellulare)	---	Usato per rilevazione in <i>Palythoa</i>	Oku et al., 2004
MCF-7 (uomo)	Rilascio LDH (lisi cellulare)	50 pg/ml (Microalghe, mitili, ricci di mare)	Conferma specificità con ouabaina	Bellocci et al., 2008a
Neuro-2a (topo)	Saggio MTT (vitalità cellulare)	---	Analisi multipla di tossine marine	Canete e Diogène, 2008
Neuro-2a (topo)	Saggio MTT (vitalità cellulare)	50 µg/kg (mitili)	Conferma specificità con ouabaina	Ledreux et al., 2009
BE(2)-M17 (uomo)	Alamar Blue (vitalità cellulare)	0.2 ng/ml (<i>Ostreopsis</i> , mitili)	Conferma specificità con ouabaina	Espina et al., 2009

Saggio emolitico:

Tra i saggi di citotossicità, il saggio emolitico ha ricoperto storicamente un ruolo particolare e la valutazione di un suo possibile utilizzo a scopi di monitoraggio è stato tra gli obiettivi di questa tesi. Gli effetti della PLTX sugli eritrociti sono stati studiati negli anni ottanta (e qui riassunti in § 1.3), ma è nel 1993 che questi sono stati sfruttati per la prima volta per rilevare la palitossina (Bignami, 1993). In questo saggio, gli eritrociti (generalmente di topo, pecora o uomo) vengono diluiti nel tampone di lavoro (soluzione salina tamponata in fosfato con calcio e borati 1 mM) e incubati con la tossina (o col campione incognito) per almeno 4 ore a 37°C. La presenza di emolisi, dipendente

dalla concentrazione di palitossina, è facilmente distinguibile a occhio per il rilascio di emoglobina che può essere quantificata per via spettrofotometrica a 405 nm. Il test è relativamente rapido, di facile esecuzione, particolarmente sensibile (nell'ordine dei pg/ml), di gestione più semplice rispetto alle colture cellulari o alle strumentazioni LC-MS. La specificità verso la PLTX può essere valutata per inibizione dell'emolisi tramite ouabaina o anticorpi anti-PLTX (saggio di neutralizzazione dell'emolisi, HNA). Tutti questi fattori hanno determinato il successo di questo saggio, attualmente tra i più usati per accertare la presenza di PLTX in campioni naturali (Aligizaki et al., 2010). Il saggio emolitico ha avuto un ruolo, spesso in accoppiamento con altri metodi, nella determinazione della palitossina in vari tipi di pesci (*Chaetodon*, *Herklotsichthys quadrimaculatus*, *Tetraodon*, pesci della barriera corallina) (Gleibs e Mebs, 1999; Onuma et al., 1999; Wachi et al., 2000; Taniyama et al. 2001), mitili e microalghe del genere *Ostreopsis* (Aligizaki et al., 2008).

Tuttavia, mancando un protocollo generale di esecuzione, i lavori descritti in letteratura si differenziano molto, sia nelle metodiche di preparazione del campione che nella procedura del saggio e quindi nei risultati riportati, rendendo i dati di letteratura difficili da confrontare. Inoltre il saggio è caratterizzato da una certa sensibilità agli errori sperimentali e variabilità di risposta, dovuta alla notevole pendenza della curva concentrazione-effetto. Per migliorare l'affidabilità del saggio è stata recentemente proposta una modifica alla procedura generale del 1993 che prevede l'utilizzo di sangue di pecora, una incubazione di 18 ore a 25°C e una inibizione parziale dell'emolisi con ouabaina (Riobò et al., 2008b).

2. SCOPO DELLA TESI

Il riscaldamento globale e l'aumento dei traffici marittimi sono fattori che hanno portato specie di microalghe altrimenti tropicali a diffondersi anche a latitudini maggiori; negli ultimi anni le proliferazioni di microalghe potenzialmente tossiche appartenenti al genere *Ostreopsis* sono diventate un fenomeno non inusuale in molte località costiere del Mediterraneo. Le palitossine prodotte da queste microalghe sono diventate in più occasioni un problema per la frequentazione dell'ambiente costiero, sia per attività ricreative che lavorative, rappresentando un danno, oltre che per la salute pubblica, anche per l'industria turistica ed il settore dell'acquacoltura. I problemi finora più frequentemente riscontrati in Mediterraneo comprendono irritazione delle prime vie aeree, congiuntiviti, febbre e dermatiti, che in alcuni casi hanno richiesto l'ospedalizzazione. Anche se non sono state registrate intossicazioni alimentari da palitossine in paesi del Mediterraneo, la tossina è stata rilevata nei molluschi che davano positività al test di legge per le tossine liposolubili di origine algale (acido okadaico e derivati, azaspiracidi, yessotossine e pectenotossine). Va ricordato che sono noti casi anche fatali di intossicazione alimentare da ingestione di pesci e crostacei contaminati da palitossine in paesi tropicali.

Per anni effettuare degli studi di tossicità orale rigorosi è stato problematico in quanto la complessa struttura della tossina ne rende impraticabile la sintesi chimica a scopo commerciale e la purificazione da organismi quali celenterati del genere *Palythoa* o da microalghe era un processo difficile che rendeva la tossina un prodotto prezioso. Attualmente è disponibile una preparazione commerciale di palitossina estratta da *P. tuberculosa* prodotta dalla ditta giapponese Wako Pure Chemical Industries Ltd (Osaka), mentre non sono disponibili in commercio analoghi della palitossina.

Scopo di questa tesi è stato quello di cercare di sopperire alla carenza di dati sulla tossicità orale della palitossina, effettuando uno studio di tossicità acuta nel topo, sufficientemente ampio da poter traslare il dato all'uomo stabilendo parametri quali la dose massima a cui non si riscontrano effetti avversi (NOAEL) e la dose acuta di riferimento (ARfD), necessari per fissare i limiti di legge per queste tossine nei prodotti ittici e di conseguenza sviluppare metodi in grado di quantificare tali livelli di tossina.

Di conseguenza, la ricerca si è incentrata sui metodi per il rilevamento della palitossina. Non esistendo kit o test commerciali per la sua rilevazione, la presenza di palitossina viene generalmente rilevata preliminarmente con la valutazione mediante il test di emolisi e confermata mediante analisi LC-MS ad alta risoluzione. Tuttavia, la complessità e l'elevato costo della strumentazione LC-MS rende questo metodo inadatto per test di routine o a scopo di monitoraggio. Inoltre, le molteplici vie con cui la tossina può dare tossicità (ingestione, contatto, inalazione) e le matrici in cui essa si potrebbe trovare (acqua marina, fitoplancton, molluschi, crostacei, pesci) giustificano la ricerca di metodi che tentino di coniugare i requisiti di sensibilità, specificità, facilità di esecuzione ed economicità.

I metodi che si è cercato di mettere a punto in questa tesi sono due:

1) Test immunoenzimatico (ELISA) quale test strutturale, scelto per la sua specificità e la possibilità di essere facilmente traslato nella versatile forma di un biosensore. Partendo dalle basi di letteratura descritte da Bignami et al. (1992) è stato possibile lavorare alla messa a punto di un "sandwich" ELISA indiretto, valutandone caratteristiche, quali specificità per la PLTX, sensibilità e riproducibilità, in vista di una possibile strutturazione in kit commerciale o dell'applicazione dei risultati nello sviluppo di un biosensore.

2) Test di emolisi (saggio emolitico) quale test funzionale, scelto per la sua sensibilità e facilità di esecuzione senza complesse strumentazioni. Anche se 17 anni di letteratura hanno decretato la fama del saggio emolitico per la rilevazione della palitossina, esistono differenze da lavoro a lavoro e non esiste

un protocollo universale per la sua esecuzione, cosa che rende necessaria la messa a punto del saggio da ogni laboratorio per il suo utilizzo. Scopo di questa tesi è stato indagare i parametri sperimentali del saggio allo scopo di un suo utilizzo interno al gruppo di ricerca ed esplorare i suoi possibili miglioramenti metodologici per poterlo adattare a situazioni di monitoraggio.

Durante il periodo di dottorato si è avuta la possibilità di lavorare con due campioni non commerciali di palitossina estratti da *P. toxica* e *P. tuberculosa* raccolti nelle coste hawaiane sul finire degli anni ottanta e forniteci dal Dr. Mark Poli della U.S. AMRIID (United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Ft. Detrick, USA) nell'ambito di un accordo tra l'ente americano e l'Università di Trieste. Nelle analisi di controllo effettuate mediante LC-MS ad alta risoluzione dal gruppo del Prof. Fattorusso dell'Università "Federico II" di Napoli, si è scoperto che il principale componente (> 90 %) dell'estratto di *P. toxica* non era la palitossina come supposto, ma un suo 42-idrossi derivato (42-OH-PLTX), mai descritto in precedenza in letteratura. Abbiamo quindi voluto caratterizzare alcuni dati di questo nuovo analogo, disponibile in quantità importanti, quali la sua tossicità acuta per via orale nel topo, le sue proprietà emolitiche e le capacità di "binding" al recettore della palitossina (NAKA).

Alla fine di settembre del 2009, si è avuta una proliferazione di *Ostreopsis* anche nelle acque del Golfo di Trieste e questo ha consentito di approfondire la conoscenza dei ceppi locali di questo organismo. Assieme all'identificazione e caratterizzazione in microscopia di queste microalghe è stata valutata la presenza e distribuzione di palitossine all'interno della cellula utilizzando per la prima volta tecniche immunocitochimiche. Inoltre, su colture di questo ceppo sono state eseguite analisi mediante spettroscopia Raman, allo scopo di rilevare la presenza di tossine e di altri componenti, utili ad approfondire la conoscenza della biologia di questo organismo. Il contenuto in tossine, sia delle popolazioni naturali che delle colture cellulari in diverse fasi di crescita, è stato analizzato mediante LC-MS ad alta risoluzione, sia sotto il profilo qualitativo che quantitativo.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Studio della tossicità acuta per via orale della palitossina e della 42-idrossi-palitossina

Disegno sperimentale. La tossicità acuta per via orale della palitossina e della 42-idrossi-palitossina (42-OH-PLTX) è stata studiata impiegando topi CD-1 femmine di 4 settimane (peso medio: 18-20 g; Harlan Laboratories; San Pietro al Natisone, Italia). Gli animali sono stati stabulati in gruppi di 5, in gabbie delle dimensioni di 26.7 x 20.7 x 14.0 cm, contenenti una lettiera di segatura d'abete depolverizzata, acquistata presso la Harlan Laboratories (San Pietro al Natisone, Udine). Essi sono stati tenuti per almeno una settimana nello stesso ambiente dove, successivamente, è stata eseguita la sperimentazione, in condizioni controllate di temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) ed umidità relativa (50-60 %) ed in presenza di un ciclo fisso di illuminazione artificiale (07.00-19.00). L'alimentazione degli animali era costituita da mangime pellettato per roditori (diametro: 14 mm), fornito dalla Harlan Laboratories (S. Pietro al Natisone, Udine), la cui composizione, dichiarata dalla ditta produttrice, è la seguente: proteine (18.5 %), grassi (5.5 %), fibre (4.5 %), ceneri (6.0 %), componenti non azotati (53.5 %), acqua (12.0 %). La sperimentazione è stata condotta in conformità alla normativa vigente che regola l'utilizzo di animali a scopi scientifici (D.L. 116 del 27 gennaio 1992), con le direttive dell'European Communities Council del 24 novembre 1986 (86/609/ECC) e con l'appendice A della Convenzione Europea ETS 123.

Gli animali sono stati privati del cibo 16 ore prima della somministrazione della palitossina, isolata da *Palythoa tuberculosa* (grado di purezza maggiore a 90 %; lotto WKL7151; Wako Pure Chemical Industries Ltd; Osaka, Giappone) o della 42-idrossi-palitossina, isolata da *Palythoa toxica* (grado di purezza maggiore a 90 %; Ciminiello et al., 2009). Le tossine, dissolte in tampone fosfato salino (PBS) pH 7.0, sono state somministrate mediante intubazione gastrica alle dosi di 300, 424,

600, 848, 1200 e 1697 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (5 animali per dose), in un volume di 10 ml/kg. Agli animali di controllo (5 animali) è stato somministrato il veicolo della tossina (10 ml PBS/kg). Dopo il trattamento, i topi sono stati osservati per 24 h, registrando i sintomi e la sopravvivenza. Durante l'osservazione, cibo e acqua erano disponibili *ad libitum* (il cibo è stato fornito 2 h dopo la somministrazione della tossina). Dagli animali deceduti durante il trattamento è stato immediatamente prelevato il sangue, mediante una siringa eparinizzata, al fine di determinare la formula leucocitaria e misurare i livelli plasmatici di alcuni enzimi e della creatinina. Dopo l'esame anatomopatologico, sono stati prelevati campioni dei principali organi e tessuti, che sono stati fissati in formalina al 10 % in tampone fosfato 0.1 M (pH 7.0) per l'analisi istologica al microscopio ottico. Campioni di cuore e muscolo scheletrico (soleo) sono stati fissati in glutaraldeide al 3 % in tampone cacodilato 0.1 M pH 7.4 per l'analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). A 24 h dal trattamento, gli animali sopravvissuti sono stati sacrificati mediante inoculazione intraperitoneale di ketamina cloridrato (350 mg/kg; Inoketam100; Virbac, Milano, Italia) e, da ciascuno di essi è stato prelevato il sangue, come precedentemente descritto, prima dell'analisi anatomopatologica e del prelievo dei principali organi e tessuti, come precedentemente descritto.

Analisi ematocliniche. I campioni di sangue sono stati analizzati per determinare i livelli plasmatici di alcuni *marker* di danno epatico, renale e/o muscolare, quali alanina transaminasi (ALT), aspartato transaminasi (AST), lattato deidrogenasi (LDH), creatina fosfochinasi (CPK) e creatinina, utilizzando i kit diagnostici commerciali (Roche S.p.A., Milano, Italia). La formula leucocitaria è stata determinata mediante conta differenziale dei leucociti in uno striscio di sangue su vetrino portaoggetto, dopo colorazione con Giemsa. Nei campioni ematici degli animali trattati con la 42-idrossi-palitossina e dei relativi controlli è stata determinata anche la concentrazione plasmatica di ioni potassio utilizzando un kit diagnostico della Roche S.p.A. (Milano, Italia).

Analisi al microscopio ottico. Campioni dei principali organi e tessuti (cuore, fegato, polmoni, reni, milza, stomaco, duodeno, digiuno, colon, retto, pancreas, timo, cervello, cervelletto, midollo spinale, utero, ovaie e muscolo scheletrico), fissati in formalina al 10 % in tampone fosfato 0.1 M

pH 7.0, sono stati disidratati mediante etanolo a grado crescente di concentrazione ed inclusi in paraffina per essere sezionati in fettine dello spessore di 5 μm . Queste sono state quindi colorate con ematossilina-eosina ed osservate al microscopio ottico. Le analisi sono state eseguite presso l'Istituto di Ricerche Biomediche "Antoine Marxer" RBM S.p.A. di Colletterto Giacosa (Torino).

Analisi al microscopio elettronico a trasmissione. Campioni di cuore e muscolo scheletrico degli animali trattati con palitossina e dei relativi controlli, di dimensioni inferiori a 1 mm^3 , sono stati fissati in glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato 0.1 M pH 7.3, per 3 ore a 4°C. Dopo 3 lavaggi di 10 min con tampone cacodilato 0.1 M pH 7.4, i campioni sono stati post-fissati in osmio tetrossido all'1 %, sempre in tampone cacodilato 0.1 M pH 7.4, per 1 ora a 4°C, per poi essere disidratati in soluzioni di etanolo a concentrazioni crescenti. I campioni sono stati infine fissati in resina epossidica (Dow Epoxy Resin 332), da cui sono state ottenute delle sezioni ultrasottili di 0.12 μm , con l'ultramicrotomo Ultracut UCT8 (Leica; Mikrosysteme Aktiengesellschaft, Wirm, Austria). Le sezioni sono state quindi impregnate con uranile acetato e piombo citrato ed osservate al microscopio elettronico a trasmissione (Philips EM 208; Eindhoven, Olanda). Le analisi sono state effettuate presso la Sezione di microscopia elettronica del Centro di Coordinamento e Sviluppo Progetti ed Apparecchiature (CSPA) dell'Università di Trieste.

Analisi statistica. La dose letale per il 50 % degli animali (DL_{50}) è stata calcolata secondo il metodo di Finney (Finney, 1971) utilizzando il software Biostat2007. I parametri ematici, espressi come media \pm errore standard, sono stati analizzati mediante il test "t" di Student, accettando come significativi i valori di p inferiori a 0.05.

3.2 Misurazione del "binding" di palitossina e 42-idrossi-palitossina alla Na^+/K^+ -ATPasi

Le capacità di palitossina e 42-OH-PLTX di competere con l'ouabaina per il legame alla Na^+/K^+ -ATPasi (NAKA) è stata valutata impiegando una preparazione commerciale di NAKA di corteccia cerebrale suina (Sigma-Aldrich; Milano, Italia). Nove diluizioni seriali di PLTX, 42-OH-PLTX o ouabaina in 200 μl di tampone (Tris-HCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, NaH_2PO_4 1 mM, H_3BO_3 1 mM, pH

7.4) sono state depositate nei pozzetti di piastre multipozzetto per test di “binding” (96-well Multiscreen-FB microtiter plate; Millipore, Milano, Italia). A ciascuna di esse sono stati aggiunti 25 μ l di soluzione di NAKA 400 μ g/ml in tampone e 25 μ l di una soluzione di [3 H]ouabaina (15-30 mCi/ μ mole; Perkin-Elmer, Monza, Italia) 50 nM in tampone, quale competitore radiomarcato delle palitossine e dell’ouabaina per il legame alla NAKA. Le concentrazioni finali nei pozzetti (volume finale: 250 μ l) delle palitossine erano comprese tra 0.15 e 1000 nM, la concentrazione della NAKA era pari a 40 μ g/ml, mentre quella del ligando radiomarcato era pari a 5 nM. Il “binding” aspecifico è stato valutato in presenza di ouabaina non marcata 100 μ M. Dopo 4 ore di incubazione a 37°C, il contenuto dei pozzetti della piastra è stato filtrato (Multiscreen_{HTS} vacuum manifold; Millipore, Milano, Italia) e sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 25 μ l di liquido di scintillazione (OptiPhase SuperMix; Perkin-Elmer, Monza, Italia). La radioattività è stata successivamente misurata mediante scintillatore (MicroBeta Trilux counter; Wallac, Turku, Finlandia). Il “binding” è stato espresso come percentuale di spiazzamento della [3 H]ouabaina dalla NAKA da parte delle tossine in esame.

3.3 Messa a punto di un saggio immunoenzimatico (ELISA) per il dosaggio delle palitossine

Allo scopo di allestire un kit immunoenzimatico per il dosaggio della palitossina nei prodotti ittici, nelle alghe produttrici delle tossine e/o nell’acqua marina, è stato realizzato un saggio di tipo non competitivo indiretto (a “sandwich”), seguendo i passaggi di seguito riportati ed illustrati in Figura 6:

- (1) adsorbimento alla piastra multipozzetto dell’anticorpo di cattura della tossina, seguito dal blocco dei siti liberi sulla piastra;
- (2) aggiunta di diluizioni seriali di tossina;
- (3) aggiunta dell’anticorpo di riconoscimento;
- (4) aggiunta dell’anticorpo secondario, coniugato ad un enzima, in grado di legarsi al frammento Fc dell’anticorpo di riconoscimento;

(5) aggiunta del substrato per l'enzima e del cromogeno per lo sviluppo della reazione colorimetrica, misurabile per via spettrofotometrica.

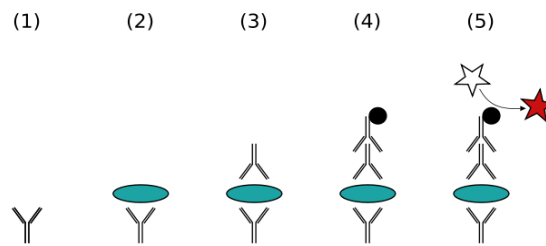


Figura 6. Architettura sperimentale del saggio immunoenzimatico a “sandwich” indiretto.

Come anticorpo di cattura è stato usato un anticorpo monoclonale anti-palitossina (α PLTX-mAb) di origine murina (73D3; Bignami et al., 1992), fornito dal Dr. Mark Poli della U.S. AMRIID (United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Ft. Detrick, USA).

Per il riconoscimento è stato utilizzato un anticorpo policlonale anti-palitossina (α PLTX-pAb) di coniglio. L'anticorpo policlonale è stato ottenuto presso l'Università di Trieste, immunizzando due conigli maschi New Zealand White (peso: 2 kg; Harlan Laboratories; San Pietro al Natisone, Italia) con una miscela di palitossina e 42-idrossi-palitossina (isolate da *Palythoa tuberculosa*; United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Ft. Detrick, USA) coniugate all'albumina serica bovina (PLTX-42-OH-PLTX-BSA). La prima immunizzazione è stata effettuata inoculando per via intradermica 200 μ g di coniugato di PLTX e 42-OH-PLTX con BSA disciolto in PBS ed adiuvante completo di Freund. Il secondo inoculo è stato effettuato due settimane dopo iniettando per via intradermica 100 μ g di coniugato in PBS ed adiuvante incompleto di Freund. Gli inoculi successivi sono stati effettuati ogni 4 settimane iniettando 75 μ g di coniugato PLTX-BSA per via sottocutanea e 25 μ g dello stesso coniugato per via intramuscolare, controllando il titolo di anticorpi anti-PLTX 10 giorni dopo ciascun inoculo. Alla fine del trattamento (undicesimo inoculo per un coniglio, ottavo inoculo per l'altro) il siero totale dei conigli e quello dei precedenti prelievi con titolo anticorpale elevato è stato raccolto e conservato a -20°C [come “pool” di anticorpi policlonali anti-PLTX, concentrazione attesa di immunoglobuline G (IgG): 5 mg/ml]. La

preparazione dei coniugati PLTX-BSA è stata effettuata dal gruppo del Prof. Benedetti del Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche dell'Università di Trieste. La caratterizzazione del siero di coniglio è stata effettuata dal gruppo del Prof. Marzari del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste.

L'anticorpo secondario è un anti-IgG di coniglio coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (HorseRadisch Peroxidase, HRP) acquistato presso la Dako (Milano, Italia) ed utilizzato secondo le indicazioni del produttore in diluizione 1:2000. La soluzione di substrato dell'HRP (perossido di idrogeno) ed il cromogeno tetrametilbenzidina (TMB), sono invece prodotti della Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

La procedura sperimentale dettagliata inizialmente sviluppata per l'esecuzione del saggio prevedeva i seguenti punti:

- 1) "Coating": incubazione in pozzetti per test ELISA (8 well EIA strip plate; Corning Costar, NY, USA) con l'anticorpo monoclonale di cattura (1 µg/pozzetto; volume 100 µl), per 16 h a 4°C;
- 2) "Blocking": inattivazione dei siti liberi sulla superficie dei pozzetti con latte in polvere al 2 % in PBS (200 µl), per 45 min a temperatura ambiente;
- 3) Lavaggio dei pozzetti con PBS (200 µl), per 3 volte;
- 4) Aggiunta di diluizioni seriali di PLTX in PBS (100 µl) oppure, per i controlli negativi (C-), di solo PBS (100 µl); incubazione per 1 h a temperatura ambiente;
- 5) Lavaggio dei pozzetti con PBS contenente Tween 20 allo 0.1 % (200 µl), per 3 volte;
- 6) Lavaggio dei pozzetti con PBS (200 µl), per 3 volte;
- 7) Aggiunta degli anticorpi policlonali anti-PLTX (siero immune di coniglio) come diluizione 1:4000 con latte al 2 % in PBS (100 µl) ed incubazione per 1 h a temperatura ambiente;
- 8) Lavaggio con PBS contenente Tween 20 allo 0.1 % (200 µl), per 3 volte;
- 9) Lavaggio dei pozzetti con PBS (200 µl), per 3 volte;

- 10) Aggiunta dell'anticorpo secondario (100 μ l) ed incubazione per 45 min a temperatura ambiente;
- 11) Lavaggio con PBS contenente Tween 20 allo 0.1 % (200 μ l), per 3 volte;
- 12) Lavaggio dei pozzetti con PBS (200 μ l), per 3 volte;
- 13) Aggiunta di 60 μ l di soluzione di perossido di idrogeno e TMB e sviluppo della reazione colorimetrica per 5 min, al buio;
- 14) Blocco della reazione con aggiunta di acido solforico 1 M (30 μ l) e misurazione dell'assorbanza a 450 nm.
- 15) Ogni determinazione è stata eseguita in triplicato e ogni valore è stato espresso come media delle tre letture, a cui è stata sottratta la media del controllo negativo. I risultati sono stati elaborati utilizzando i software GraphPad Prism 5 e SigmaPlot 11.

Il saggio è stato impiegato anche per verificare la capacità di rilevare la 42-idrossi-palitosina e l'analogo ostreocina-D (80-1.25 ng/ml), quest'ultima fornita dal Prof. Yasumoto del Japan Food Research Laboratories (Tokyo, Giappone) (Figura 7), nonché altre tossine di origine algale quali l'acido okadaico (OA), l'acido domoico (DA), la yessotossina (YTX), la brevetossina-3 (PbTx3) la saxitossina (STX), acquistate dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia) oppure fornite dal prof. Yasumoto (Japan Food Research Laboratories; Tokyo, Giappone), dal Dott. Poli (United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Ft. Detrick, USA) o dalla Dott.ssa Van Dolah (National Oceanic and Atmospheric Administration; Charleston, USA) (Figura 8).

Queste tossine sono state analizzate a concentrazioni 10, 100, 1.000, 10.000 volte maggiori rispetto al range di rilevabilità della palitosina, ovvero comprese tra 100 ng/ml e 100 μ g/ml.

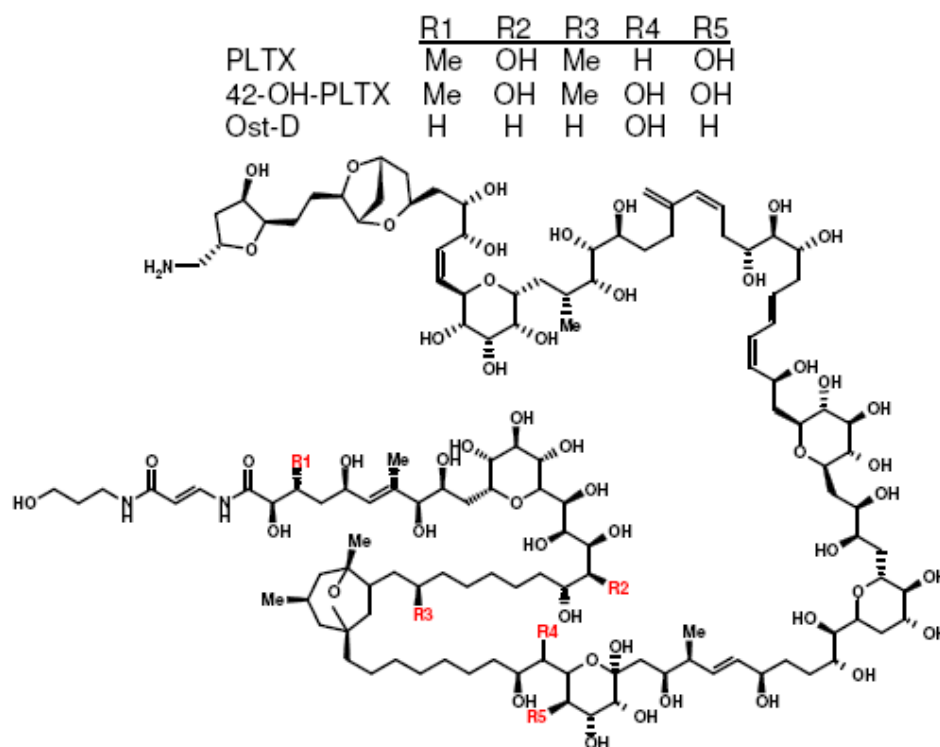


Figura 7. Differenze strutturali tra PLTX, 42-OH-PLTX e Ost-D.

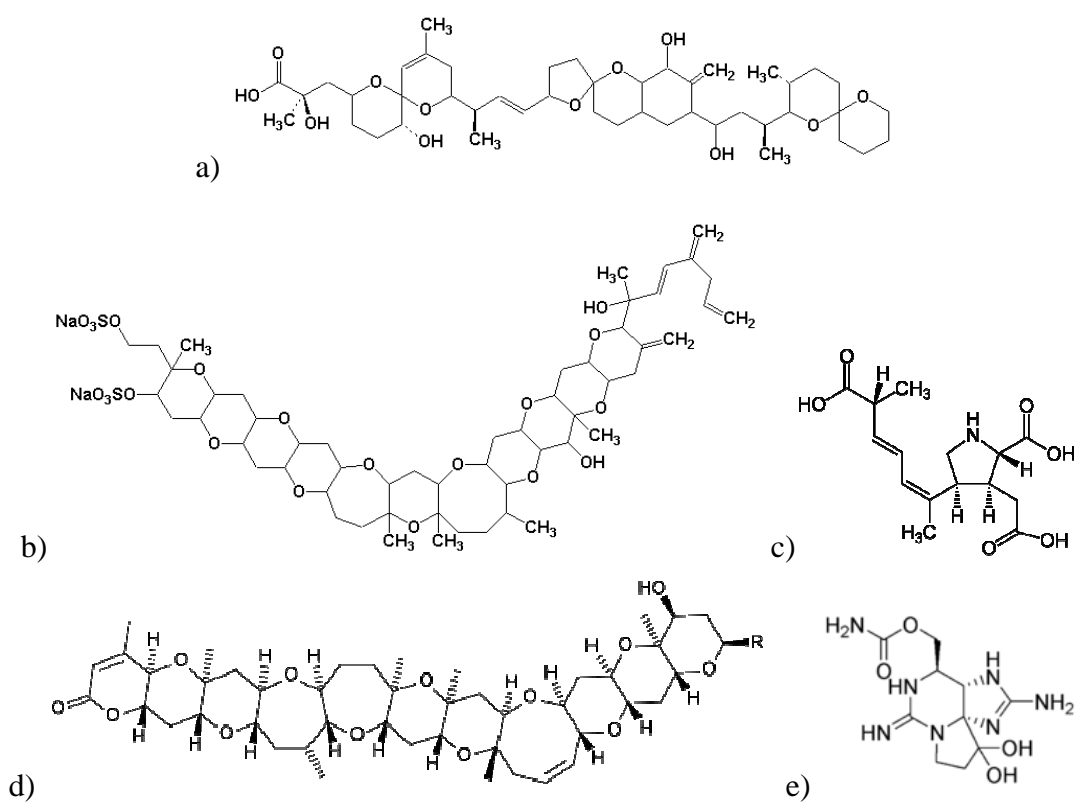


Figura 8. Struttura delle tossine analizzate per la reattività crociata nel saggio immunoenzimatico non competitivo indiretto. a) acido okadaico; b) yessotossina; c) acido domoico; d) brevetossina-3, R = $-\text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$; e) saxitossina.

Al fine di migliorare la riproducibilità del saggio immunoenzimatico, è stata utilizzata come tossina standard anche un coniugato PLTX-biotina (1:1), preparato impiegando PLTX isolata da *P. tuberculosis* fornita dalla United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (Ft. Detrick, USA), da cui è stata ottenuta una soluzione acquosa di coniugato alla concentrazione di 5 mg/ml, molto più concentrata rispetto alla soluzione del coniugato ottenibile con la palitossina della Wako Pure Chemical Industries Ltd (25 µg/ml).

Per valutare l'effetto del solvente sulla stabilità della PLTX-biotina, dalla soluzione madre 5 mg/ml sono stati preparati cinque soluzioni diluite del coniugato a 5 µg/ml, in 5 diversi solventi e conservati a 4°C. I solventi usati erano: (1) acqua distillata, (2) PBS pH 7.4, (3) dimetilsolfossido (DMSO), (4) tampone Tris-HCl pH 7.0, (5) tampone sodio carbonato pH 9.6. Tali soluzioni sono state analizzate al giorno 0 (alla preparazione), al giorno 2 e al giorno 6, alle concentrazioni di 20, 10, 5 e 2.5 ng/ml.

Con lo scopo di migliorare le caratteristiche del saggio immunoenzimatico, esso è stato condotto anche applicando alcune variazioni rispetto al procedimento precedentemente descritto, riportate di seguito:

- 1- Utilizzo nella fase iniziale di “coating” di una maggiore quantità (2 µg/pozzetto) di anticorpo monoclonale per pozzetto per saturare meglio i siti di legame sulla piastra.
- 2- Presenza di ovalbumina 1 mg/ml nella soluzione della tossina, per stabilizzarne la struttura e facilitarne il mantenimento in soluzione.
- 3- Utilizzo come tampone di PBS con Tween 20 allo 0.1 % (dove specificato con latte al 2 %) in tutti i passaggi anziché solo PBS per aumentare la parte specifica del segnale e sfavorire i legami aspecifici.
- 4- Estensione dei tempi di incubazione a 1 ora per il “blocking”, 2 ore per la tossina, 2 ore per l'anticorpo policlonale di riconoscimento, 1 ora per l'anticorpo secondario per assicurarsi che tutte le interazioni degli anticorpi coi vari antigeni raggiungano il plateau.

5- Estensione del tempo di sviluppo con TMB a 30 min per ridurre la variabilità nella rilevazione che si può avere per motivi logistici con una incubazione breve di 5 min e per aumentare la sensibilità del test a basse concentrazioni di tossina.

6- Utilizzo per il riconoscimento degli anticorpi policlonali purificati per affinità dal siero di coniglio su colonna funzionalizzata con palitossina (estratta da *P. tuberculosis*), in modo da poter utilizzare un reattivo di migliore qualità e con minori interferenti.

3.4 Messa a punto di un metodo funzionale per il rilevamento delle palitossine: saggio emolitico

Il saggio emolitico per il rilevamento delle palitossine è stato messo a punto impiegando sangue murino, secondo le operazioni riportate di seguito:

1) Prelievo del sangue. Se non diversamente indicato sono stati utilizzati topi CD-1 femmine (Harlan Laboratories; San Pietro al Natisone, Italia), stabulati come descritto nella sezione 3.1. Il prelievo è stato effettuato dalla vena facciale raccogliendo il sangue in provette contenenti sodio citrato come anticoagulante (1 volume di sodio citrato 129 mM per 9 volumi di sangue);

2) Diluizione del sangue 1:10 in tampone di lavoro (PBS pH 7.4, contenente CaCl_2 1 mM e H_3BO_3 1 mM);

3) Centrifugazione a 300 g per 5 min a 4°C, rimozione del surnatante ed aggiunta di un ugual volume di tampone di lavoro;

4) Lavaggio del punto 3 ripetuto per altre due volte;

5) Diluizione intermedia di 2.5 volte (1 volume di sangue 1:10 con 1.5 volumi di tampone di lavoro, per ottenere sangue 1:25);

6) Conteggio delle cellule in camera di Burker (su una ulteriore diluizione di 40 volte) e diluizione alla sospensione di lavoro di 7.5×10^7 cellule/ml (se non diversamente indicato);

7) Preparazione delle diluizioni seriali di tossina in tampone di lavoro in una piastra a 96 pozzetti a fondo tondo (volume finale nel pozzetto: 100 μl);

- 8) Utilizzo come controllo positivo (C+) di 3 pozzetti con 100 μ l di tampone di lavoro contenenti 0.1 % di Tween 20;
- 9) Utilizzo come controllo negativo (C-) di 3 pozzetti con 100 μ l di tampone di lavoro;
- 10) Aggiunta ai pozzetti contenenti la tossina e ai controlli di 100 μ l della sospensione di lavoro di eritrociti (volume finale nel pozzetto: 200 μ l, con 3.75×10^7 cellule/ml);
- 11) Incubazione della piastra a 37°C per 4 ore;
- 12) Centrifugazione della piastra a 300 g per 5 min a 4°C per separare il pellet cellulare non lisato;
- 13) Prelievo di 150 μ l di surnatante da ciascun pozzetto e trasferimento in una nuova piastra a 96 pozzetti a fondo piatto;
- 14) Misurazione dell'assorbanza dell'emoglobina rilasciata a 405 nm;
- 15) La lisi percentuale è espressa in rapporto ai controlli come $lisi\% = 100 \times \frac{Abs_{Campione} - Abs_{C-}}{Abs_{C+} - Abs_{C-}}$

Il test è stato condotto utilizzando la palitossina acquistata presso la Wako Pure Chemical Industries Ltd (Osaka, Giappone), da cui è ricavata una soluzione madre 10 μ M in etanolo acquoso 50 % e successivamente una diluizione di lavoro (WS) 250 nM in etanolo acquoso 50 %, entrambe conservate a -20°C. Dalla WS, per diluizione 1:20 in tampone di lavoro, è stata preparata la soluzione di calibrazione (CS) 12.5 nM da cui sono state ottenute le diluizioni finali in piastra del punto (7); tale soluzione è stata preparata sempre immediatamente prima di ogni esperimento e non riutilizzata il giorno successivo.

Per verificare la specificità dell'emolisi indotta dalle palitossine, passaggio necessario nell'analisi di campioni naturali, il saggio è stato condotto anche aggiungendo ai pozzetti gli anticorpi monoclonale e policlonale anti-PLTX utilizzati per il saggio immunoenzimatico (vedi sezione 3.3). A tale scopo il punto (6) della procedura generale è stato modificato aggiungendo alla sospensione di eritrociti, durante la diluizione a 7.5×10^7 cellule/ml, gli anticorpi monoclonali o policlonali anti-

PLTX alla concentrazione di 50 µg/ml (finali in piastra: 25 µg/ml). Gli anticorpi, legando la palitossina, ne impediscono il legame al recettore pervenendo gli effetti biologici ed evidenziando la componente specifica della lisi.

Il saggio è stato impiegato anche per valutare l'attività emolitica di due analoghi della palitossina disponibili in quantità rilevanti: 42-OH-PLTX e ostreocina-D. Il test è stato condotto come sopra indicato impiegando delle concentrazioni di tossine comprese tra 2500 pM e 0.00128 pM. Al fine di confermare la specificità dell'emolisi da palitossine, è stata condotta in parallelo una inibizione con gli anticorpi anti-PLTX.

Il saggio è stato condotto anche impiegando eritrociti ovini ed umani. Il sangue umano è stato fornito dall'azienda ospedaliera "Ospedali Riuniti" di Trieste come "buffy coat" e conservato a 4°C per 3-4 giorni. Il sangue di pecora è stato fornito dall'Azienda Sperimentale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Udine. Esso è stato diluito in soluzione di Alsever 1:1 (v/v), in provette eparinizzate sterili, e conservato a 4°C fino a 6 settimane. Poiché gli eritrociti ovini ed umani hanno un diverso contenuto in emoglobina rispetto a quelli murini, è stato necessario preparare una sospensione di eritrociti (punto 6) pari a 0.5×10^6 cellule/ml per il sangue umano e in 1.5×10^8 cellule/ml per il sangue di pecora (concentrazioni finali pari a rispettivamente 0.25×10^6 e 0.75×10^8 cellule/ml).

Successivamente, il saggio è stato condotto utilizzando un tampone di lavoro contenente i seguenti cofattori: CaCl₂ (da 0 a 5 mM) o acido bórico (da 0 a 15 mM) o tetraborato di sodio (da 0 a 15 mM). Le diluizioni di ognuno di questi tre cofattori sono state realizzate in 100 µl di PBS in piastra a 96 pozzetti a fondo tondo, in due serie. Ad una serie sono stati aggiunti 50 µl di palitossina alla concentrazione di 40 pM in PBS (per questo esperimento la soluzione CS di tossina 12.5 nM è preparata in solo PBS, senza calcio cloruro o acido bórico) e all'altra serie sono aggiunti 50 µl di

PBS, per poter valutare quanto la lisi indotta da palitossina sia aumentata dalla presenza del cofattore. A pozzetti dei controlli negativi (C-) sono stati aggiunti 150 μ l di PBS, mentre ai pozzetti dei controlli positivi (C+) sono stati aggiunti 150 μ l di PBS allo 0.1 % di Tween 20. Alle diluizioni di cofattori, con o senza tossina, e ai controlli sono stati aggiunti 50 μ l di sospensione di eritrociti; la sospensione di lavoro del punto (6) del protocollo generale è stata preparata in PBS senza calcio cloruro o acido borico ad una concentrazione di 1.5×10^8 cellule/ml. La concentrazione della tossina, dove presente, è di 10 pM finali. L'incubazione della piastra e la misurazione dell'assorbanza sono state condotte come riportato precedentemente.

Poiché la palitossina sembra indurre l'emolisi riducendo la resistenza degli eritrociti allo stress osmotico, è stata verificata l'influenza dell'osmolarità del tampone di lavoro nei confronti dell'attività emolitica della palitossina. In un esperimento preliminare sono state preparate diluizioni di PBS a diversa osmolarità in acqua distillata (dal 70 % al 40 % di PBS finali; volume: 100 μ l), alle quali sono stati aggiunti 100 μ l di sospensione di eritrociti murini (7.5×10^7 cellule/ml). La piastra è stata incubata per 1 ora a 37°C per poi misurare la lisi eritrocitaria, come descritto in precedenza, e determinare la minima percentuale di PBS necessaria per mantenere integri gli eritrociti (lisi % = 0) dopo 1 ora di incubazione. Nelle condizioni sperimentali così determinate, è stata successivamente misurata l'attività emolitica di diluizioni seriali di palitossina, preparate nel tampone di lavoro diluito, e la sua inibizione da parte dell'anticorpo monoclonale e degli anticorpi policlonali anti-PLTX.

3.5 Studio eco-tossicologico sulle microalghe produttrici di palitossine nel Golfo di Trieste

Campionamento. Campioni di acqua marina e di ciottoli ricoperti di un materiale mucillaginoso sono stati raccolti il 28 settembre 2009 in località Canovella de' Zoppoli (Golfo di Trieste), in concomitanza ad una proliferazione di cellule del genere *Ostreopsis* in tale località. In particolare, sono stati raccolti due campioni, uno di acqua di superficie a 10 m dalla costa (Canovella 1) e l'altro

di acqua in prossimità dei ciottoli (Canovella 2). I campioni per l'identificazione tassonomica sono fissati in soluzione di Lugol all'1 % e glutaraldeide al 2.5 %. L'osservazione microscopica e la caratterizzazione della popolazione cellulare è stata effettuata dal Prof. G. Honsell dell'Università di Udine tramite microscopio invertito in luce trasmessa a contrasto di fase (Leitz Diavert; Leica, Wetzlar, Germania). La conta cellulare è effettuata con il metodo di Utermöhl (1958).

Analisi immunoistochimica. Campioni di cellule di *Ostreopsis* sono stati sottoposti ad analisi immunocitochimica, impiegando gli anticorpi monoclonale e policlonale anti-PLTX, al fine di individuare la presenza di palitossine nelle cellule. Parallelamente, sono state analizzate cellule in coltura di *Coolia monotis* quale specie di dinoflagellati non produttrice di PLTX. In particolare, sono state eseguite le seguenti operazioni:

1. Aliquote di sospensioni cellulari sono state centrifugate a 300 g per 5 min a temperatura ambiente fino ad ottenere un pellet visibile.
2. I campioni sono stati fissati in paraformaldeide al 2 % in PBS per 24 ore e sezioni di 10 μm sono state ottenute al criostato (Leica; Wetzlar, Germania) e depositate su vetrini rivestiti di poliornitina (Sigma-Aldrich; Milano, Italia).
3. Le sezioni sono state disidratate per una notte a temperatura ambiente.
4. I siti aspecifici sono stati bloccati mediante l'aggiunta di siero di capra al 10 % in tampone TBB (50 mM Tris-HCl pH 7.5, contenente 150 M sodio cloruro, 2 % BSA) per 30 min a temperatura ambiente.
5. I campioni sono stati incubati con l'anticorpo monoclonale (10 $\mu\text{g/ml}$) o con l'anticorpo policlonale (diluizione 1:2000 del siero immune) anti-PLTX per una notte a 4°C. Siero preimmune di coniglio (diluito 1:2000) e anticorpi secondari sono stati usati come controllo negativo. Gli anticorpi sono stati diluiti in TBB.
6. I campioni sono stati lavati per quattro volte in tampone TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, contenente sodio cloruro 150 mM)

7. I campioni sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari (rispettivamente anti-IgG di topo e anti-IgG di coniglio per il monoclonale e per il policlonale, coniugati con il fluorocromo Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, Milano, Italia) diluiti 1:200 in TBB.
8. I campioni sono stati sottoposti a lavaggio per quattro volte mediante tampone TBS.
9. I nuclei delle cellule sono stati colorati con Hoechst 33258 (10 µg/ml in PBS; Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per 5 min a temperatura ambiente.
10. I campioni sono stati lavati con PBS e con acqua milliQ una volta.
11. I campioni sono stati trattati con il montante Mowiol 488 (Sigma-Aldrich; Milano, Italia) ed osservati in doppio cieco al microscopio a fluorescenza Nikon E800 (Nikon Instruments Europe B.V., Kingston, Regno Unito). Sono stati usati due set di filtri per il segnale di Hoechst 33258 (filtro di eccitazione: 340-380 nm, filtro di barriera: 435-485 nm) e per il segnale di Alexa Fluor® 488 (filtro di eccitazione: 460-500 nm, filtro di barriera: 510-560 nm).

Coltura di cellule di Ostreopsis. Campioni di cellule di *Ostreopsis ovata* sono stati posti in coltura presso il laboratorio della Prof.ssa Penna dell'Università di Urbino. Le colture sono state mantenute in bottiglie di vetro da 1 litro contenenti 600 ml di medium f/4 sterile (soluzione di Guillard; Sigma-Aldrich, Milano, Italia) a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con illuminazione a fluorescenza (flusso di $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperiodo di 14:10 ore luce:buio. Subcampioni della coltura in fase di crescita esponenziale (giorno 10 dall'avvio della coltura), stazionaria (giorno 18) e senescente (giorno 25) sono stati recuperati mediante centrifugazione a 4000 g per 15 min e sottoposti ad analisi in spettroscopia Raman e LC-MS ad alta risoluzione (HR LC-MS).

Analisi mediante spettroscopia Raman. Per le analisi mediante spettroscopia Raman, i campioni di microalghe in coltura sono stati fissati in paraformaldeide al 2 % in mezzo di coltura e

centrifugati a 300 g per 5 min a temperatura ambiente. Il pellet cellulare è stato quindi risospeso in circa 100 μ l di acqua marina artificiale, controllando al microscopio la densità cellulare. Un'aliquota delle cellule è stata lavata tre volte con 100 μ l di miscela acetone:esano 1:1 (5 min a 4°C, seguiti da centrifugazione 5 min a 300 g) per rimuovere i pigmenti che possono interferire con l'acquisizione dello spettro Raman e risospese in acqua marina artificiale. E' stato quindi acquisito lo spettro sia delle cellule depigmentate che di quelle non depigmentate. Aliquote da 20 μ l delle preparazioni cellulari sono state depositare su vetrini di fluorite rivestiti di poliornitina e le cellule sono state lasciate aderire per 1 ora. Le osservazioni Raman sono state condotte con l'obiettivo in immersione in acqua marina artificiale; spettri e immagini sono stati realizzati tramite inVia Raman system (Renishaw, Wotton-under-Edge; Gloucestershire, Regno Unito).

Parallelamente, è stato rilevato lo spettro Raman di un campione di palitossina di origine commerciale (Wako Pure Chemicals Ltd; Okaka, Giappone). Analogamente è stato rilevato lo spettro Raman del carotenoide peridinina (formula di struttura in Figura 9), pigmento tipico dei dinoflagellati, ottenuto da un campione fornitoci dal Prof. Yasumoto dei Japan Food Research Laboratories, Tokyo (Giappone).

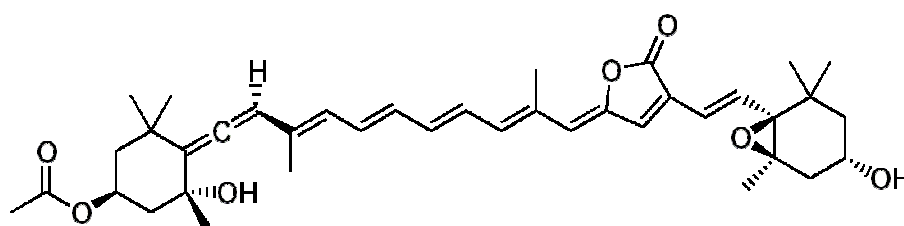


Figura 9. Formula di struttura del carotenoide peridinina.

Analisi mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa, ad alta risoluzione (HR LC-MS). I pellet ottenuti dopo la centrifugazione delle cellule di *Ostreopsis* in coltura (nelle diverse fasi di crescita), contenenti circa 3.0×10^6 cellule, sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi mediante HR LC-MS, volta a determinare il contenuto in palitossine. L'analisi è stata condotta presso il laboratorio del gruppo del Prof. Fattorusso dell'Università di

Napoli “Federico II” Il pellet cellulare è stato sottoposto ad estrazione mediante trattamento con ultrasuoni (30 min per 3 volte, in ghiaccio) in metanolo acquoso al 50 %. Dopo ogni estrazione, i residui cellulari sono stati separati mediante centrifugazione a 6500 rivoluzioni al minuto per 10 minuti, recuperando il surnatante. I surnatanti riuniti sono stati analizzati direttamente mediante HR LC-MS (sistema binario Agilent 1100 LC accoppiato ad una trappola ionica LTQ Orbitrap XLTM equipaggiata con ESI ION MAXTM) utilizzando la palitossina di origine commerciale (Wako Pure Chemicals Ltd, Osaka, Giappone) come standard.

Analogamente, i campioni delle popolazioni naturali di *Ostreopsis* raccolti nei due siti di campionamento Canovella 1 e Canovella 2 sono estratti ed analizzati seguendo il procedimento precedentemente descritto.

4 RISULTATI

4.1 Tossicità acuta dopo somministrazione orale della PLTX

4.1.1 Mortalità osservata e sintomi registrati

In seguito ad una singola somministrazione orale di palitossina è stata osservata mortalità nel topo a partire dalla dose di 600 µg/kg, con una letalità del 100 % alla dose di 1697 µg/kg. In Tabella 4 è riportata la mortalità per ogni dose di tossina somministrata e il tempo di sopravvivenza dei topi deceduti. La DL₅₀ calcolata risulta di 767 µg/kg (limiti di confidenza 95 % tra 549 µg/kg e 1039 µg/kg).

Tabella 4. Mortalità da palitossina entro 24 h dalla somministrazione acuta per via orale nel topo.

Dose (µg/kg)	Mortalità (deceduti / totali)	Tempo di sopravvivenza (h:min dalla somministrazione)
0	0 / 5	–
300	0 / 5	–
424	0 / 5	–
600	2 / 5	1:30 – 9:54
848	3 / 5	5:56 – 8:36 – 11:34
1200	4 / 5	1:24 – 3:56 – 4:00 – 6:24
1697	5 / 5	0:40 – 2:16 – 2:37 – 4:46 – 9:02

I sintomi osservati negli animali trattati con la tossina comprendono spasmi (86 % degli animali deceduti in seguito al trattamento), paralisi (80 %), difficoltà respiratorie (70 %), “jumping” (50 %), “screeching” (57 %). Gli animali sopravvissuti al trattamento non hanno mostrato sintomi di

tossicità, a parte episodi di “scretching” registrati anche alle dosi più basse, in cui non si è avuta letalità.

4.1.2 *Alterazioni ematocliniche*

I topi trattati con PLTX hanno mostrato un aumento, rispetto ai controlli, dei livelli plasmatici di creatina fosfochinasi (CPK), lattato deidrogenasi (LDH) a partire dalla dose di 600 µg/kg e aspartato aminotransferasi (AST) dalla dose di 848 µg/kg. L'aumento maggiore si è avuto per la CPK, che ha raggiunto il 710 %, seguito dalla LDH (247 %) e dalla AST (188 %). Per la alanina aminotransferasi (ALT) si è avuto un aumento significativo (del 105 %) solo alla dose di 848 µg/kg. I livelli di creatinina, invece, non hanno subito alterazioni, indicando un ridotto coinvolgimento dei reni. I risultati relativi ai parametri misurati sono riportati in Tabella 5. Rispetto agli animali di controllo, non si sono invece rilevate alterazioni significative nella formula leucocitaria (Tabella 6).

4.1.3 *Alterazioni all'analisi necroscopica, istologica ed ultrastrutturale*

All'analisi autoptica si sono osservati degli arrossamenti a livello della parete dello stomaco non ghiandolare in 7 dei 10 topi deceduti in seguito al trattamento con la tossina.

Gli organi in cui si sono osservate alterazioni istologiche sono stomaco, fegato, pancreas e reni. Alterazioni istologiche sono state riscontrate sia negli animali morti entro 24 ore dalla somministrazione della tossina che in quelli sopravvissuti fino a 24 ore.

La quasi totalità degli animali morti entro le 24 ore ha mostrato una ridotta quantità di glicogeno epatocellulare ed una diminuzione del materiale secretorio negli acini ghiandolari pancreatici (Figura 10c-10d). La riduzione del glicogeno epatocellulare è stata osservata a partire dalla dose di 600 µg/kg. Inoltre, una minima o leggera vacuolizzazione epatocellulare è stata osservata in 5 su 5 animali trattati con 1200 µg/kg e in 1 su 5 trattati con 1697 µg/kg di palitossina (Figura 10a-10b). A

livello renale, è stata riscontrata una dilatazione tubolare di minima o lieve entità in 1 su 5 animali trattati con 1200 µg/kg e in 2 su 5 animali trattati con 1697 µg/kg di tossina (Figura 10e-10f).

Tabella 5. Parametri ematoclinici nei topi trattati con palitossina.

Dose (µg/kg)	LDH (UI/l)	AST (UI/l)	ALT (UI/l)	CPK (UI/l)	Creatinina (mg/dl)
0	1188.2±107.1	90.6±6.8	44.4±8.8	575.6±105.7	0.3±0.1
300	1507.6±72.3* (+27%)	85.4±5.6 (-6%)	33.6±1.8 (-24%)	550.6±55.2 (-4%)	0.3±0.1 (0%)
424	1090.2±161.3 (+8%)	94.8±16.3 (+5%)	62.8±17.3 (+41%)	640.4±142.4 (+11%)	0.5±0.1 (+67%)
600	2985.2±684.7* (+151%)	168.6±36.3 (+86%)	40.8±6.7 (-8%)	2751.8±730.5* (+378%)	0.3±0.1 (0%)
848	3816.8±195.0* (+221%)	260.8±39.8* (+188%)	90.8±6.4* (+105%)	4659.8±441.7* (+710%)	0.5±0.1 (+67%)
1200	4124.4±321.1* (+247%)	216.3±29.7* (+139%)	52.3±5.9 (+18%)	4654.5±195.6* (+709%)	0.3±0.1 (0%)
1697	2798.3±571.0* (+136%)	182.8±11.0* (+102%)	47.5±4.4 (+7%)	3864.3±396.4* (+571%)	0.4±0.1 (+33%)

Sono riportate le medie ± errore standard dei risultati ottenuti su 5 animali, in parentesi l'incremento percentuale rispetto ai controlli. (*) differenza statisticamente significativa rispetto ai controlli ($p < 0.05$) al test "t" di Student.

Tabella 6. Formula leucocitaria nei topi trattati con palitossina.

Dose (µg/kg)	Neutrofili (%)	Linfociti (%)	Monociti (%)	Eosinofili (%)	Basofili (%)
0	19.8±1.4	79.4±1.9	0.6±0.2	0.4±0.2	0.0±0.0
300	28.4±6.9	70.4±7.2	0.6±0.2	0.4±0.2	0.2±0.2
424	16.4±1.4	82.6±1.5	0.6±0.2	0.4±0.2	0.0±0.0
600	16.8±1.2	82.0±0.7	0.4±0.2	0.8±0.4	0.0±0.0
848	29.0±7.2	70.0±7.5	0.8±0.3	0.3±0.3	0.0±0.0
1200	18.2±1.2	80.4±1.6	0.8±0.2	0.6±0.2	0.0±0.0
1697	22.8±7.8	75.8±8.0	0.8±0.3	0.5±0.3	0.3±0.3

Sono riportate le medie ± errore standard dei risultati ottenuti su 5 animali.

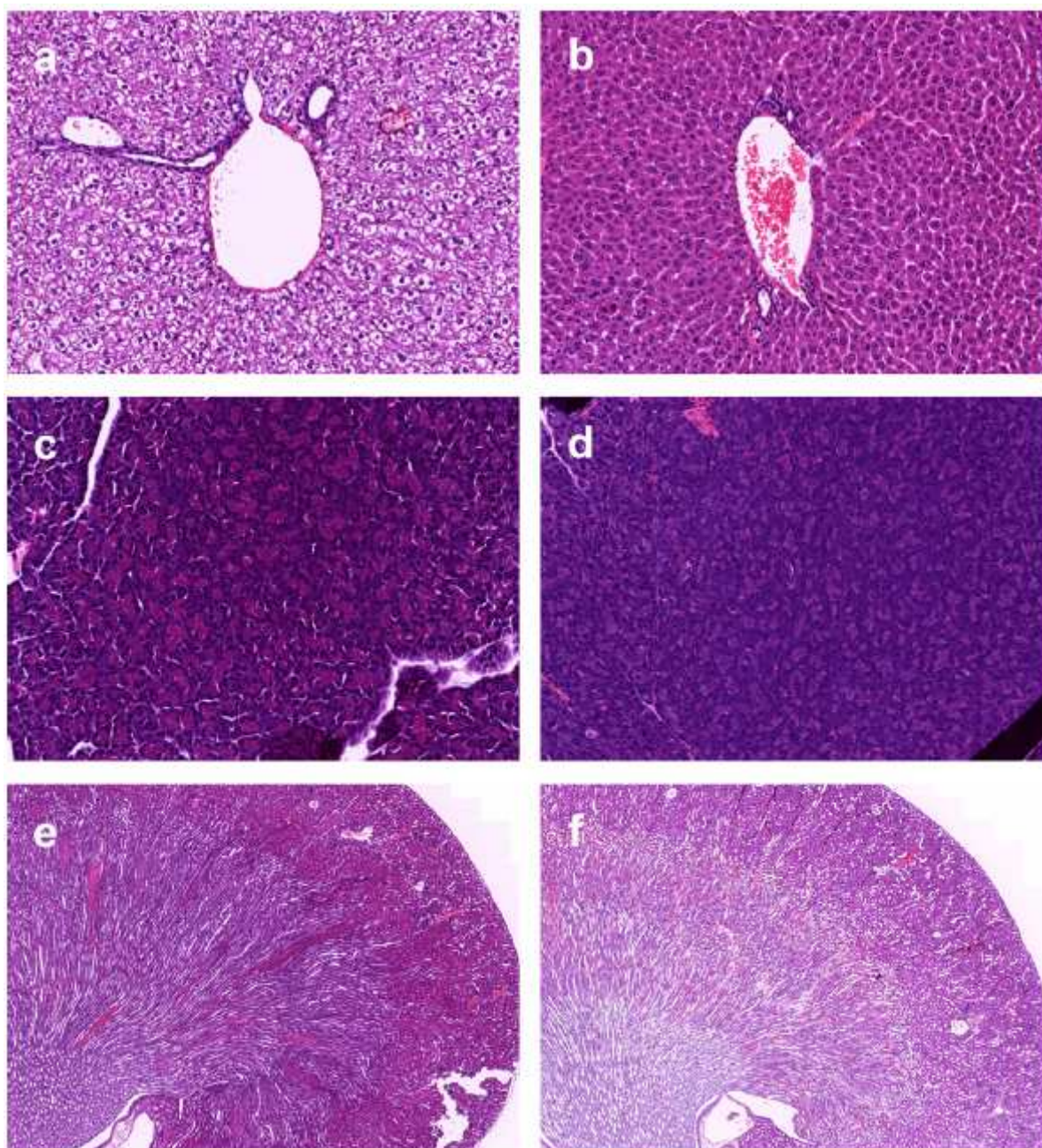


Figura 10. Immagini al microscopio ottico di fegato, pancreas e reni di topi morti dopo trattamento con palitossia per via orale. Colorazione con ematossilina-eosina. (a)-(b): fegato 20×, (c)-(d): pancreas 20×, (e)-(f): reni 5×. (a)-(c)-(e): animali di controllo, (b)-(d): animali trattati con 1200 µg/kg di PLTX, (f): animale trattato con 1697 µg/kg di PLTX.

Negli animali sopravvissuti per 24 ore dopo la somministrazione, le principali alterazioni evidenziate dall'analisi istologica comprendevano una infiammazione acuta di minima o moderata entità nello stomaco non ghiandolare (mucosa, sottomucosa e tonaca muscolare), a partire dalla dose di 424 µg/kg (Figura 11). Nell'unico animale trattato con 1200 µg/kg e sopravvissuto alle 24

ore, è stata osservata una vacuolizzazione epatocellulare a livello del fegato e calcificazioni tubolari a livello dei reni.

Il muscolo scheletrico e quello cardiaco sono stati sottoposti ad analisi ultrastrutturale mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Alla microscopia elettronica si sono rilevate alterazioni al muscolo scheletrico, quali degenerazione fibrillare e aggregati di mitocondri tondeggianti (Figura 12), con incidenza dose-dipendente. Il tessuto cardiaco ha mostrato alterazioni simili, dose-dipendenti, a livello dei mitocondri (aggregati di organuli tondeggianti) e delle strutture fibrillari (rarefazione) (Figura 13).

4.1.4 Implicazioni di sicurezza alimentare

Sulla base dei dati di letalità e delle rilevazioni sintomatologiche, ematocliniche e istologiche fin qui esposte può essere stimata una NOEL (massima dose a cui non si registrano effetti) per la somministrazione orale acuta di palitossina nel topo di 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

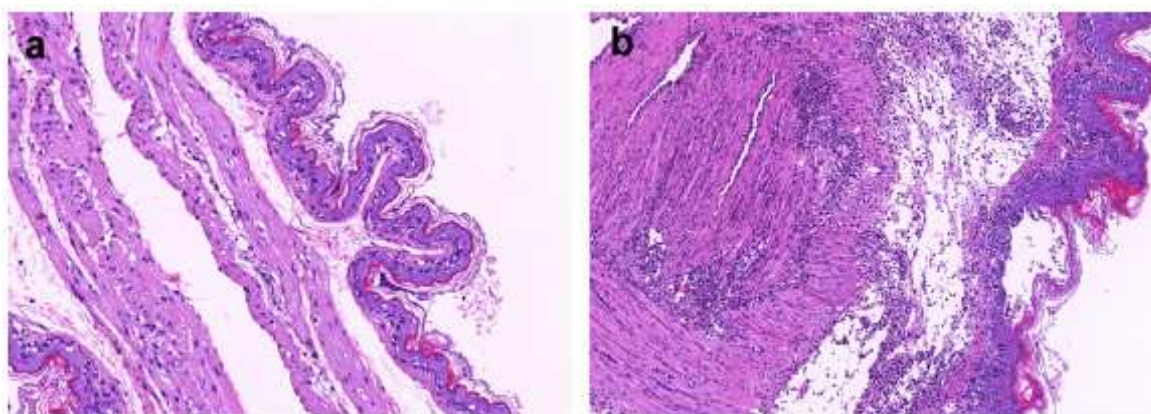


Figura 11. Immagini al microscopio ottico di sezioni di stomaco non ghiandolare (20 \times) di topi sopravvissuti alle 24 ore dopo somministrazione orale di palitossina. Colorazione con ematossilina-eosina. (a): controllo, (b): animale trattato con 424 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di PLTX.

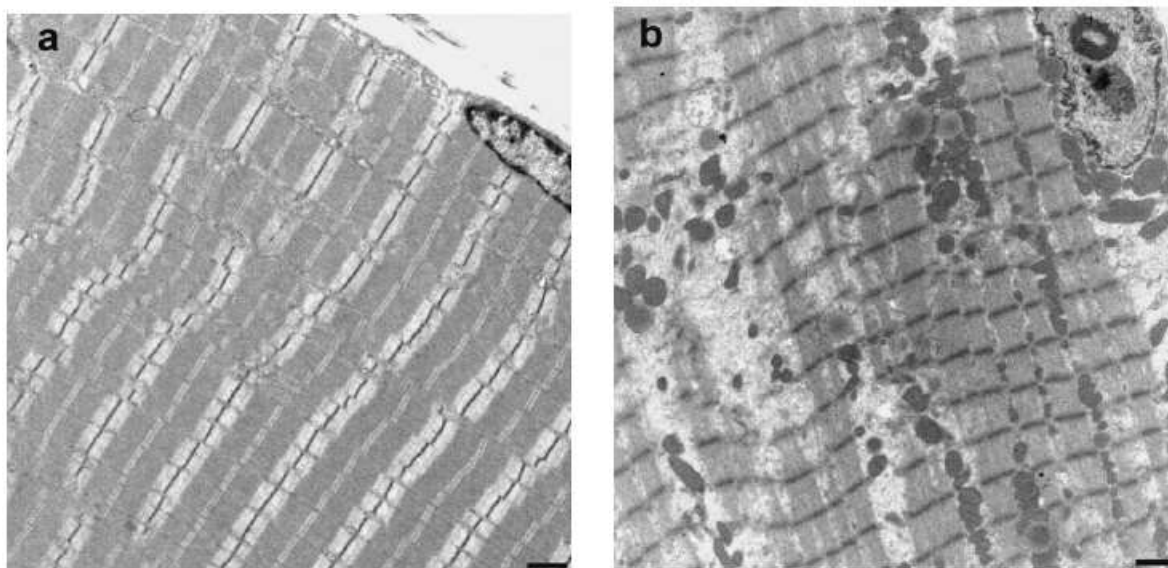


Figura 12. Immagini al microscopio elettronico di muscolo scheletrico. (a) controllo, (b) animale trattato con 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di PLTX. La barra indica 1 μm .

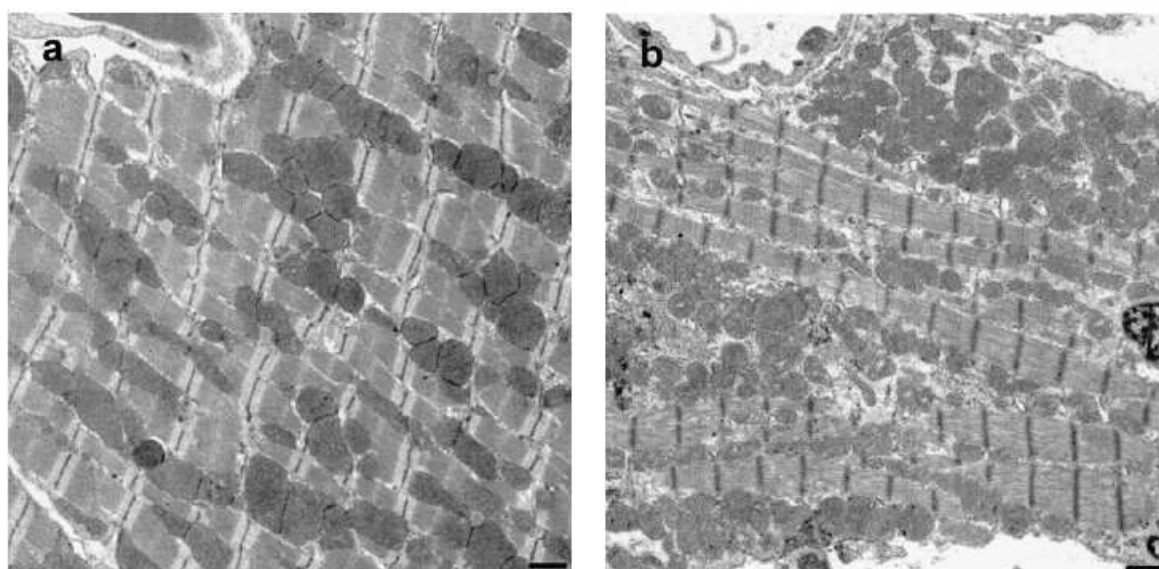


Figura 13. Immagini al microscopio elettronico di muscolo cardiaco. (a) controllo, (b) animale trattato con 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di PLTX. La barra indica 1 μm .

4.2 Caratterizzazione della 42-idrossi-palitossina

4.2.1 Scoperta e caratterizzazione strutturale del nuovo analogo della palitossina

Durante l'attività di ricerca si sono utilizzati due campioni non commerciali di palitossina forniti dall'U.S. AMRIID (U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases) ed estratti da *P. tuberculosa* e da *P. toxica*. La caratterizzazione di questi due campioni mediante LC-MS, effettuata

dal gruppo del Prof. Fattorusso dell'Università "Federico II" di Napoli, ha indicato la presenza di due tossine analoghe: la palitossina e un suo idrossi-derivato, finora mai descritto in letteratura. La posizione del gruppo OH è stata determinata in C42 tramite caratterizzazione NMR; permane tuttavia una incertezza sulla stereochimica nella posizione C41 dell'analogo. Il campione estratto da *P. tuberculosa* è risultato composto per il 51 % da 42-OH-PLTX e per il 49 % da PLTX, mentre il campione di *P. toxica* è risultato essere costituito per il 91 % da 42-OH-PLTX. Considerato che anche la palitossina commerciale (Wako Pure Chemical Industries Ltd; Osaka, Giappone) viene venduta con una purezza dichiarata > 90 % senza ulteriori dettagli, l'estratto di *P. toxica* è stato considerato ad alto livello di purezza in 42-OH-PLTX ed utilizzato per le successive caratterizzazioni del composto.

4.2.2 Tossicità acuta per via della 42-idrossi-palitossina nel topo

Al fine di confrontare la tossicità del nuovo analogo con quella della PLTX, è stata valutata la tossicità acuta per via orale della 42-OH-PLTX nel topo. La mortalità osservata, e riportata in Tabella 7, rispecchia la potenza osservata per il composto nativo, anche se è stata riscontrata mortalità a partire dalla dose più bassa somministrata (300 µg/kg). La DL₅₀ della 42-OH-PLTX è risultata pari a 651 µg/kg (limiti di confidenza 95 % tra 384 e 1018 µg/kg), ed i sintomi registrati sono analoghi a quelli osservati per la palitossina, con paralisi degli arti posteriori (80 %), "jumping" (70 %), "screatching" (40 % degli animali morti nelle 24 ore), difficoltà respiratorie e cianosi (30 %). Gli animali sopravvissuti al trattamento hanno mostrato solo episodi di "screatching" (40 %).

L'analisi dei parametri ematoclinici ha rilevato, in analogia col composto nativo, un aumento statisticamente significativo ($p < 0.05$) nei livelli plasmatici di LDH, AST (dalla dose di 600 µg/kg), ALT e CPK (dalla dose di 848 µg/kg). In questo esperimento abbiamo incluso l'analisi dei livelli ematici di potassio, considerata la capacità della palitossina di indurre una rapida perdita di potassio

dalle cellule. La kaliemia è risultata significativamente più alta dei controlli a partire dalla dose di 848 µg/kg, come riportato in Tabella 8.

Tabella 7. Mortalità da 42-idrossi-palitossina entro 24 h dalla somministrazione acuta per via orale nel topo.

Dose (µg/kg)	Mortalità (deceduti / totali)	Tempo di sopravvivenza (h:min dalla somministrazione)
0	0 / 5	--
300	1 / 5	2:44
424	1 / 5	1:35
600	3 / 5	0:52 - 1:26 - 2:34
848	2 / 5	2:14 - 2:27
1200	4 / 5	0:52 - 1:25 - 3:08 - 5:32
1697	5 / 5	0:47 - 1:02 - 2:01 - 7:43 - 8:02

Tabella 8. Valori della kaliemia riscontrati nei topi trattati con 42-idrossi-palitossina.

Dose (µg/kg)	K ⁺ (mEq/l)
0	6.1 ± 0.1
300	6.5 ± 0.2 (+7 %)
424	6.5 ± 0.4 (+7 %)
600	6.5 ± 0.2 (+7 %)
848	7.4 ± 0.3 (+21 %)*
1200	7.0 ± 0.3 (+15 %)*
1697	12.0 ± 0.9 (+97 %)*

Sono riportate le medie ± errore standard dei risultati ottenuti su 5 animali, in parentesi l'incremento percentuale rispetto ai controlli. (*) differenza statisticamente significativa rispetto ai controlli ($p < 0.05$) al test "t" di Student

4.2.3 "Binding" della 42-OH-PLTX e della PLTX alla Na⁺/K⁺-ATPasi

Palitossina e 42-idrossi-palitossina hanno mostrato un'identica capacità di spiazzare la [³H]ouabaina (5 nM) dalla Na⁺/K⁺-ATPasi (NAKA) usata alla concentrazione di 40 µg/ml, con delle IC₅₀ di 29.4 ± 3.1 nM (PLTX) e 28.2 ± 7.0 nM (42-OH-PLTX). La ouabaina ha mostrato una affinità per il sito di legame sulla NAKA leggermente maggiore rispetto alle due tossine, riuscendo

a spiazzare la sua controparte radiomarcata con una IC_{50} di 9.0 ± 0.9 nM. Lo spiazzamento concentrazione-dipendente è riportato in Figura 14.

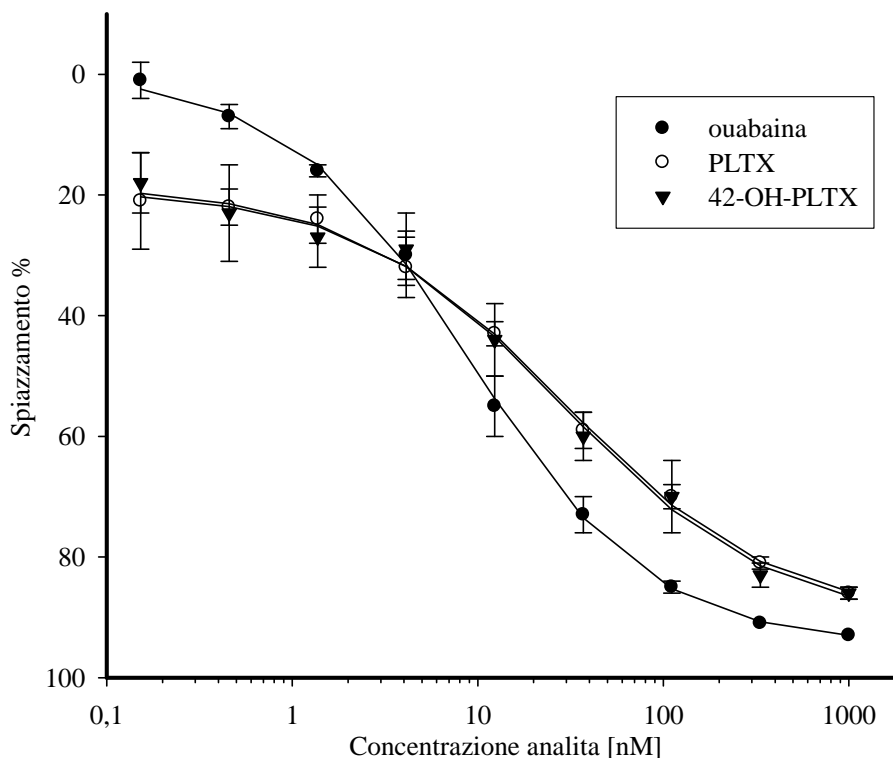


Figura 14. Spiazzamento della [3H]ouabaina (5 nM) indotto da PLTX e 42-OH-PLTX sulla Na^+/K^+ -ATPasi (40 μ g/ml) dopo incubazione di 4 ore a 37°C (media \pm errore standard di 3 esperimenti).

4.2.4 Attività emolitica della 42-OH-PLTX e della PLTX

Nel saggio emolitico, la 42-OH-PLTX è stata in grado di indurre la lisi eritrocitaria in maniera concentrazione-dipendente, paragonabile a quella indotta dalla PLTX (come indicato in § 4.4.1), con valori di EC_{50} rispettivamente di 7.6 ± 0.5 e 13.2 ± 0.1 pM. L'attività emolitica di entrambe le tossine è stata inibita da anticorpi anti-PLTX, come risulta dal grafico in Figura 15. In presenza di anticorpo monoclonale anti-PLTX (73D3) a 25 μ g/ml si ha una calo delle EC_{50} di oltre un ordine di grandezza.

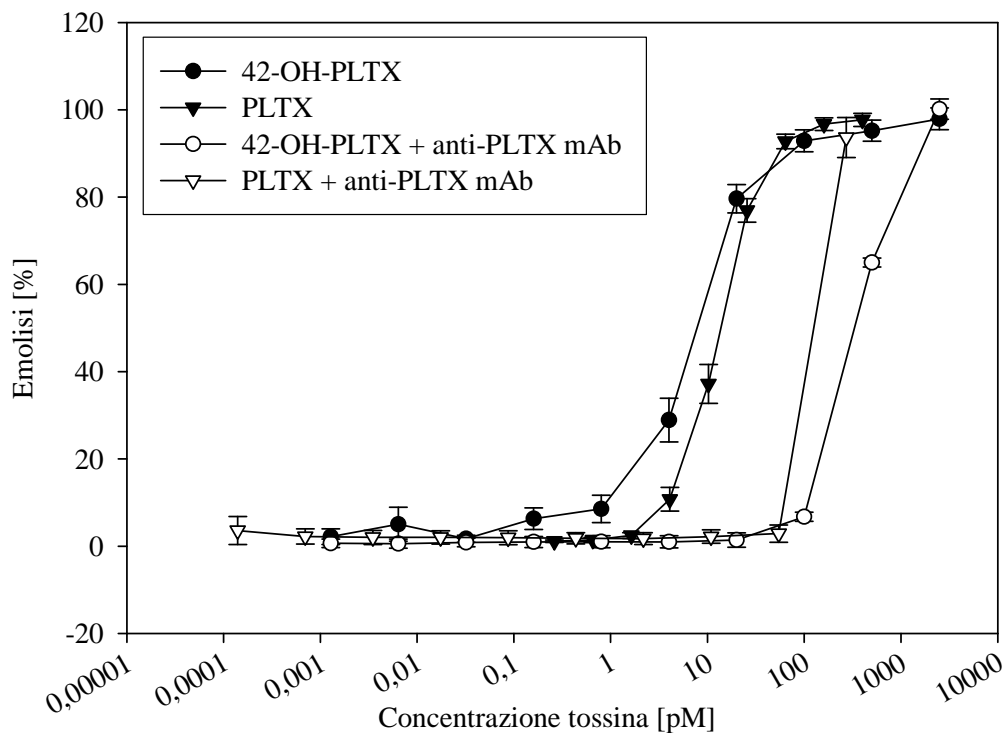


Figura 15. Emolisi indotta da 42-OH-PLTX e PLTX ed inibizione da parte dell'anticorpo monoclonale anti-PLTX (73D3) a 25 µg/ml (media ± errore standard di 3 esperimenti).

4.3 Test ELISA

4.3.1 Curva concentrazione-risposta iniziale

Il test immunoenzimatico, messo a punto impiegando la palitossina commerciale (Wako Pure Chemical Industries Ltd; Osaka, Giappone) secondo la procedura sperimentale inizialmente sviluppata, ha mostrato la risposta concentrazione-dipendente, riportata in Figura 16, dando una prima idea delle “performance” del saggio ($EC_{50} = 9.4$ ng/ml). Il range di linearità di risposta è considerato tra 2.5 e 40 ng/ml (corrispondente a 1-15 nM).

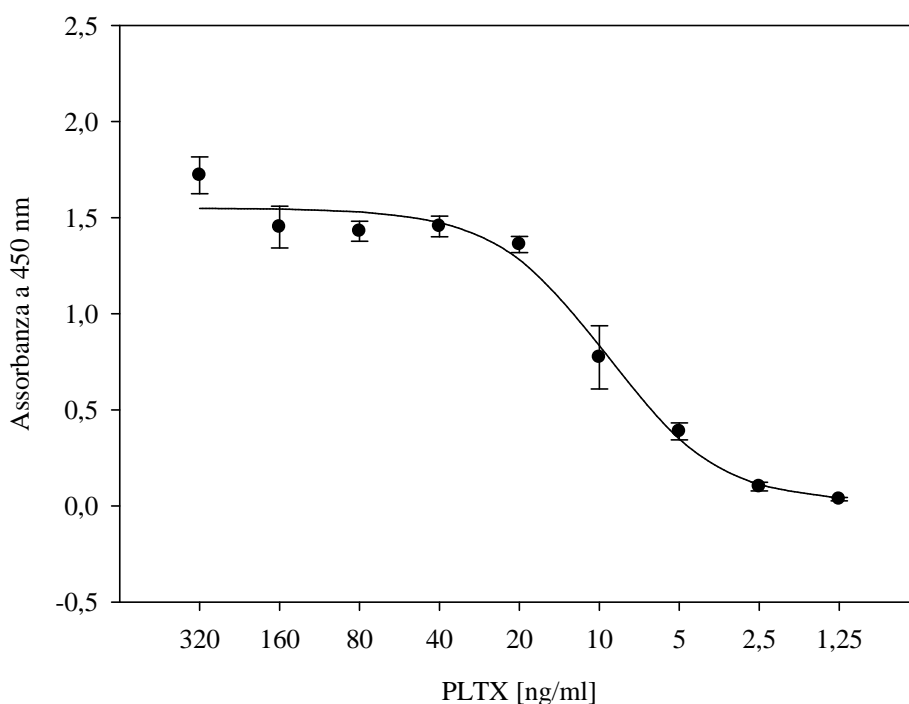


Figura 16. Curva di calibrazione della PLTX nel “sandwich” ELISA indiretto (media \pm errore standard di 3 esperimenti).

4.3.2 *Reattività nei confronti degli analoghi della palitossina*

La risposta in “sandwich” ELISA indiretto degli analoghi della palitossina (42-OH-PLTX e ostreocina-D) è riportata in Figura 17. Mentre il 42-idrossi derivato della PLTX è stato rilevato dagli anticorpi nello stesso range di concentrazioni della PLTX, l’ostreocina-D (che differisce dalla PLTX in 5 posizioni prossime all’estremità idrossiterminale) ha mostrato una reattività percettibile solo alle concentrazioni più alte (> 40 ng/ml).

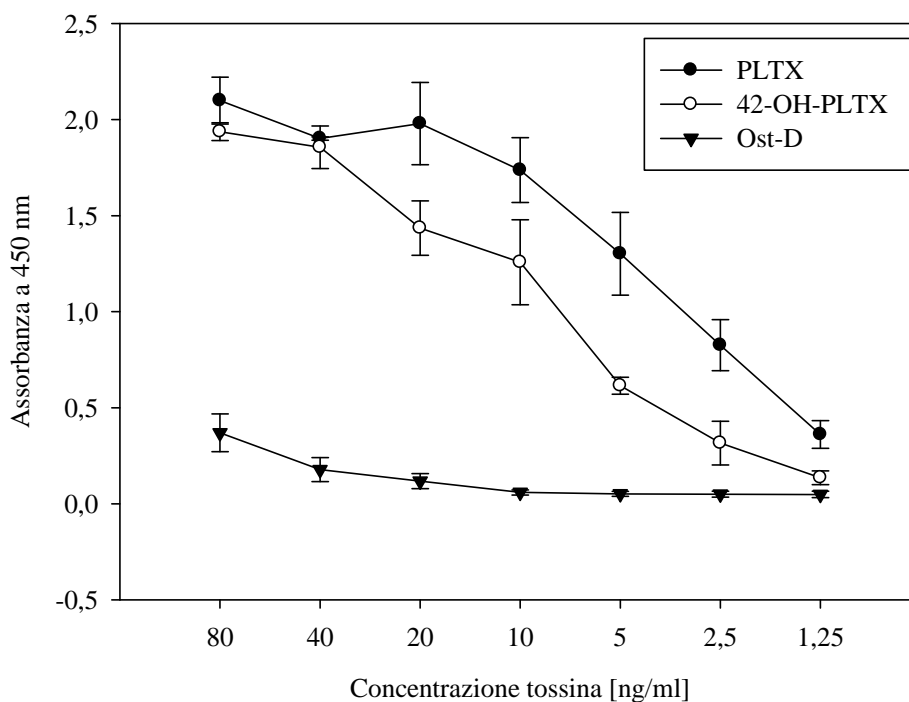


Figura 17. Reattività nel “sandwich” ELISA indiretto di Ost-D e 42-OH-PLTX rispetto alla PLTX (media \pm errore standard di 3 esperimenti).

4.3.3 Reattività nei confronti di altre tossine algali

Per valutare la specificità degli anticorpi anti-PLTX, è stata valutata la possibile interferenza nel test ELISA di yessotossina, acido okadaico, acido domoico, brevetossina-3 e saxitossina. L’ostreocina-D è stata inclusa nell’analisi per avere una più chiara immagine della sua reattività, dal momento che negli esperimenti precedenti ha mostrato un avvio di segnale da concentrazioni 10 volte superiori rispetto a quelle della palitossina.

Come visualizzato in Figura 18, a concentrazioni fino a 100 $\mu\text{g/ml}$, ossia 4 ordini di grandezza superiori a quelle riconosciute di palitossina, non è stata riscontrata alcuna reattività delle possibili tossine interferenti, a prova della specificità degli anticorpi utilizzati. Come atteso, il segnale dell’ostreocina-D risulta invece ben rilevabile alla concentrazione di 100 ng/ml e superiori, in linea con i risultati degli esperimenti precedenti. Questo porta a ipotizzare che uno degli anticorpi utilizzati sia reattivo verso la parte idrossiterminale della PLTX.

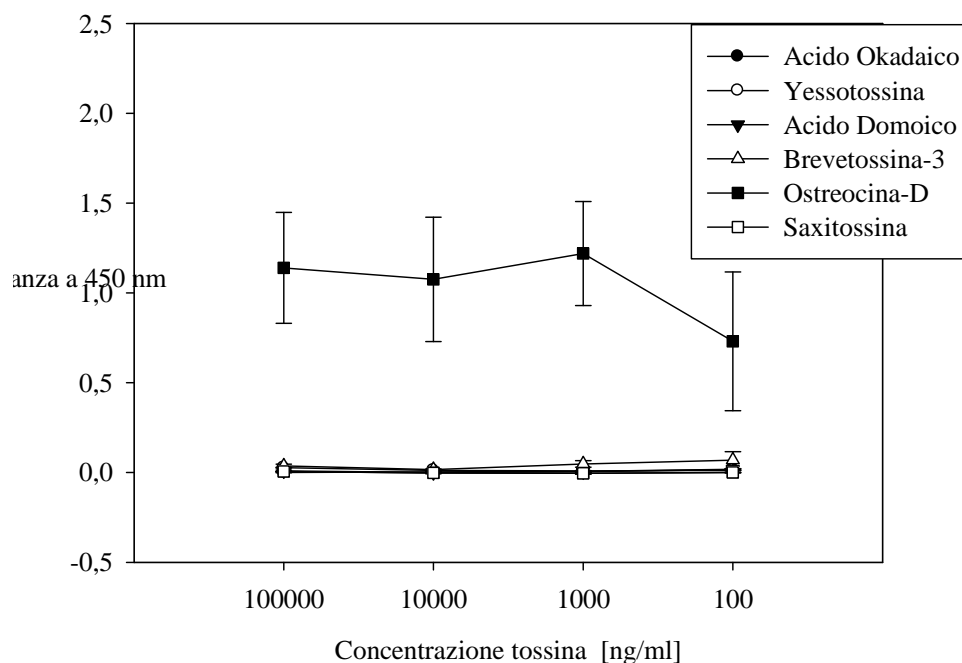


Figura 18. Reattività nel “sandwich” ELISA indiretto di acido okadaico, yessotossina, acido domoico, brevetossina-3, saxitossina ed ostreocina-D (media \pm errore standard di 3 esperimenti).

4.3.4 Reattività nei confronti della palitossina biotinilata ed effetto del tampone

Il problema maggiore riscontrato negli esperimenti descritti è stata la bassa riproducibilità dei risultati: il segnale prodotto dalla palitossina tende, infatti, a variare da una soluzione madre all'altra e a calare nel tempo per una stessa soluzione madre preparata alla concentrazione di 25 $\mu\text{g/ml}$ dalla tossina commerciale. Questa considerazione, unitamente alle informazioni di letteratura sulla capacità della tossina di dimerizzare in soluzione e di adsorbirsi a superfici plastiche (Taylor et al., 1991), oltre a misurazioni di dicroismo circolare (effettuate dal gruppo del Prof. Benedetti dell'Università di Trieste) che ne confermavano il comportamento ambiguo in soluzione, ci hanno portato a cercare una soluzione a questo problema.

E' stato così preparato, dal gruppo del Prof. Benedetti, un campione di palitossina coniugata alla biotina. La scelta di valutare la risposta e stabilità in “sandwich” ELISA di questo coniugato si è basata essenzialmente su tre motivi:

- 1) Il coniugato è stato prodotto con la tossina non commerciale estratta da *P. tuberculosa*, la

stessa usata per la produzione di anticorpi, ed è disponibile alla concentrazione di 5 mg/ml, molto più elevata rispetto ai 25 µg/ml ottenibili da una preparazione commerciale.

2) Il rapporto di coniugazione è 1:1, con il gruppo carbossilico della biotina legato a quello amminico della palitossina, costituendo una molecola univocamente definita. I coniugati della PLTX con proteine come la albumina (BSA) invece sono costituiti da più molecole di tossina legate alla proteina, in numero variabile. Inoltre non si possono escludere eventuali interazioni non covalenti della tossina con la BSA.

3) Il blocco del gruppo amminico della palitossina ne impedisce la dimerizzazione (Inuzuka et al., 2007, 2008), riducendone la variabilità di comportamento in soluzione.

Al momento del suo primo utilizzo in ELISA, la soluzione madre di PLTX-biotina era stata conservata a 4°C in acqua distillata per circa un anno dalla sua preparazione; sono stati eseguiti 3 esperimenti indipendenti, la cui media è riportata in Figura 19. Per questi esperimenti, le diluizioni di lavoro di tossina 5 µg/ml sono state preparate sempre fresche il giorno dell'esperimento, a partire dalla soluzione madre 5 mg/ml.

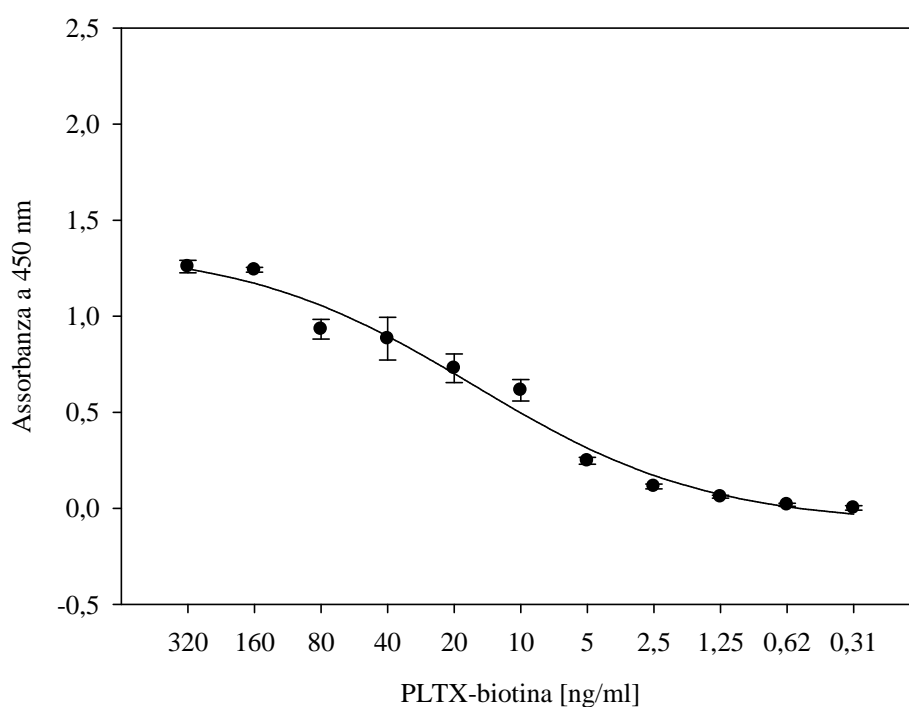


Figura 19. Risposta in “sandwich” ELISA indiretto del coniugato PLTX-biotina (media ± errore standard di 3 esperimenti).

Il coniugato PLTX-biotina ha dimostrato di possedere una buona reattività in ELISA ad un anno dalla sua preparazione, in un range di concentrazioni analogo a quello della palitossina commerciale.

In Figura 20 sono riportati i risultati delle prove di stabilità della PLTX-biotina, come diluizione di lavoro 5 $\mu\text{g/ml}$ conservata a 4°C, effettuate a 0 – 2 – 6 giorni, in diversi tamponi/solventi.

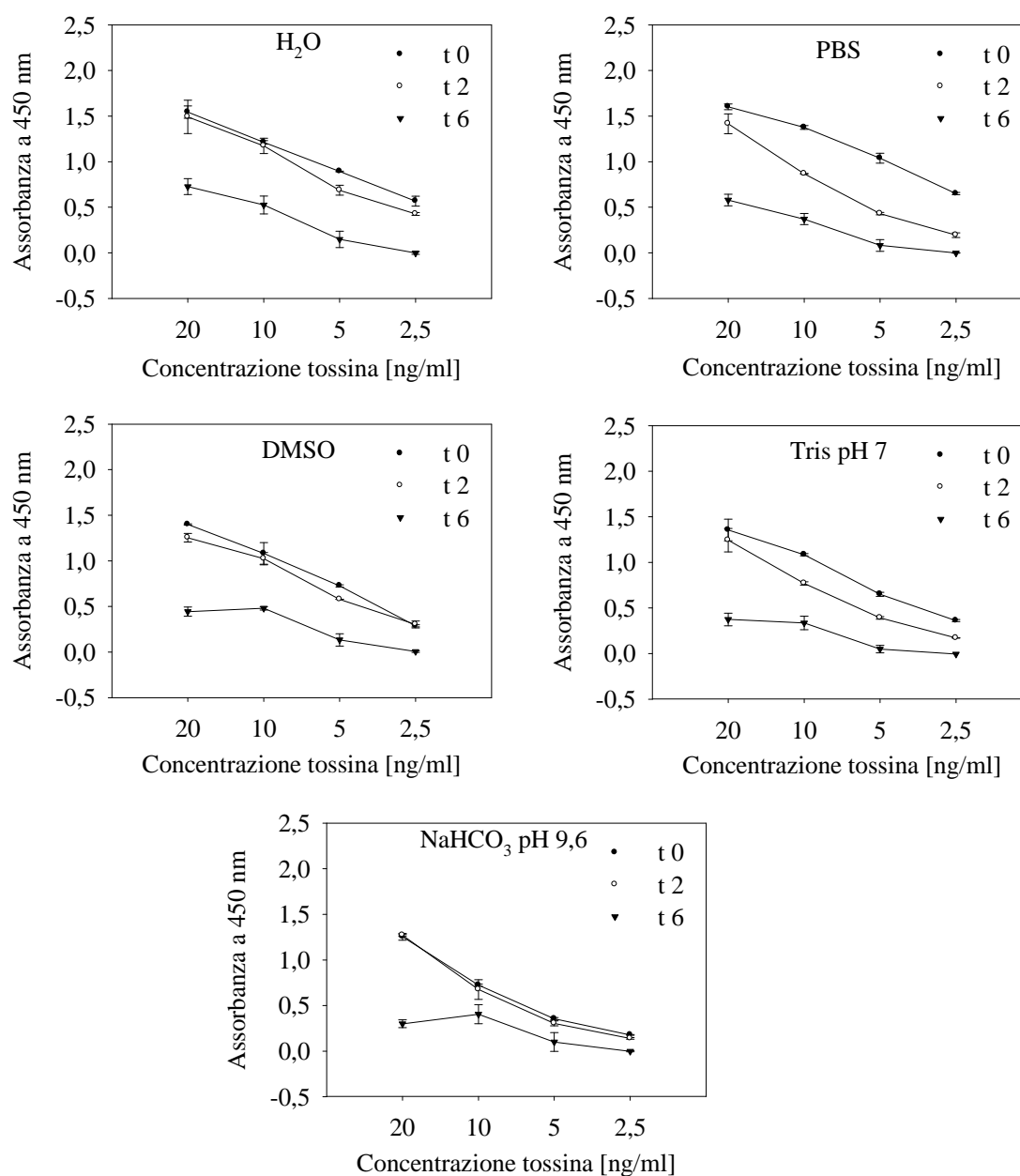


Figura 20. Stabilità della diluizione di lavoro a 5 $\mu\text{g/ml}$ di PLTX-biotina in diversi tamponi/solventi conservata a 4°C. I tamponi/solventi testati sono: acqua distillata, PBS pH 7,4, dimetilsolfossido, Tris-HCl pH 7,0, tampone carbonato pH 9,6. L'esperimento è stato condotto in concomitanza della preparazione delle soluzioni (t 0), dopo 2 giorni (t 2), dopo 6 giorni (t 6).

In tutti i casi si è osservato un considerevole calo di reattività dopo 6 giorni, ad indicare che la diluizione 5 µg/ml è instabile nelle condizioni sperimentali utilizzate. Si è portati a pensare che nella soluzione madre più concentrata (5 mg/ml) di PLTX-biotina, l'elevata concentrazione giochi un ruolo nel prevenire il calo del segnale, assieme alla stabilizzazione della forma monomericale conseguente al blocco del gruppo amminico terminale.

4.3.5 *Miglioramenti metodologici del saggio immunoenzimatico*

La valutazione di alcune variabili sperimentali durante l'ultima parte dell'attività di ricerca finora dedicata al "sandwich" ELISA, come descritto nella sezione Materiali e Metodi, ha portato al miglioramento della curva concentrazione-risposta, come visualizzato in Figura 21. In questi esperimenti si è ottenuta una buona correlazione dei dati ($R^2 = 0.9989$ per l'interpolazione con la funzione logistica a 4 parametri) con una EC_{50} di 8.52 ± 0.35 ng/ml ed un aumento del segnale (assorbanza a plateau di circa 1.6, rispetto a 1.3 della procedura generale). Il range di rilevanza della tossina è confermato tra 40 e 1.25 ng/ml. Considerate queste modificazioni, il protocollo generale descritto nella sezione Materiali e Metodi, viene ad essere così modificato:

- 1) "Coating": incubazione con l'anticorpo monoclonale anti-PLTX a 2 µg per pozzetto (100 µl), per 16 ore a 4°C;
- 2) "Blocking": con latte in polvere al 2 % in PBS-Tween 20 (0.1 %) (200 µl), per 1 ora a temperatura ambiente;
- 3) 3 lavaggi con PBS;
- 4) Preparazione di una diluizione di lavoro di PLTX-biotina a 5 µg/ml in acqua distillata con ovalbumina 1 mg/ml (da utilizzare in giornata)
- 5) Dalla diluizione di lavoro, preparazione di diluizioni seriali di PLTX-biotina in PBS-Tween 20 (0.1 %) ed aggiunta nei pozzetti (100 µl); incubazione per 2 ore a temperatura ambiente;
- 6) 3 lavaggi con PBS-Tween 20 (0.1 %); 3 lavaggi con PBS;

- 7) Aggiunta dell'anticorpo policlonale anti-PLTX purificato per affinità come diluizione 1:300 (la concentrazione stimata della soluzione madre è 50 µg/ml). La diluizione è realizzata in PBS-Tween 20 (0.1 %) con latte al 2 % (100 µl) e l'incubazione è di 2 ore a temperatura ambiente;
- 8) 3 lavaggi con PBS-Tween 20 (0.1%); 3 lavaggi con PBS;
- 9) Aggiunta anticorpo secondario commerciale (100 µl) diluito 1:2000 in PBS-Tween 20 (0.1%) con latte al 2 % ed incubazione per 1 ora a temperatura ambiente;
- 10) 3 lavaggi con PBS-Tween 20 (0.1 %); 3 lavaggi con PBS;
- 11) Aggiunta di 60 µl di TMB e sviluppo per 30 min al buio;
- 12) Blocco della reazione con H₂SO₄ 1 M (30 µl) e lettura dell'assorbanza a 450 nm entro 5 min.

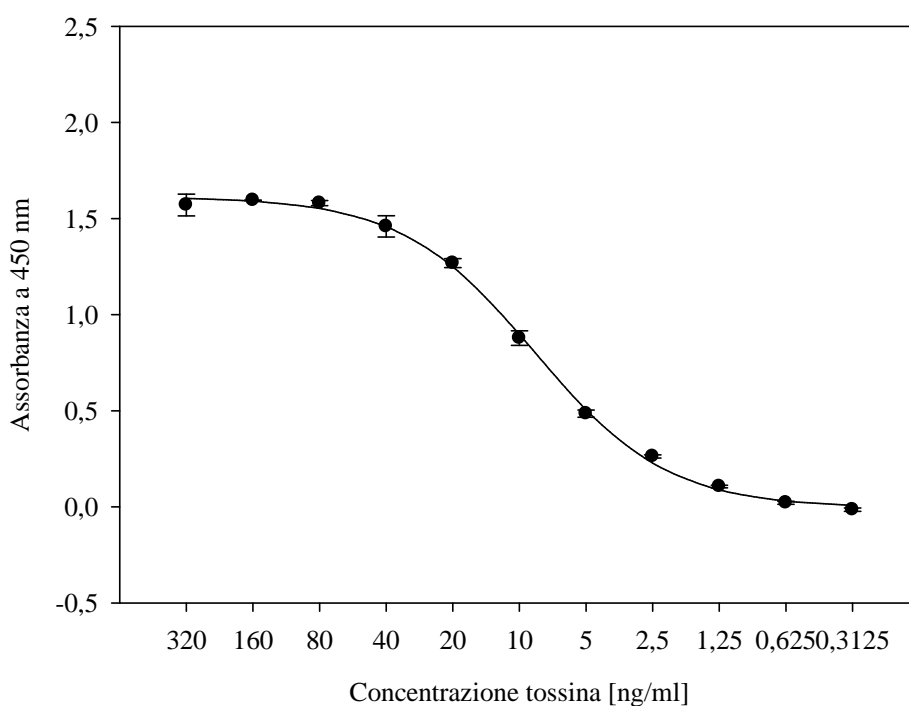


Figura 21. Risposta in “sandwich” ELISA indiretto del coniugato PLTX-biotina utilizzando il protocollo sperimentale perfezionato (media \pm errore standard di 3 esperimenti).

4.4 Saggio emolitico

4.4.1 Curva concentrazione-risposta ottenuta in saggio emolitico

La curva concentrazione-risposta ottenuta al saggio emolitico su sangue di topo per la palitossina è riportata in Figura 22. La sua EC_{50} è di 13.2 ± 0.13 pM e la linearità di risposta, su cui poter quantificare la tossina, è stata considerata tra la EC_{20} e la EC_{80} , rispettivamente di 6.6 pM e 26.4 pM. Questo intervallo di concentrazione è di molto inferiore rispetto a quello individuato nel “sandwich” ELISA indiretto descritto in precedenza (1.25 – 40 ng/ml, pari a 0.5 – 15 nM).

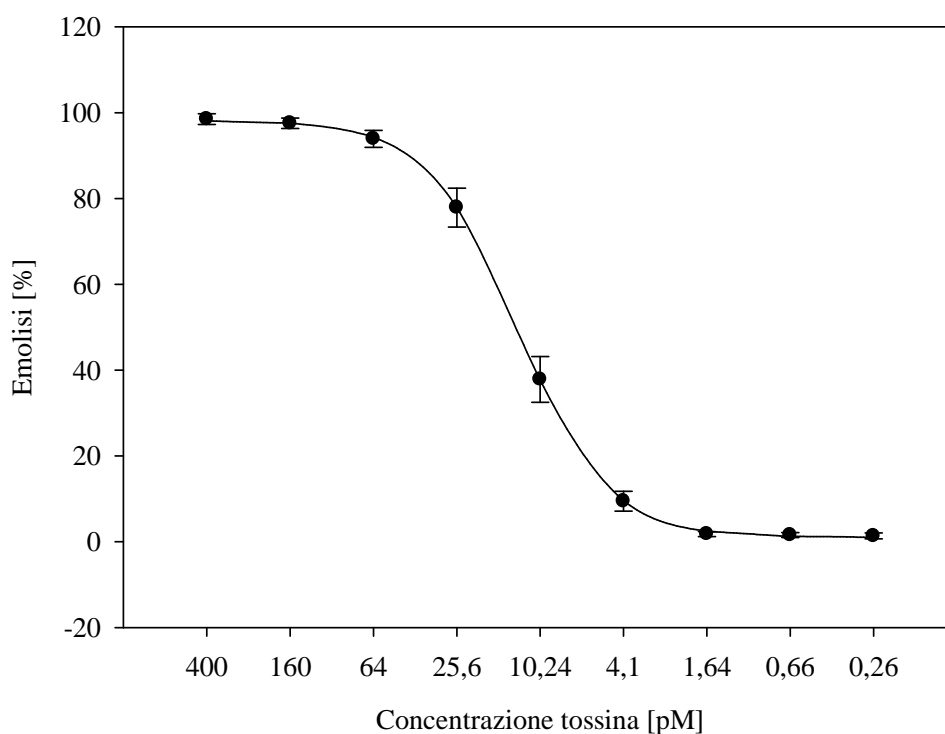


Figura 22. Curva concentrazione-risposta della palitossina nel saggio emolitico eseguito su sangue di topo (media \pm errore standard di 5 esperimenti).

4.4.2 Inibizione dell'emolisi da anticorpi anti-palitossina

Gli anticorpi anti-PLTX monoclonale (mAb) e policlonale (pAb), già utilizzati nel test ELISA, sono stati utilizzati al fine di inibire l'emolisi da palitossina, in quanto l'analisi di campioni naturali

richiederà l'utilizzo di un inibitore per verificare la specificità dell'emolisi. Questa potrebbe infatti essere dovuta da altre possibili sostanze emolitiche presenti nei prodotti ittici o nelle microalghe potenzialmente produttrici di palitossina. Dal grafico in Figura 23 si nota come i due anticorpi, utilizzati a 25 $\mu\text{g/ml}$, siano equamente efficaci nel ridurre la potenza emolitica della palitossina di circa un ordine di grandezza, similmente a quanto osservato da Bignami (1993).

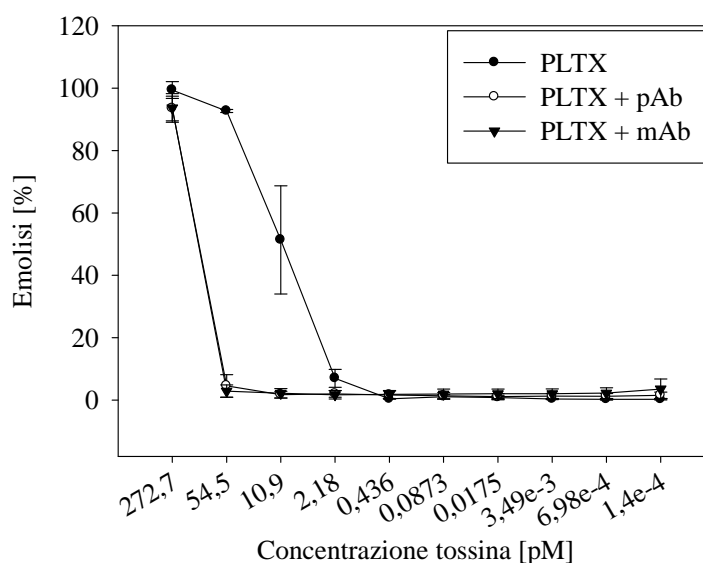


Figura 23. Emolisi da PLTX ed inibizione con anticorpi monoclonale (mAb) o policlonale (pAb) anti-PLTX a 25 $\mu\text{g/ml}$ (media \pm errore standard di 3 esperimenti).

4.4.3 Emolisi da parte degli analoghi della palitossina

Analogamente a quanto effettuato al test ELISA, è stata valutata l'attività emolitica di 42-OH-PLTX e Ost-D ed il potere inibitorio sulla loro emolisi da parte degli anticorpi anti-PLTX monoclonale (mAb) e policlonale (pAb). I risultati sono riportati in Figura 24. Come descritto in § 4.2.4, il 42-idrossi derivato mostra un comportamento analogo alla palitossina sia per potere emolitico sia per la sua inibizione da anticorpi anti-PLTX. L'ostreocina-D invece appare meno reattiva, con una EC_{50} di circa 293 pM e una capacità inibitoria maggiore da parte dell'anticorpo

policonale rispetto a quello monoclonale, anche se i pochi punti sperimentali non consentono una precisa quantificazione. Tale dato è in accordo con i risultati ottenuti al test ELISA, relativi all'Ost-D che era riconosciuta dagli anticorpi in misura minore rispetto alla PLTX ed alla 42-OH-PLTX.

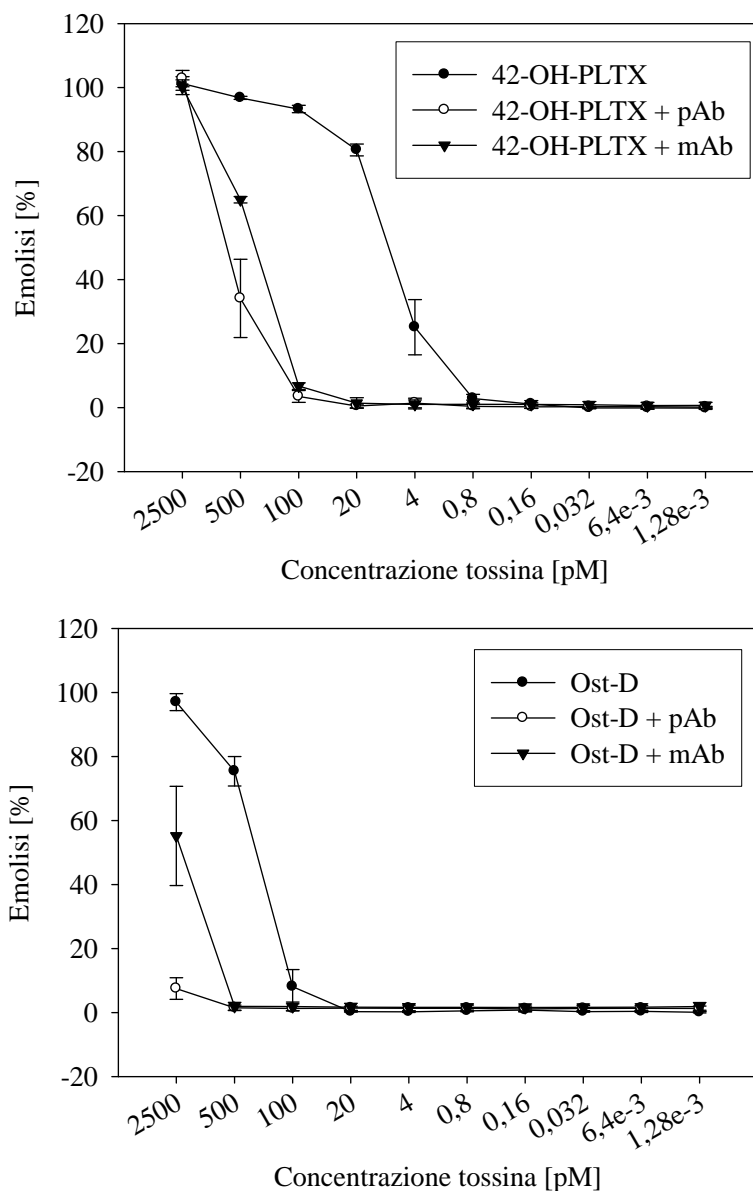


Figura 24. Emolisi indotta da 42-OH-PLTX (in alto) e Ost-D (in basso) ed inibizione da parte degli anticorpi monoclonale (mAb) o policlonale (pAb) anti-PLTX (media \pm errore standard di 3 esperimenti).

4.4.4 Effetto della origine degli eritrociti

L'attività emolitica della PLTX è stata valutata anche impiegando eritrociti ovisi ed umani. La differente emolisi ottenuta impiegando sangue di topo, pecora e uomo è riportata in Figura 25. Per questa serie esperimenti è stata utilizzata, per motivi logistici, una soluzione madre di palitossina

più vecchia rispetto a quella utilizzata per gli altri esperimenti, per la quale si è notata una potenza emolitica inferiore, quindi i risultati non sono confrontabili con quelli precedenti. Non di meno, si è notato come gli eritrociti di topo siano i più sensibili all'azione della palitossina ($EC_{50} = 121 \text{ pM}$, in questo esperimento). Sangue umano e di pecora hanno risposto in maniera tra loro simile, fornendo dei valori di EC_{50} rispettivamente di 1250 pM e 1846 pM . In entrambi i casi l'emolisi non ha raggiunto il 100 % ma tendeva a fermarsi ad un plateau in prossimità del 50 %. Non è chiaro il motivo di questa ridotta emolisi ma è plausibile che il tampone usato non sia in grado di contribuire ad indurre una lisi totale negli eritrociti umani o di pecora in seguito all'azione della palitossina. Per la maggiore sensibilità e la più chiara risposta emolitica si è quindi deciso di continuare ad utilizzare il sangue murino.

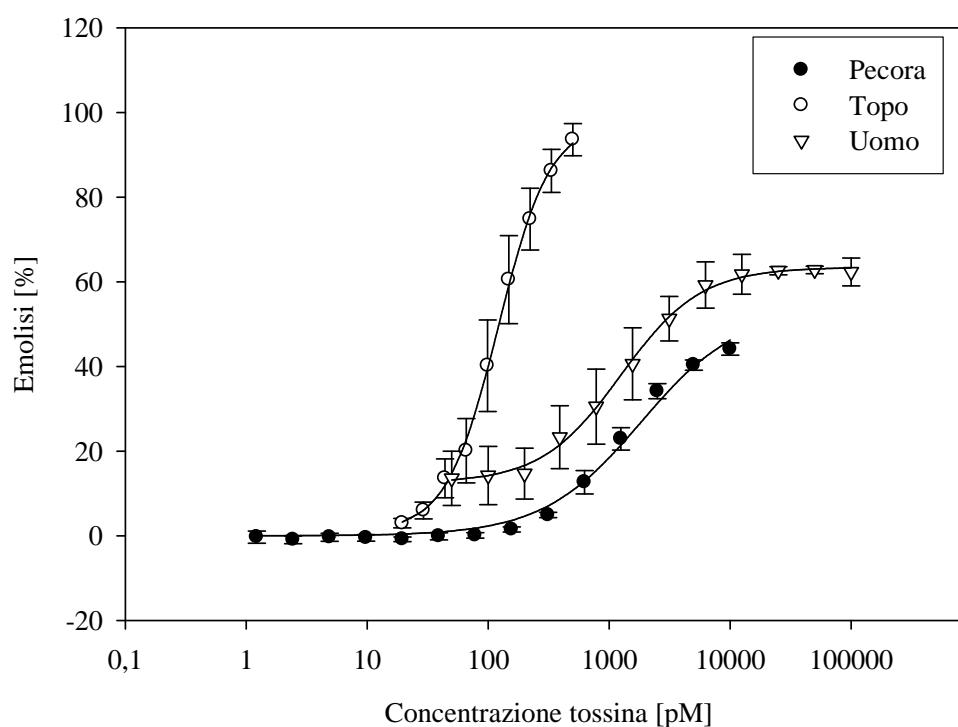


Figura 25. Emolisi indotta da PLTX in eritrociti di pecora, topo e uomo (media \pm errore standard di 3 esperimenti).

4.4.5 Effetto di cofattori

In Figura 26 sono riportati i risultati dei test volti a valutare l'effetto dei cofattori comunemente utilizzati nei tamponi per il saggio emolitico, ossia gli ioni calcio, l'acido borico ed il sodio

tetraborato (Habermann et al., 1983; Bignami, 1993). L'effetto dei cofattori è stato analizzato separatamente, utilizzando una concentrazione di palitossina pari a 10 pM, prossima all'EC₅₀.

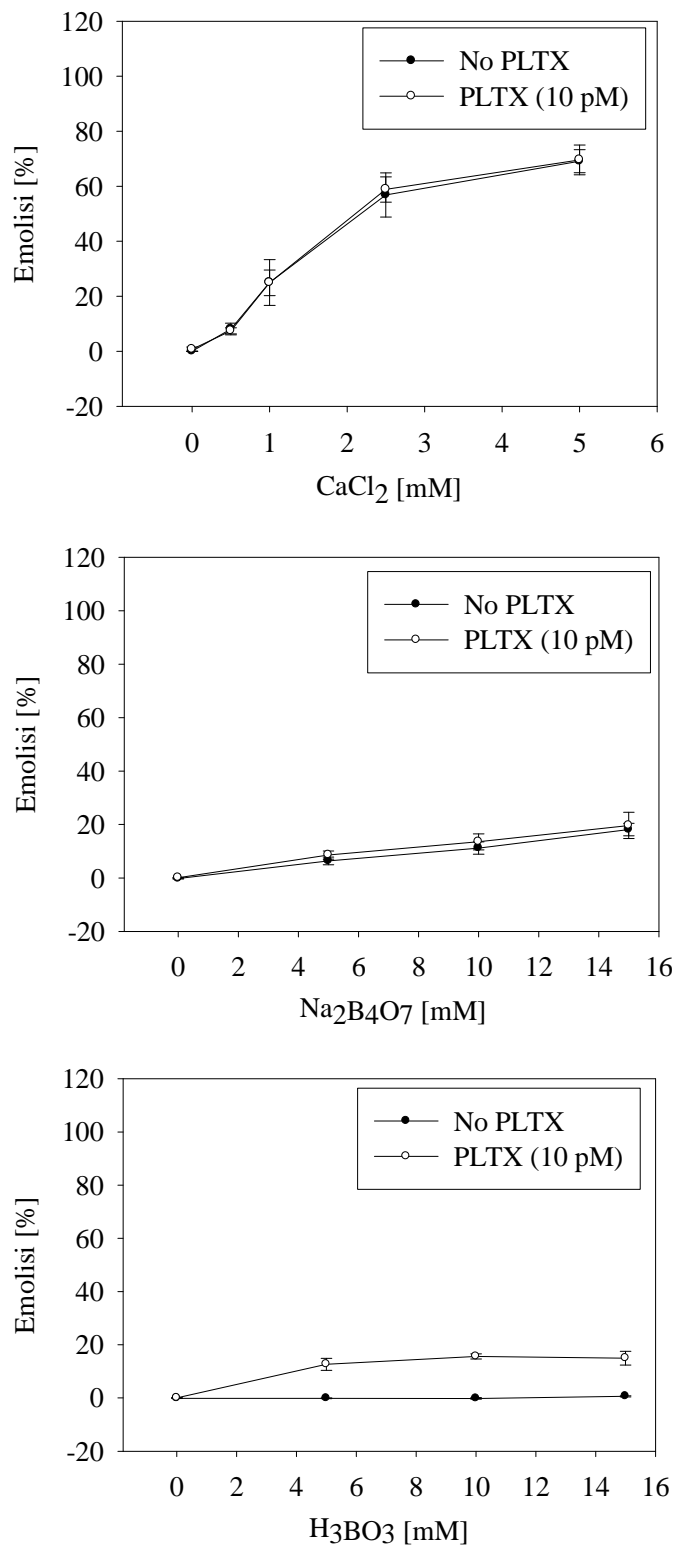


Figura 26. Effetto dei cofattori calcio cloruro, sodio tetraborato ed acido borico nel test emolitico, in presenza o meno di PLTX 10 pM (media \pm errore standard di = 3 esperimenti).

In merito agli ioni calcio, si è notata una forte emolisi dipendente dalla sua concentrazione, indicando che errori dei suoi livelli nel tampone di lavoro possono facilmente dare variabilità nei risultati del saggio emolitico o controlli negativi eccessivamente elevati. La sua emolisi copre quella eventuale indotta da palitossina nelle nostre condizioni sperimentali, non permettendo di valutarne gli effetti come cofattore.

Si può notare come il sodio tetraborato e l'acido borico abbiano un comportamento differente. Con il sodio tetraborato si ha lo stesso comportamento emolitico in presenza o assenza di palitossina, con una lieve emolisi aspecifica dipendente dalla concentrazione di tetraborato, che indica uno scarso effetto come cofattore. Con l'acido borico si nota invece l'assenza di emolisi aspecifica nel range di concentrazioni considerato e il parallelo incremento dell'emolisi indotta da palitossina, indicando la sua capacità di aumentarne specificamente il potere emolitico. E' stato pertanto deciso di continuare ad utilizzare l'acido borico come cofattore.

4.4.6 *Miglioramento metodologico: effetto dell'osmolarità del tampone*

Per valutare se fosse possibile applicare il saggio in situazioni di monitoraggio quando è necessaria una rapida risposta, è stata valutata la resistenza alla lisi degli eritrociti di topo a diverse concentrazioni di PBS dopo 1 ora a 37 °C (Figura 27). Da tali prove si è notato che la minima concentrazione di PBS ancora in grado di mantenere integri gli eritrociti è pari a 62 % (emolisi = 0 %).

I risultati del saggio emolitico condotto in 1 ora a 37°C in tampone PBS al 62 % (saggio emolitico ridotto) sono riportati in Figura 28, in confronto con i risultati del saggio condotto con la procedura classica (saggio emolitico normale) ovvero in tampone PBS al 100 % e 4 ore di incubazione a 37°C. Si nota come la risposta emolitica sia confrontabile nei due saggi, a fronte di una forte riduzione dei tempi di esecuzione. Le EC_{50} riscontrate sono di 15.9 ± 0.44 pM e 13.2 ± 0.13 pM, rispettivamente per il saggio ridotto e per quello normale.

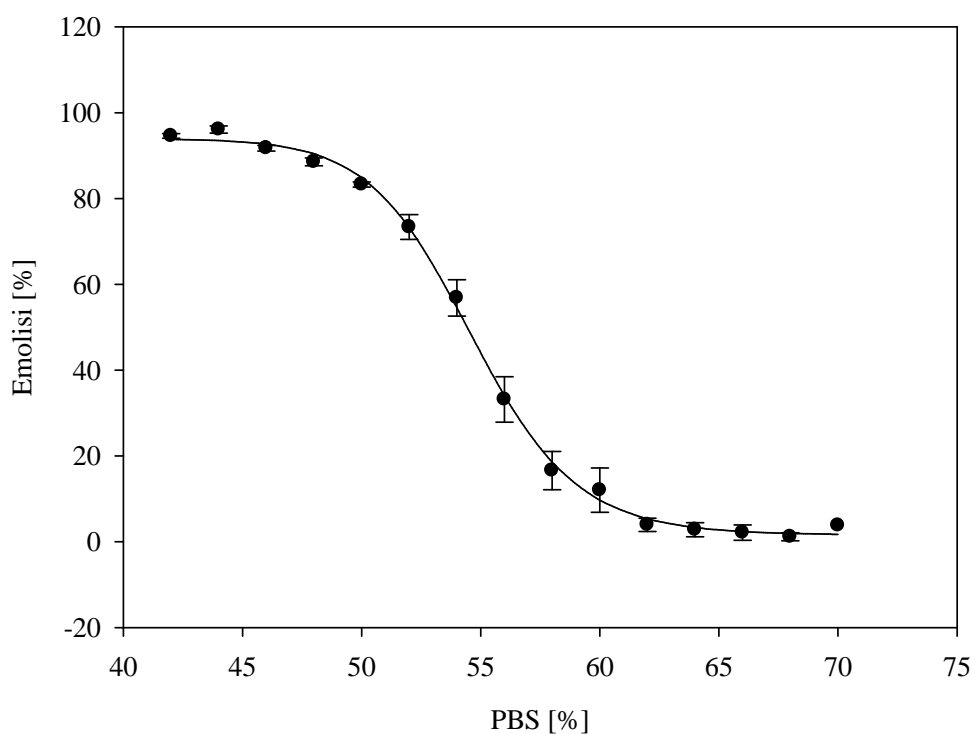


Figura 27. Emolisi rilevata in 1 ora a 37°C a diverse concentrazioni di PBS (media \pm errore standard di 3 esperimenti).

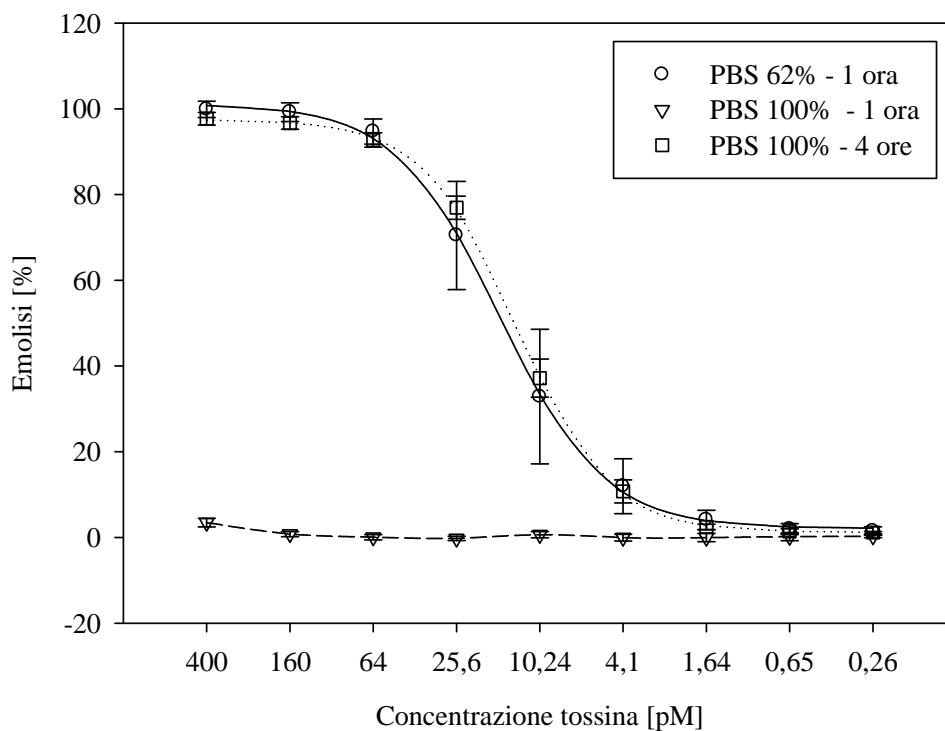


Figura 28. Risposta emolitica in PBS 100 % a 4 ore (saggio emolitico normale, linea \cdots), PBS 62 % a 1 ora (saggio emolitico ridotto, linea—) e PBS 100 % a 1 ora (controllo negativo, linea---) (media \pm errore standard di 3 esperimenti).

Per contro, in 1 ora di incubazione in tampone PBS sempre al 100 % non si rileva alcuna emolisi (controllo negativo) per le concentrazioni di palitossina utilizzate (Figura 28, linea tratteggiata). Questo aspetto è particolarmente interessante perché permetterebbe di distinguere l'emolisi dovuta a palitossina da una emolisi aspecifica, semplicemente conducendo il saggio in 1 ora in parallelo, alle due diverse concentrazioni di PBS (62 % e 100 %). In particolare, nel caso di un campione ignoto che dia emolisi in PBS al 62 % e non in PBS al 100 %, il risultato fornisce un forte indizio della presenza di palitossina. Se invece l'emolisi avviene ad entrambe le concentrazioni di PBS, dopo incubazione per 1 ora, essa potrebbe dipendere da un'azione aspecifica non imputabile alla sola palitossina.

Come controllo della specificità della lisi, anche in questa versione "ridotta" del saggio emolitico è stata condotta l'inibizione da anticorpi anti-PLTX. La Figura 29 mostra come gli anticorpi monoclonale (mAb) e policlonale (pAb), alla concentrazione di 25 µg/ml, siano equamente in grado di inibire l'emolisi indotta da palitossina.

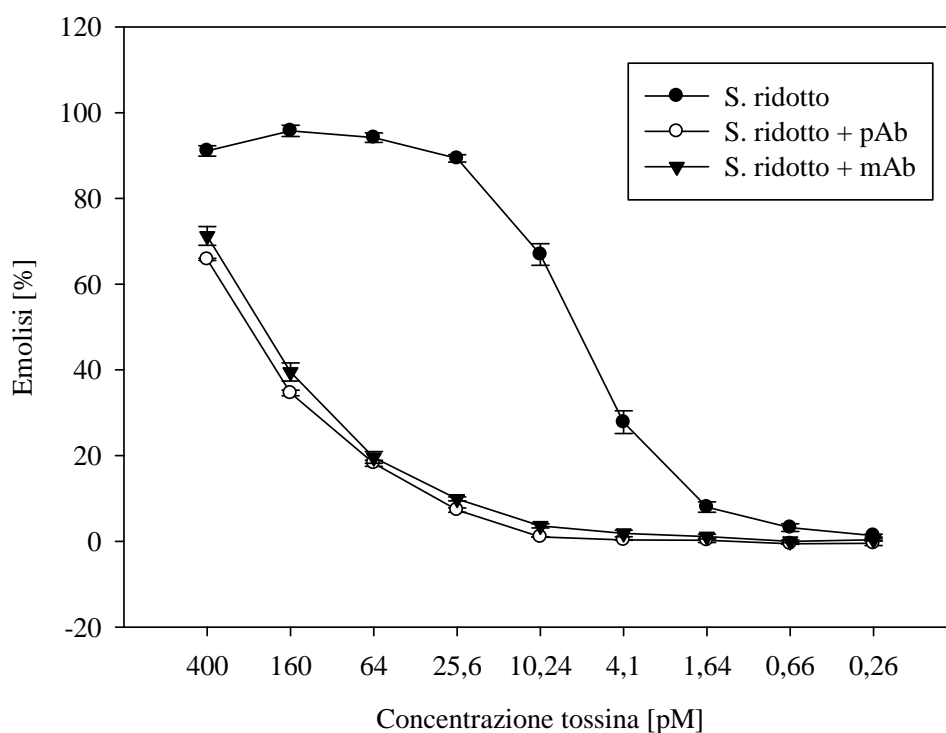


Figura 29. Emolisi della palitossina nel saggio ridotto (PBS 62 %, 1 ora, 37°C) ed inibizione con anticorpi policlonale (pAb) o monoclonale (mAb) anti-PLTX alla concentrazione di 25 µg/ml (media ± errore standard di 3 esperimenti).

4.5 Indagine eco-tossicologica

4.5.1 Proliferazione di *Ostreopsis* nel golfo di Trieste (settembre 2009)

Nel settembre del 2009 una proliferazione di *Ostreopsis* cf. *ovata* si è avuta nelle locali acque del golfo di Trieste, nella piccola spiaggia rocciosa di Canovella de' Zoppoli, caratterizzata da zone di acqua poco profonda (20–100 cm) e pozze di marea. Le particolari condizioni meteorologiche calde e soleggiate hanno portato il 28 settembre al picco di 6.7 milioni di cellule/litro di *O. ovata*, con la formazione di un biofilm mucillaginoso che ricopriva i ciottoli del fondale (Figura 30C). Cellule di *O. cf. ovata* sono state rilevate su alghe rosse (*Corallina officinalis*) attaccate ad una rete di filamenti (Figura 30A-30B). Le cellule (diametro maggiore: 48-65 µm, diametro minore: 31-46 µm; Figura 30D) sono state identificate come *O. cf. ovata* tramite analisi microscopica delle placche tecali dal Prof. Giorgio Honsell dell'Università di Udine. L'identificazione tassonomica di *Ostreopsis* è stata confermata dall'analisi molecolare effettuata dalla Dr.ssa Antonella Penna dell'Università di Urbino su sequenze di DNA ribosomiale (LSU e ITS-5.8S rDNA), indicando la presenza di un'unica specie: *O. cf. ovata* (clade atlantico/mediterraneo). Le altre microalghe maggiormente presenti erano dinoflagellati bentonici (*Coolia monotis* e *Prorocentrum* sp.), cianobatteri (Oscillatoriales), diatomee (*Nitzschia* cf. *recurva*, Naviculaceae, *Gyrosigma* sp., *Coscinodiscus* sp.). Persone frequentanti la località hanno riferito, in concomitanza alla proliferazione, una sensazione di prurito e lievi problemi cutanei, pur senza richiedere a cure mediche.

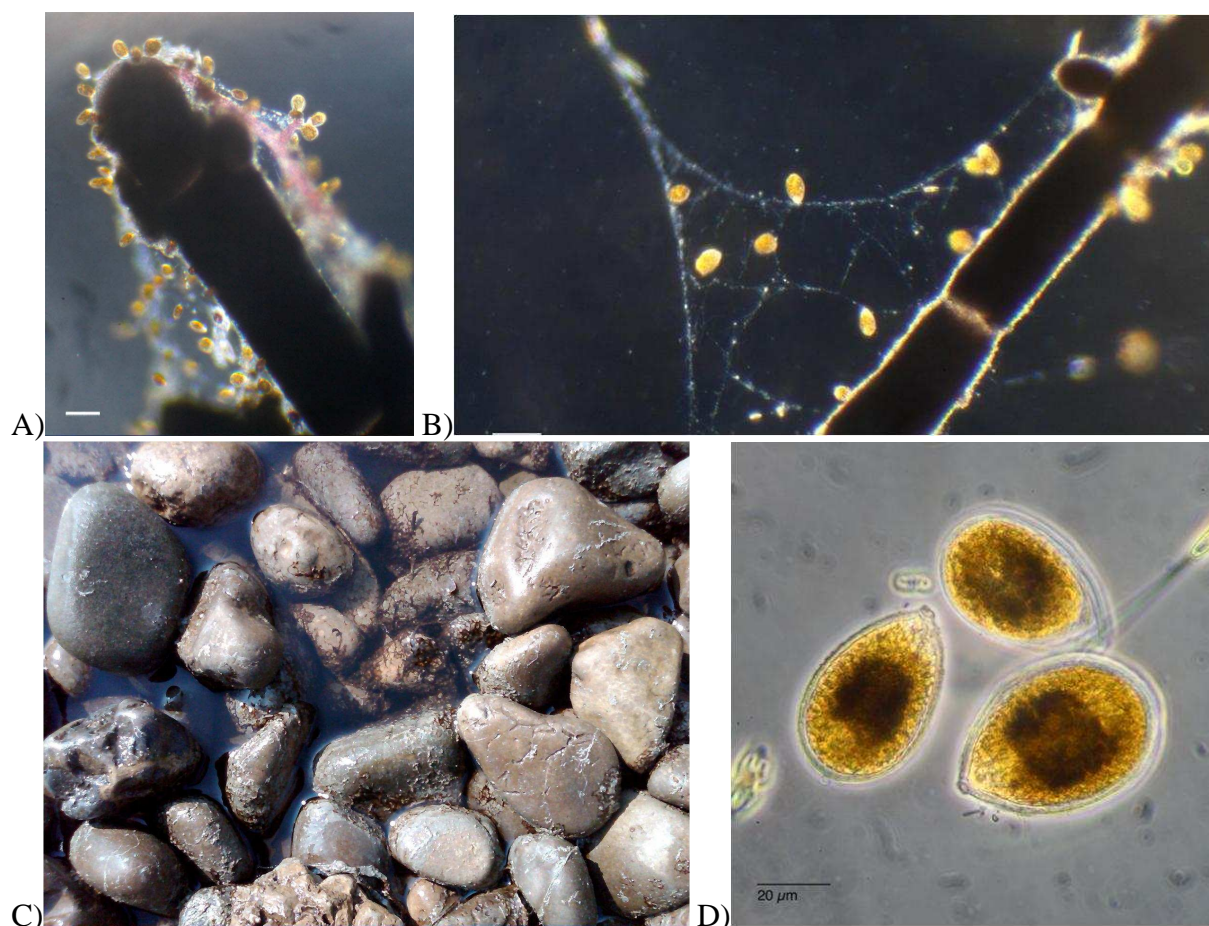


Figura 30. Proliferazione di *O. cf. ovata* di settembre 2009 a Canovella de' Zoppoli. (A) cellule cresciute su *Corallina officinalis*, (B) formazione della rete filamentosa sulla macroalga ed adesione delle cellule, (C) fondale sassoso in prossimità della riva con parti del biofilm mucillaginoso, (D) immagine al microscopio ottico di *O. cf. ovata*.

4.5.2 Analisi immunocitochimica

Le immagini ottenute dall'analisi immunocitochimica sono riportate in Figura 31; la fluorescenza verde (Alexa Fluor 488) indica la distribuzione degli anticorpi anti-PLTX e la fluorescenza blu (Hoechst 33258) i nuclei delle cellule delle microalghe. Sia l'anticorpo monoclonale che il policlonale anti-PLTX hanno dato una forte positività nelle cellule di *Ostreopsis* (100 % delle 68 cellule osservate) ma non nelle cellule di *Coolia monotis* (0 % delle 28 cellule osservate), specie rilevata insieme ad *Ostreopsis*. Il siero preimmune di coniglio e gli anticorpi secondari usati come controlli sono risultati non reattivi, indicando che il segnale della fluorescenza verde è PLTX-specifico. La marcatura è sostanzialmente citoplasmatica, con negatività nelle grandi vescicole interne (probabilmente accumuli di lipidi), quindi la palitossina non sembra accumularsi in particolari distretti cellulari.

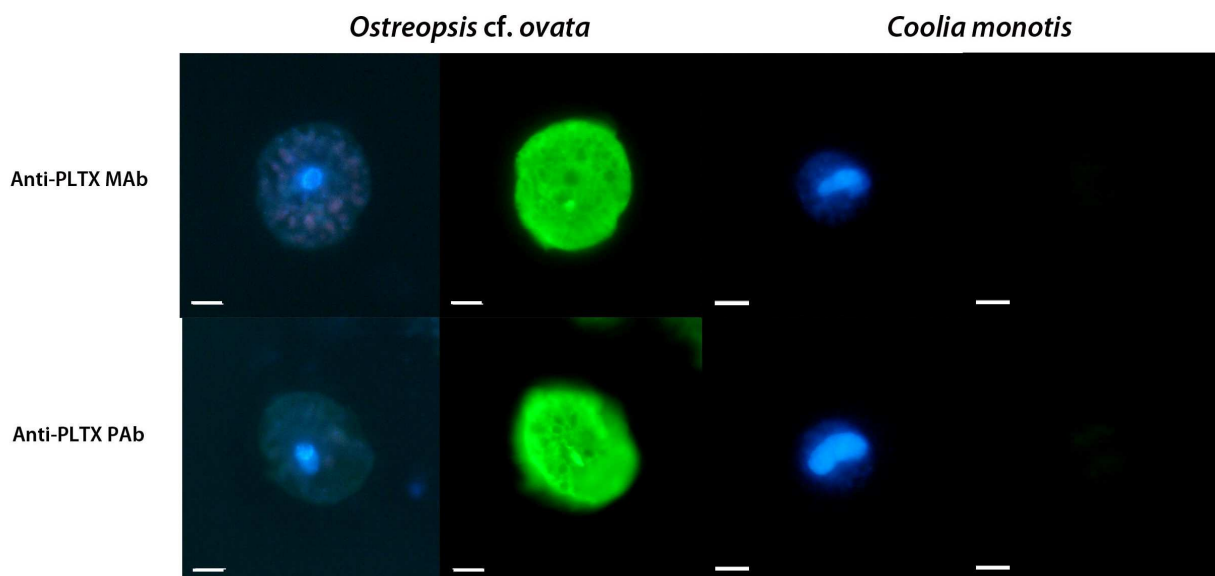


Figura 31. Immagini di *O. cf. ovata* (a sinistra) e *C. monotis* (a destra) marcate con anticorpi anti-PLTX monoclonale (in alto) e policlonale (in basso) osservate in microscopia ad epifluorescenza (fluorescenza blu di Hoechst 33258 specifica per i nuclei; fluorescenza verde di Alexa fluor 488 specifica per la palitossina; la barra indica 10 μm).

4.5.3 Spettroscopia Raman

Dagli spettri Raman registrati (Figura 32) si nota come, in tutte le fasi di crescita di *O. cf. ovata* in coltura, sia confermata la presenza di peridina e come il lavaggio con acetone:esano (1:1) sia efficace per la sua rimozione. Non è stato possibile rilevare un segnale Raman direttamente correlabile alla palitossina, né in cellule normali né in cellule depigmentate, in quanto manca il segnale dei gruppi ossidrilici, che costituisce una parte importante dello spettro della tossina (Figura 32). Tuttavia, le cellule in tutte le fasi di crescita condividono con lo spettro della palitossina un segnale attorno a 1650 cm^{-1} relativo ai doppi legami C=C, probabilmente dovuto ad acidi grassi polinsaturi quali l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω 3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6 ω 3) che *Ostreopsis* è nota accumulare (Usup et al., 2008). È probabile che la tossina risulti non sia rilevabile al Raman a causa della sua localizzazione citoplasmatica diffusa, come rilevato mediante analisi immunocitochimica.

Lo spettro Raman della palitossina, finora assente in letteratura, è dettagliato in Figura 33.

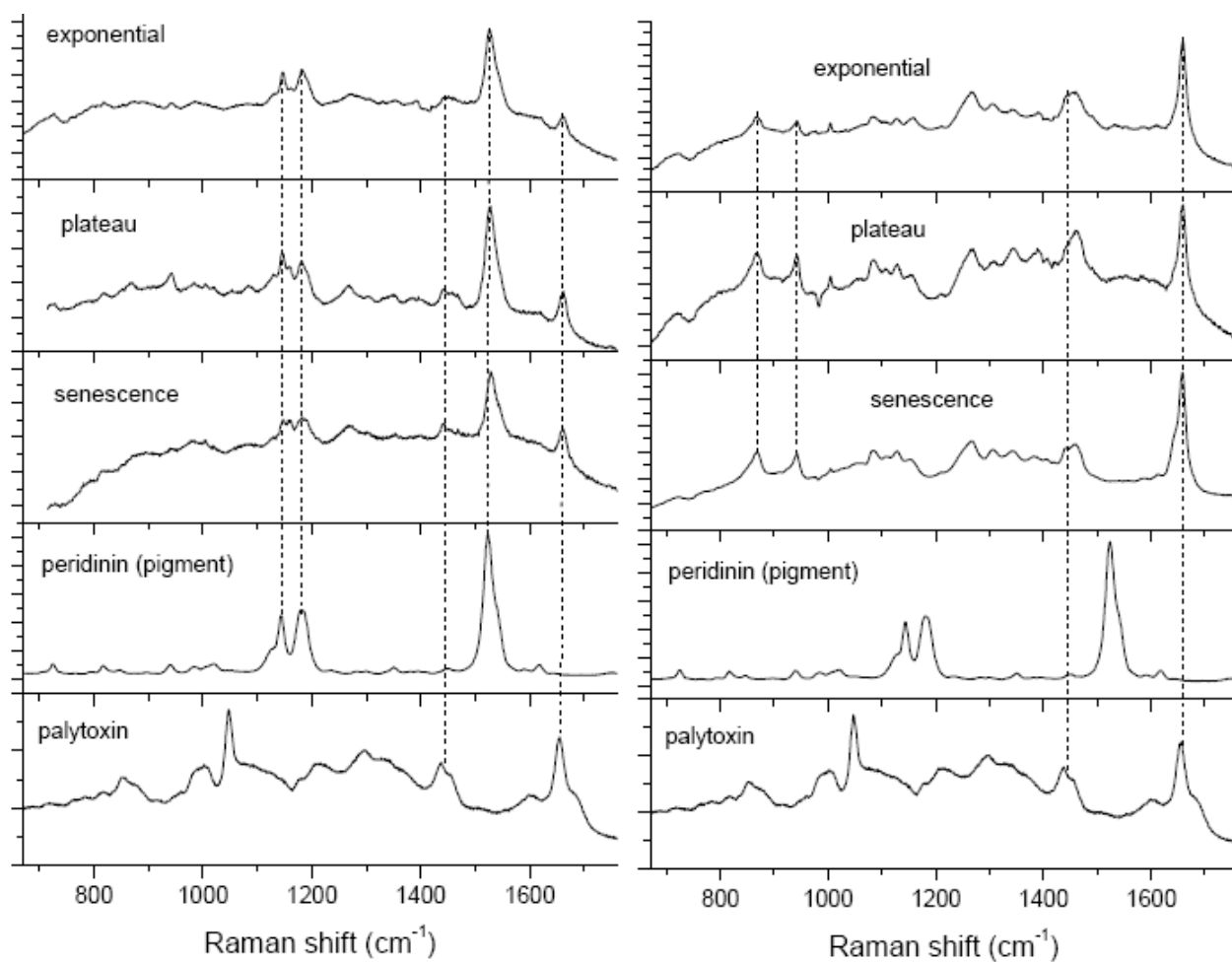


Figura 32. Spettro Raman di *O.cf. ovata* in diverse fasi di crescita (esponenziale, plateau, senescente) e confronto con gli spettri di peridinina (pigmento) e palityossina. Le cellule sono fissate in paraformaldeide al 2%, a destra le cellule normali e a sinistra quelle depigmentate in acetone:esano (1:1).

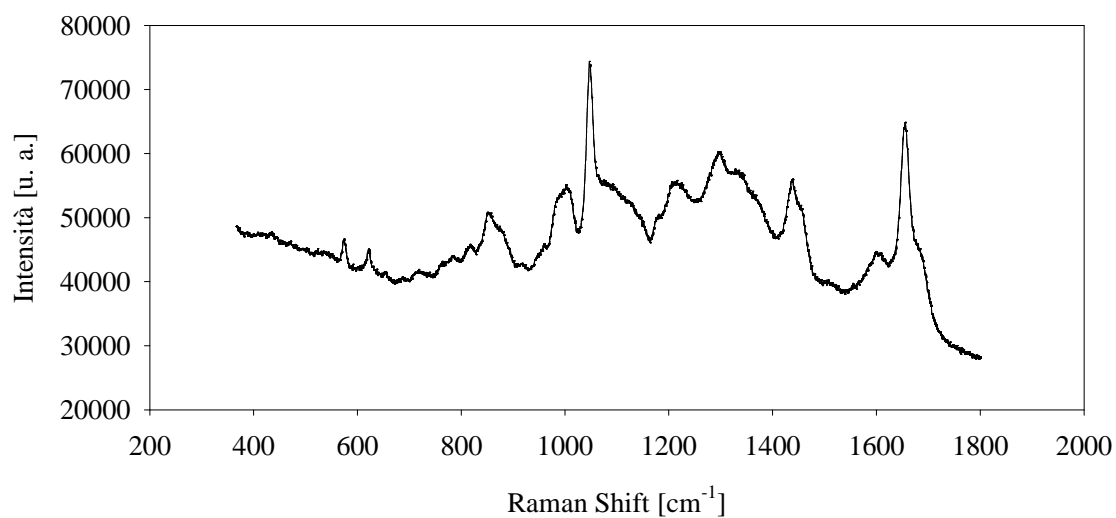


Figura 33. Spettro Raman della PLTX, campione commerciale in polvere (Wako).

4.5.4 Dati di HR LC-MS sul contenuto di tossine

In Tabella 9 e 10 sono riportati i contenuti in tossine rilevati all'HR LC-MS rispettivamente di colture cellulari (in diverse fasi di crescita) e popolazioni naturali (campionamento Canovella 1 e 2). In entrambi i casi, il componente maggiore è risultato l'ovatossina-a (OVA-a), con minori quantità di altre ovatossine (OVA-b, -c, -d/e). Il composto madre palitossina è presente in tracce nelle colture cellulari e addirittura non rilevabile nelle popolazioni naturali.

Tabella 9. Contenuto in palitossina ed ovatossine nelle colture di *Ostreopsis cf. ovata* in diverse fasi di crescita ottenuto dalle analisi HR LC-MS.

Campioni	Contenuto di tossine (pg/cellula)					
	PLTX	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d/e	Totale
<i>O. ovata</i> , fase esponenziale	0.03	7.5	3.6	0.6	1.6	13.33
<i>O. ovata</i> , fase di plateau	0.04	9.5	4.6	0.9	2.3	17.34
<i>O. ovata</i> , fase di senescenza	0.08	19.7	9.3	1.5	4.4	34.98

Tabella 10. Contenuto in palitossina (PLTX) ed ovatossine (OVAs) delle popolazioni naturali di *Ostreopsis cf. ovata* campionate nel settembre 2009 a Canovella de' Zoppoli ottenuto dalle analisi HR LC-MS. Nr=non rilevabile.

Tossina	Canovella 1		Canovella 2	
	pg/cellula	%	pg/cellula	%
PLTX	Nr	--	Nr	--
OVTX-a	45	77	64	89
OVTX-b	8	14	4	5
OVTX-c	Nr	--	0.7	1
OVTX-d/e	5	9	3	4
Totale	58	--	71.7	--

5. DISCUSSIONE

5.1 Tossicità da palitossine e implicazioni di salute pubblica

I risultati ottenuti per la tossicità orale della palitossina esposti in questa tesi sono in accordo con i precedenti dati di letteratura (Munday, 2006; Ito e Yasumoto, 2009; Munday, 2010), ma utilizzano un campione di animali significativamente più ampio, che consente una analisi dei danni a livello istologico e citologico e l'utilizzo dei valori calcolati di DL₅₀ e di NOEL per definire quali possano essere le concentrazioni di tossina nei prodotti ittici, che non provochino problemi sanitari. All'inizio della nostra ricerca, mancavano infatti dati recenti sulla tossicità orale della palitossina per potere determinare l'Acute Reference Dose (ARfD), cioè la dose di tossina che non provoca effetti tossici dopo assunzione acuta della tossina in un pasto o in un giorno. Dall'ARfD, il legislatore può quindi procedere alla determinazione delle concentrazioni di tossina ammissibili nei prodotti ittici, che non provochino effetti tossici nei consumatori. Questo dato era importante per tarare la sensibilità di nuovi metodi da utilizzare per la determinazione della tossina. Purtroppo, ad oggi, non esiste una legislazione in merito

Prendendo in considerazione i dati da noi ottenuti (Sosa et al., 2009) e gli altri lavori presenti in letteratura, il gruppo per la palitossina della European Food Safety Authority (EFSA) ha indicato in 200 µg/kg la dose più bassa alla quale è osservabile un effetto nocivo (LOAEL) per la somministrazione orale in topo (EFSA, 2009). Per traslare il dato all'uomo sono stati considerati un fattore di incertezza di 10 per la variabilità intraspecie, 10 per il passaggio dal modello murino all'uomo e 10 per l'impossibilità di escludere un eventuale assorbimento a livello della mucosa orale e perché i topi sembrano meno sensibili di altre specie. La dose orale acuta di riferimento

(ARfD) per l'uomo viene pertanto ad essere di 0.2 µg di tossina per kg di peso corporeo, considerata per la somma di palitossina e ostreocina-D, le due tossine per le quali erano disponibili dati tossicologici al momento della valutazione dell'EFSA. Considerando un soggetto medio di 60 kg ed una porzione abbondante di mitili di 400 g di polpa, questo si traduce nel limite di 30 µg di PLTX/Ost-D per kg di parte edibile di molluschi (EFSA, 2009). Tale dato non tiene conto di possibili effetti di tossicità a lungo termine, di cui non sono disponibili dati di letteratura tali da poter definire la dose giornaliera tollerabile (TDI).

La DL_{50} calcolata di 767 µg/kg per la somministrazione orale nel topo è 1000 volte più alta rispetto a quella riportata per la tossicità intraperitoneale (< 1 µg/kg; Levine et al., 1987; Rhodes et al., 2002; Riobó et al., 2008a). In generale, vi è una forte differenza tra la tossicità parenterale e quella orale della palitossina, come suggerito nei primi studi su ratto (Wiles et al., 1974). Questo indica che l'assorbimento a livello gastro-intestinale è molto basso: probabilmente le sue grandi dimensioni e il carattere idrofilico ne ostacolano l'assorbimento a livello della mucosa gastrica o intestinale. Per gli stessi motivi è anche difficile un assorbimento sublinguale.

I sintomi rilevati nelle 24 ore di osservazione dopo somministrazione orale sono analoghi a quelli riportati in letteratura per la somministrazione intraperitoneale (Rhodes et al., 2002; Riobó et al., 2008a), suggerendo un comune meccanismo di azione della tossina. Tali sintomi comprendono jumping, difficoltà motorie, paralisi degli arti posteriori e difficoltà respiratorie. Il sistema neuromuscolare sembra quindi essere uno degli organi bersaglio della palitossina: anche i parametri ematoclinici, con elevati livelli di CPK, LDH e AST, fanno ipotizzare un interessamento del tessuto muscolare. Gli elevati livelli di AST rispetto a quelli di ALT, in concomitanza all'aumento di CPK e LDH, suggeriscono più specificamente danni al tessuto muscolare piuttosto che a livello epatico (Hoffmann et al., 1999; Quimby, 1999).

La limitata quantità di sangue prelevabile dai topi non ha consentito di discriminare le isoforme cardiache della CPK o altri enzimi tessuto specifici, ma è plausibile che la morte sopravvenga per gli effetti sulla muscolatura diaframmatica e cardiaca. Mialgia, mioglobinuria e alti livelli plasmatici degli enzimi indicatori di danni muscolari sono riportati anche nei casi di intossicazione umana attribuiti a palitossina, così come alterazioni elettrocardiografiche (Munday, 2008; Deeds and Schwartz, 2010, Tubaro et al., 2011).

L'analisi istologica in microscopia ottica non ha mostrato danni evidenti del tessuto muscolare scheletrico o cardiaco. A livello ultrastrutturale, con la microscopia elettronica a trasmissione, sono invece state rilevate alterazioni rispetto ai controlli quali aggregazioni di mitocondri e disorganizzazione delle fibre contrattili, sia nel tessuto muscolare scheletrico che in quello cardiaco.

L'azione della palitossina a livello del tessuto muscolare è in accordo con le sue forti proprietà di depolarizzazione sui tessuti eccitabili e con l'azione sulla pompa sodio-potassio. L'evidenza di danni solo a livello ultrastrutturale, in presenza di alterati parametri ematoclinici specifici, potrebbe indicare che la tossicità si esprima attraverso un danno funzionale (incapacità della cellula di mantenere i corretti gradienti ionici per l'apertura della pompa sodio-potassio) piuttosto che tramite un danno diretto al tessuto.

Infiammazione acuta (leggera o moderata) è stata riscontrata a livello dello stomaco non ghiandolare nei topi sopravvissuti alle 24 ore ma non nei topi deceduti entro le 9, indicando che la risposta infiammatoria richiede diverse ore per risultare visibile. Essendo lo stomaco non ghiandolare tipico dei roditori, questo dato non è predittivo di una eventuale tossicità gastrica della palitossina sull'uomo.

Le altre alterazioni istologiche riscontrate a livello epatico o pancreatico possono essere ricollegate ad un generale ed aspecifico peggioramento delle condizioni di salute dei topi prima del decesso, piuttosto che ad un effetto diretto della tossina su questi organi.

La 42-OH-PLTX, analogo della palitossina scoperto e caratterizzato durante il periodo il dottorato, ha mostrato un comportamento analogo a quello del composto nativo per quanto riguarda tossicità orale, reattività in sandwich ELISA indiretto, proprietà emolitiche e capacità di spiazzare la ouabaina dalla NAKA. Tali dati indicano un meccanismo di azione comune per le due tossine, attraverso l'interazione con la pompa sodio-potassio.

Anche la sintomatologia rilevata nel corso dello studio della sua tossicità orale (jumping, difficoltà respiratorie, paralisi) e le alterazioni ematocliniche ricalcano quanto osservato per la PLTX, indicando anche in questo caso un'azione su tessuti eccitabili quali muscolo scheletrico e cardiaco. Come già sottolineato, l'aumento dei livelli di CPK, LDH e AST, con un elevato rapporto AST/ALT, suggeriscono che la causa sia un danno al tessuto muscolare piuttosto che al tessuto epatico (Hoffmann et al., 1999; Quimby, 1999).

Gli alti livelli ematici di potassio registrati negli esperimenti *in vivo* con la 42-OH-PLTX dalla dose di 848 µg/kg possono essere spiegati chiamando in causa l'apertura della pompa sodio-potassio da parte della tossina, con conseguente efflusso di potassio dalle cellule. Inoltre è noto che un'iperkaliemia può danneggiare i tessuti eccitabili di cuore e muscolo scheletrico causando mialgia, paralisi e disturbi cardiaci (Evans e Greenberg, 2005). Questo percorso collega direttamente il meccanismo di azione molecolare delle palitossine sulla pompa sodio-potassio ai sintomi ed alle alterazioni istologiche riscontrati *in vivo*, sia per gli studi qui descritti su modelli murini (Sosa et al., 2009; Tubaro et al., 2011b) che per i casi di esposizione umana riportati in letteratura (Munday, 2008; Deeds e Schwartz, 2010; Tubaro et al., 2011a).

È da sottolineare che il gruppo OH in posizione 42 del nuovo analogo è condiviso con l'ostreocina-D, il cui potere emolitico e reattività in ELISA sono risultati invece minori rispetto a quelli della palitossina in questo studio. Oltre alla PLTX, l'ostreocina-D è l'unica tossina prodotta da microalghe del genere *Ostreopsis* la cui struttura sia stata completamente caratterizzata e risulta essere una 42-idrossi-3,26-didemetil-19,44-dideossi-palitossina. Come riportato in letteratura, le

differenze strutturali tra PLTX e Ost-D, pur piccole per molecole di oltre 2600 Dalton, influenzano solo debolmente la tossicità acuta intraperitoneale nel topo (Usami et al., 1995), ma riducono molto la citotossicità su cellule P388 (di oltre 10 volte) e la potenza emolitica (di oltre 20 volte, in accordo con le nostre osservazioni) (Usami et al., 1995).

Nonostante la struttura della palitossina contenga oltre 40 gruppi OH, quello in posizione 42 appare particolarmente interessante perché vicino ad un carbonio emichetalico in posizione 47. Questo carbonio può formare il legame emichetalico alternativamente con l'ossidrile in C43 (palitossina nativa) o in C44, portando a due strutture isomeriche (Moore e Bartolini, 1981) in cui la presenza o meno dell'OH nel vicinale C42 può essere significativa da un punto di vista biologico.

Benchè l'ossidrile in posizione 42 sia condiviso dalle molte ostreocine, la 42-OH-PLTX non era mai stata riportata in letteratura in precedenza. Al momento non è noto se la relazione che lega la PLTX nativa con il 42-OH derivato, le ostreocine e gli altri analoghi, sia quella di intermedi di biosintesi o se siano composti finali differenti e specie-specifici.

Negli studi di "binding" al recettore non è stato ovviamente possibile misurare il "binding" diretto della PLTX e della 42-OH-PLTX sulla pompa sodio-potassio (NAKA), non disponendo di tossine triziate. Lo spiazzamento dell'ouabaina triziata avviene con analoga potenza da parte delle due tossine, indicando una simile occupazione del sito di legame sulla NAKA. Dalla letteratura è noto che la componente glicosidica dell'ouabaina è essenziale per impedire il legame della palitossina alla NAKA (Ozaki et al., 1984); ouabaina e palitossina hanno strutture chimiche profondamente differenti e quindi probabilmente anche un differente meccanismo di legame alla NAKA, ma è significativo notare come l'unica parte della molecola di ouabaina che potrebbe essere considerata affine alla PLTX sia a carico dello zucchero della ouabaina (L-ramnosio), in parte sovrapponibile alla porzione del legame emichetalico C43-C47 nella palitossina, a ridosso della posizione C42. Da questa considerazione si può avanzare l'ipotesi che una parte attiva della tossina nel legare la

NAKA sia la porzione C43-C47; per questo è motivato l'interesse verso gli analoghi che presentino modificazioni in prossimità di questa parte della molecola. Va anche considerato che a parità di legame alla NAKA non necessariamente corrisponde una uguale capacità di trasformarla in un canale ionico aspecifico. È noto che palitossine con l'estremità amminica bloccata sono fino a 100 volte meno biologicamente attive *in vitro* (Ohizumi et al., 1980), quindi anche questa parte della molecola (posizione C115) potrebbe essere essenziale per l'alterazione della NAKA e lo sviluppo degli effetti tossici, anche se molto distante dal C42.

5.2 Metodi per la rilevazione e lo studio delle palitossine e degli organismi produttori

Lo sviluppo di metodi per rilevare le palitossine si è articolato sui due filoni del test strutturale (ELISA) e del test funzionale (saggio emolitico). I due sistemi hanno mostrato, come prevedibile, una notevole differenza nel range di rilevabilità della tossina, attestato su 6–26 pM per il saggio emolitico e 500–15000 pM per il sandwich ELISA indiretto.

Si è puntato a sviluppare due tipi di metodi perché ognuno presenta specifici vantaggi che possono risultare utili a seconda delle prestazioni desiderate; è infatti improbabile riunire in un unico test ottime caratteristiche in termini di sensibilità, specificità, accuratezza, robustezza, economicità, versatilità e semplicità di esecuzione che possono essere desiderati in un metodo per la rilevazione delle palitossine. Il saggio emolitico è caratterizzato dall'elevata sensibilità e semplicità di esecuzione, ma è più soggetto ad interferenza da parte di altri componenti della matrice analizzata, come saponine o altre emolisine, e prevede l'utilizzo di derivati di origine animale (sangue) che pongono dei problemi sia etici che logistici. Il test immunoenzimatico dà una risposta più specifica per la palitossina e ha la versatilità di poter essere preparato in forma di kit commerciale pronto all'uso o traslato in forma di biosensore di più elevato valore tecnologico, ma ha una sensibilità minore rispetto ai saggi funzionali e rischia di rilevare anche derivati della palitossina non tossici.

Lo sviluppo di entrambi i saggi è stato condizionato da un comportamento ambiguo della tossina in soluzione, che è probabilmente all'origine della variabilità di dati presenti in letteratura per il saggio emolitico, le cui EC_{50} riportate su sangue di topo vanno da circa 1 pM (Onuma et al., 1999) a oltre 500 pM (Habermann et al., 1981a), e dei problemi indicati anche in test più recenti come il saggio citolitico su cellule MCF-7 (Bellocci et al., 2008a; con relativo addendum Bellocci et al., 2008b). Il saggio ELISA ha riscontrato i maggiori problemi, probabilmente perché le numerose ibridazioni sp^3 nella molecola della palitossina le conferiscono una notevole libertà conformazionale in soluzione che, unitamente alle caratteristiche anfipatiche, ne ostacola il riconoscimento da parte degli anticorpi. Va inoltre sottolineato che la tossina in soluzione si presenta come dimero (Inuzuka et al., 2007, 2008), mentre entrambi gli anticorpi anti-PLTX utilizzati in questo studio sono prodotti contro coniugati PLTX-BSA in cui la tossina è presentata in forma monomerica.

È stata scelta l'architettura del sandwich ELISA indiretto perché il legame diretto della palitossina alla piastra in "coating" dava, nelle prove preliminari, un segnale molto basso, probabilmente a causa del mascheramento dell'epitopo dovuto all'adsorbimento della molecola. Benché una configurazione di sandwich ELISA ottimale preveda l'uso di due anticorpi monoclonali, a causa dell'insuccesso delle tecniche di *phage display* intraprese per l'isolamento di anticorpi ScFv anti-PLTX, il test è stato sviluppato con un anticorpo monoclonale noto dalla letteratura (73D3) e con un anticorpo policlonale di coniglio sviluppato in sede. Di questo policlonale ovviamente non sono disponibili ibridomi per una sua produzione in serie, ma la quantità di siero immune a disposizione è sufficiente per molti esperimenti (sull'ordine di oltre 100.000 test ELISA), coprendo abbondantemente le necessità della ricerca di laboratorio o del monitoraggio locale. Analogamente, il sandwich in configurazione invertita, ovvero con l'anticorpo policlonale di coniglio in cattura e

l'anticorpo monoclonale di topo in riconoscimento non ha dato un segnale utile a causa di una crossreattività dell'anticorpo secondario commerciale anti-IgG di topo verso le IgG di coniglio.

L'antigene usato per la produzione di entrambi gli anticorpi è un coniugato PLTX-BSA prodotto con la tossina estratta da *P. tuberculosis* che, come descritto in § 4.2.1 relativamente all'identificazione della 42-OH-PLTX, è risultata essere una miscela al 50 % di palitossina e 42-idrossi derivato. È quindi normale che la risposta del test ELISA sia confrontabile per le due tossine. L'ostreocina-D è risultata invece meno reattiva (di circa 10 volte); considerando la sua struttura (42-idrossi-3,26-didemetil-19,44-dideossi-palitossina) si può supporre che l'anticorpo monoclonale e/o policlonale siano diretti almeno in parte verso la porzione idrossi-terminale della molecola, dove sono appunto accumulate le differenze strutturali con la PLTX. L'ostreocina-D è l'unica tossina prodotta da microalghe del genere *Ostreopsis* la cui struttura sia stata caratterizzata e che sia disponibile in quantità adeguate per esperimenti di sandwich ELISA; rimangono da stabilire le prestazioni di questo test verso altre tossine di *Ostreopsis* come le ovatossine, altrettanto importanti per i risvolti di salute pubblica, in particolare in Italia.

Inoltre, il sandwich ELISA indiretto sviluppato ha mostrato una ottima specificità per la palitossina, non riconoscendo altre tossine algali che possono essere co-presenti con la palitossina come acido okadaico, acido domoico, yessotossina, brevetossina-3 e saxitossina fino 100 µg/ml (10,000 volte superiori a quelle riconosciute per la palitossina).

Il campione di palitossina biotinilata utilizzato ha mostrato una buona stabilità, risultando reattivo ancora ad un anno dalla sua preparazione e mantenendo una risposta costante negli esperimenti effettuati; per questo si è deciso di ultimare la messa a punto del saggio utilizzando questo coniugato. Tuttavia, diluizioni di 5 µg/ml di PLTX-biotina preparate dalla soluzione madre 5 mg/ml sono risultate instabili in tutti i tamponi/solventi testati (acqua, DMSO, PBS, Tris, tampone carbonato), mostrando un significativo calo del segnale dopo 6 giorni, se conservata a 4°C.

Abbiamo pertanto ipotizzato che nella soluzione madre di 5 mg/ml di PLTX-biotina, l'elevata concentrazione della tossina giochi un ruolo nel prevenire il calo del segnale, assieme alla stabilizzazione della forma monomerica conseguente al blocco del gruppo amminico terminale dovuto al legame alla biotina. Va inoltre considerato che il coniugato PLTX-biotina è stato prodotto con lo stesso campione di PLTX estratto da *P. tuberculosis* (miscela 50 % PLTX / 42-OH-PLTX) contro cui sono stati preparati gli anticorpi monoclonale e policlonale; è quindi possibile che questi presentino verso la PLTX-biotina una maggiore specificità antigenica rispetto allo standard commerciale di PLTX (Wako). Utilizzando la PLTX-biotina come calibratore nel saggio, sarà necessario confrontare la sua reattività con quella della palitossina commerciale e con quella degli analoghi disponibili, per una corretta quantificazione in campioni naturali.

Il saggio emolitico su sangue di topo si è dimostrato in grado di rilevare la tossina a livelli di concentrazione picomolari; PLTX e 42-OH-PLTX hanno mostrato una potenza comparabile, mentre l'ostrecina-D, come già indicato, è risultata meno potente, in accordo a quanto osservato in letteratura (Usami et al., 1995; Onuma et al., 1999).

Gli anticorpi anti-PLTX si sono dimostrati in grado di inibire l'azione emolitica delle palitossine, potendo quindi essere usati per discriminare la lisi specifica da quella aspecifica nell'analisi di campioni naturali. Si può notare come l'utilizzo di anticorpi non inibisca completamente la lisi ma si limiti a ridurre le EC_{50} delle tossine, nonostante siano ovviamente presenti in largo eccesso (25 μ g/ml di anticorpi corrispondenti a circa 150 nM sulla base di un peso molecolare medio di 150,000 Dalton, a fronte di una concentrazione massima di tossina 2.5 nM), come osservato anche in letteratura (Onuma et al., 1999). Questo dato può essere spiegato supponendo che:

- 1) il complesso anticorpo-PLTX possieda ancora limitate capacità di interagire con la NAKA;
- 2) durante le 4 ore di incubazione, la PLTX già legata all'anticorpo, possa in parte dissociarsi ed interagire con la NAKA;

3) l'effetto biologico della tossina si realizzi durante i primi minuti di incubazione, prima che possa il legame con l'anticorpo arrivi a saturazione.

La leggera differenza di potere inibitorio sull'emolisi da Ostreocina-D da parte dei due anticorpi, con il policlonale più efficace del monoclonale, potrebbe essere giustificata considerando la possibilità da parte del policlonale di riconoscere diversi epitopi sulla Ost-D rispetto al monoclonale, superando così le differenze strutturali con la PLTX. In alternativa, può essere chiamata in causa la minore specificità dell'anticorpo policlonale nei confronti della palitossina, rispetto all'anticorpo monoclonale.

Per quanto gli eritrociti di topo siano classificati tra quelli più sensibili alla palitossina (Habermann et al., 1981a), l'utilizzo delle altre fonti riportate in letteratura è giustificato dal fatto che il sangue di roditori è insensibile ai glicosidi cardioattivi, come la ouabaina (Ozaki et al., 1984), utilizzati per inibire l'azione della palitossina. Poiché l'uso di un inibitore è essenziale nell'analisi di campioni naturali per discriminare la lisi PLTX-dipendente, nel caso di utilizzo di sangue murino è necessario includere una neutralizzazione dell'emolisi con anticorpi, non sempre disponibili. Considerata la maggiore sensibilità del sangue di topo riscontrata anche nei nostri esperimenti e la disponibilità degli anticorpi anti-PLTX utilizzati per il test immunoenzimatico, abbiamo deciso di continuare ad utilizzare il modello murino.

Vi è in letteratura la tendenza ad allungare il tempo di incubazione del saggio emolitico allo scopo di migliorarne la ripetibilità (Riobò et al., 2008b). In un lavoro recente sono proposte come condizioni per l'emolisi utilizzando sangue di pecora un'incubazione di 18 ore a 25°C, in presenza di ouabaina 5 μ M per migliorare la stabilità degli eritrociti. In questo lavoro di tesi abbiamo preferito considerare il saggio emolitico come un valido test di screening, utile per la sua elevata sensibilità e semplicità di esecuzione, da affiancare, per una maggiore precisione di risposta, a metodi chimici come LC-MS in grado di dare un profilo quali-quantitativo delle tossine presenti. In

questo senso abbiamo preferito puntare ad una riduzione dei tempi di incubazione, piuttosto che al loro allungamento.

Dalle prove effettuate è risultato che un tampone al 62 % di PBS con calcio cloruro 1 mM e acido borico 1 mM è in grado di produrre in 1 ora di incubazione a 37°C una emolisi identica a quella ottenuta nel saggio normale (4 ore di incubazione a 37°C in PBS 100 %). Ciò sottende al meccanismo intrinsecamente osmotico con cui la palitossina induce la lisi eritrocitaria (Haberman, 1989). Questa modifica nella procedura ha il vantaggio di ridurre sostanzialmente i tempi di esecuzione, permettendo di fare più prove nella stessa giornata. In linea di principio sarebbe possibile ridurre ulteriormente i tempi di incubazione aumentando la diluizione del tampone, dal momento che la perdita di potassio cellulare (evento primario indotto dalla PLTX) si verifica entro pochi minuti di incubazione (Ahnert-Hilger et al., 1982).

È interessante notare che in 1 ora di incubazione in PBS al 100 % non si rileva invece alcuna emolisi; questo aspetto è particolarmente interessante perché, in un campione incognito, permetterebbe di distinguere l'emolisi dovuta a palitossina da una emolisi aspecifica semplicemente eseguendo il saggio in 1 ora, in parallelo nei due tamponi. In questo caso, gli esiti possibili sono 3:

- 1) Tampone 62 % negativo e tampone 100 % negativo: assenza di palitossina nel campione (o $PLTX < \sim 6$ pM, nelle nostre condizioni sperimentali);
- 2) Tampone 62 % positivo e tampone 100 % negativo: presenza di palitossina fortemente probabile nel campione. È suggerita la conferma con metodi di riferimento (LC-MS);
- 3) Tampone 62 % positivo e tampone 100 % positivo: lisi dovuta a fattori aspecifici, non è possibile esprimersi in merito alla presenza di palitossina, si suggerisce di aumentare la diluizione o migliorare la procedura di estrazione e comunque verificare la presenza di palitossina con metodi di riferimento (LC-MS).

In altre parole, il maggiore contenuto di sali nel tampone al 100 % sembrerebbe agire da inibitore dell'emolisi al pari della ouabaina o degli anticorpi anti-PLTX. Il dato è interessante se si considera

che gli anticorpi anti-PLTX possono essere difficili da reperire non essendo disponibili commercialmente e che la ouabaina, come detto in precedenza, è inattiva sugli eritrociti di topo.

Sia per il saggio emolitico che per il test ELISA, superata la fase di messa a punto con gli standard di tossina, sarà necessario passare alla valutazione dell'effetto matrice, ovvero quanto le caratteristiche del campione naturale da analizzare e la procedura di estrazione influiscono sulle performance dei saggi. Come test di riferimento andrà utilizzata la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HR LC-MS), test attualmente utilizzato per quantificare la tossina in campioni naturali. Sarà inoltre un dato prezioso valutazione della risposta di questi test verso le ovatossine, se disponibili in quantità sufficienti, essendo questi analoghi prodotti dai ceppi di *O. ovata* tipicamente implicati nei casi di proliferazioni algali nelle acque locali. In realtà, un primo dato qualitativo sull'affinità degli anticorpi anti-PLTX nei confronti delle ovatossine è già stato ottenuto dai dati di immunocitochimica, riportati in questa tesi, eseguita sulle cellule di *Ostreopsis cf. ovata* del Golfo di Trieste in cui, mediante HR LC-MS, sono state rilevate solo ovatossine (Honsell et al., submitted).

La proliferazione di *Ostreopsis* del settembre 2009 nel Golfo di Trieste, ha anche permesso di migliorare la conoscenza dei ceppi locali di questo organismo. Le tecniche immunocitochimiche sono state usate per la prima volta per ricercare le palitossine negli organismi produttori e, oltre a confermare la presenza di palitossina nei ceppi di *O. ovata* del nord Adriatico, hanno permesso di dimostrare la loro localizzazione citoplasmatica, escludendo un accumulo eventuale in specifici compartimenti subcellulari. Considerati i dati di HR LC-MS che indicano l'assenza di PLTX nelle popolazioni naturali e una preponderanza di ovatossina-a, si può dedurre la capacità degli anticorpi anti-PLTX di riconoscere anche le ovatossine, quali analoghi della palitossina con solo piccole differenze strutturali.

A conferma della specificità del segnale, cellule di *Coolia monotis*, un dinoflagellato non produttore di palitossine, sono risultate negative per la PLTX sia all'analisi immunocitochimica che nell'analisi HR LC-MS di conferma. Questo risultato è importante anche da un punto di vista pratico, perché *Coolia monotis* è stata quasi sempre rilevata insieme ad *Ostreopsis*. Inoltre, poiché i dinoflagellati non sempre producono tossine, l'identificazione tramite immuno-citochimica, anche se fornisce solo risultati qualitativi, può dare una allerta precoce del fenomeno, da confermare poi con metodi quantitativi.

Anche la spettroscopia Raman è stata applicata per la prima volta a microalghe del genere *Ostreopsis* e ha consentito di confermare la presenza del pigmento carotenoidale peridrina, in parte responsabile dell'autofluorescenza rossa di questi organismi.

L'assenza di segnali chiaramente attribuibili alla palitossina negli spettri Raman può essere dovuta alla sua uniforme diffusione citoplasmatica, come visualizzato in immunocitochimica, piuttosto che alla bassa concentrazione. Considerando che le ovatossine differiscono dalla palitossina solo per la posizione/presenza di pochi gruppi ossidrilici (non ancora determinati), possiamo ipotizzare che abbiano lo stesso spettro Raman della PLTX. Lo spettro Raman della palitossina, finora assente in letteratura, usato come riferimento è stato registrato da un campione di tossina commerciale (Wako).

La tecnica Raman ha mostrato un potenziale nella caratterizzazione della composizione lipidica di *Ostreopsis*, come già applicato su altre specie algali di interesse industriale (Samek et al., 2010). Inoltre, essa potrebbe rappresentare uno strumento utile anche per rilevare modificazioni biochimiche nelle cellule di *Ostreopsis* che potrebbero essere associate alla produzione e/o al rilascio di palitossina, argomento su cui non è ancora stata fatta luce.

E' stata riportata in letteratura l'applicazione di sistemi Raman portatili per l'analisi rapida, senza lunghe procedure estrattive e direttamente sul campo di popolazioni microalgali (Wood et al., 2005, Wu et al., 1998). La differenziazione tassonomica è stata ottenuta dal confronto degli spettri sui

segnali di beta-carotene e clorofille. In questo, senso una migliore conoscenza delle proprietà in spettroscopia Raman di *Ostreopsis* potrebbe fornire la base per il suo monitoraggio con questa tecnica.

L'analisi mediante HR LC-MS delle popolazioni naturali di *Ostreopsis cf. ovata* rilevate nel Golfo di Trieste nel settembre 2009 (campioni Canovella 1 e 2), ha indicato l'ovatossina-a come il maggior componente (circa 80 %, 45-64 pg/cellula), mentre la palitossina non è stata rilevata: questa è la prima volta che in popolazioni naturali di *O. ovata* sono identificate solo ovatossine, senza PLTX. Appena disponibili in quantità sufficienti, sarà interessante verificarne la tossicità dopo somministrazione orale nel topo, per confrontarne la potenza rispetto a quella della palitossina. Sembra infatti che quantità anche significative di composti palitossino-simili (che potrebbero essere ovatossine, vista la mancanza di standard commerciali) siano state rilevate in vari prodotti ittici (mitili, ricci di mare e polpi), raccolti in Mar Mediterraneo (EFSA et al., 2009; Aligizaki et al., 2011).

Il contenuto di ovatossina-a per cellula nei campioni di Canovella sembra leggermente maggiore di quello di altri campioni ottenuti da colture di *O. ovata* dell'Adriatico, quantificati a 18-42 pg/cellula (Ciminiello et al., 2010a; Guerrini et al., 2010) e molto maggiore di quello precedentemente trovato in campioni liguri (sia in colture che in popolazioni naturali) e tirrenici (in colture). Questo conferma le precedenti osservazioni da cui i campioni del nord Adriatico sembrano avere un maggior contenuto in tossine rispetto a campioni liguri (Bellocci et al., 2008) e tirrenici (Guerrini et al., 2010; Rossi et al., 2010).

Le colture di *O. ovata* hanno mostrato, come le relative popolazioni naturali, un contenuto prevalente in ovatossina-a (circa 55 %, 7.5–19.7 pg/cellula) e minori quantità di altre ovatossine, con la palitossina presente in tracce (< 0.1 pg/cellula). Il contenuto in tossine aumenta con l'età della coltura, con le cellule in fase senescente (giorno 25 dall'avvio della coltura) contenenti circa il doppio di tossina rispetto alle cellule in fase stazionaria (giorno 18). Analogamente a quanto si

verifica per altri metaboliti secondari negli organismi vegetali, l'accumulo di queste tossine raggiunge il massimo generalmente verso la fine del ciclo vitale.

In conclusione, lo sviluppo di nuove tecniche per l'analisi delle palitossine e/o di *Ostreopsis*, come il test ELISA, il saggio emolitico, l'immunocitochimica o la spettroscopia Raman, affiancate a metodiche consolidate come la spettrometria di massa, potrà fornire un'allerta precoce per il manifestarsi di una proliferazione algale sicuramente tossica o evidenziare la presenza di palitossine prima della loro massiva diffusione nell'ambiente e/o concentrazione in prodotti alimentari di origine marina, permettendo la salvaguardia della salute pubblica.

6. BIBLIOGRAFIA

Ahnert-Hilger, G.; Chhatwal, G.S.; Hessler, H.J.; Habermann, E. (1982). Changes in erythrocyte permeability due to palytoxin as compared to amphotericin B. *Biochimica et Biophysica Acta* 688: 486-494.

Alcala, A.C.; Alcala, L.C.; Garth, J.S.; Yasumura, D.; Yasumoto, T. (1988). Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon* 26: 105-107.

Aligizaki, K.; Katikou, P.; Nikolaidis, G.; Panou, A. (2008). First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* 51: 418-427.

Aligizaki, K.; Katikou, P.; Milandri, A.; Diogène, J. (2011). Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon*, in press.

Amir, I.; Harris, J.B.; Zar, M.A. (1997). The effect of palytoxin on neuromuscular junctions in the anococcygeus muscle of the rat. *Journal of Neurocytology* 26: 367-376.

Anner, B.M.; Moosmayer, M. (1994). Na,K-ATPase characterized in artificial membranes. 2.

Successive measurement of ATP-driven Rb-accumulation, ouabain-blocked Rb-flux and palytoxin-induced Rb-efflux. *Molecular membrane biology* 11: 247-254.

Arakawa, O.; Hwang, D.-F.; Taniyama, S.; Takatani, T. (2010). Toxins of Pufferfish that Cause Human Intoxications. In: Ishimatsu, A., Lie, H.-J. (Eds.), *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea*. Terrapub and Nagasaki University, Nagasaki, pp. 227–244.

Ares, I.R.; Louzao, M.C.; Vieytes, M.R.; Yasumoto, T.; Botana, L.M. (2005). Actin cytoskeleton of rabbit intestinal cells is a target for potent marine phycotoxins. *Journal of Experimental Biology* 208: 4345-4354.

Barroso García, P.; Rueda de la Puerta, P.; Parrón Carreño, T.; Marín Martínez, P.; Guillén Enríquez, J. (2008). Brote con síntomas respiratorios en la provincia de Almería por una posible exposición a microalgas tóxicas. *Gac. Sanit* 22: 578–584.

Battocchi, C.; Totti, C.; Vila, M.; Masó, M.; Capellacci, S.; Accoroni, S.; Reñe, A.; Scardi, M.; Penna, A. (2010). Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy. *Mar. Pollut. Bull.* 60: 1074–1084.

Bellocci, M.; Ronzitti, G.; Milandri, A.; Melchiorre, N.; Grillo, C.; Poletti, R.; Yasumoto, T.; Rossini, G.P. (2008a). A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured monolayer cell line. *Analytical Biochemistry* 374: 48-55.

Bellocci, M.; Ronzitti, G.; Milandri, A.; Melchiorre, N.; Grillo, C.; Poletti, R.; Yasumoto, T.; Rossini, G.P. (2008b). Addendum to "A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured monolayer cell line" [*Anal. Biochem.* 374 (2008) 48-55]. *Analytical biochemistry* 381: 178.

- Bignami, G.S.; Raybould, T.J.G.; Sachinvala, N.D.; Grothaus, P.G.; Simpson, S.B.; Lazo, C.B.; Byrnes, J.B.; Moore, R.E.; Vann, D.C. (1992). Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassays for the measurement of palytoxin in biological samples. *Toxicon* 30: 687-700.
- Bignami, G.S. (1993). A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon* 31: 817-820.
- Bottinger, H.; Habermann, E. (1984). Palytoxin binds to and inhibits kidney and erythrocyte Na^+, K^+ -ATPase. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 325: 85-87.
- Bottinger, H.; Beress, L.; Habermann, E. (1986). Involvement of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in binding and actions of palytoxin on human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 861: 165-176.
- Brescianini, C.; Grillo, C.; Melchiorre, N.; Bertolotto, R.; Ferrari, A.; Vivaldi, B.; Icardi, G.; Gramaccioni, L.; Funari, E.; Scardala, S. (2006). *Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006. *Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 11
- Cañete, E.; Diogène, J. (2008). Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma × glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon* 52: 541-550.
- Castle, N.A.; Strichartz, G.R. (1988). Palytoxin induces a relatively non-selective cation permeability in frog sciatic nerve which can be inhibited by cardiac glycosides. *Toxicon* 26: 941-951.

Cha, J.K.; Christ, W.J.; Finan, J.M.; Fujioka, H.; Kishi, Y., Klein, L.L.; Ko, S.S.; Leder, J.; McWhorter Jr., W.W.; Pfaff, K.-P.; Yonaga, M.; Uemura, D.; Hirata, Y. (1982). Stereochemistry of palytoxin. 4. Complete structure. *Journal of the American Chemical Society* 104: 7369-7371.

Charlson, A.T.; Zeliadt, N.A.; Wattenberg, E.V. (2009). Extracellular signal regulated kinase 5 mediates signals triggered by the novel tumor promoter palytoxin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 241: 143-153.

Chhatwal, G.S.; Ahnert-Hilger, G.; Beress, L.; Habermann, E. (1982). Palytoxin both induces and inhibits the release of histamine from rat mast cells. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 68: 97-100.

Chhatwal, G.S.; Hessler, H.J.; Habermann, E. (1983). The action of palytoxin on erythrocytes and resealed ghosts. Formation of small, nonselective pores linked with Na⁺,K⁺-ATPase. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 323: 261-268.

Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, G.S.; Tartaglione, L.; Grillo, C.; Melchiorre, N. (2006). The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Analytical Chemistry* 78: 6153-6159.

Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Tartaglione, L.; Grillo, C.; Melchiorre, N. (2008). Putative Palytoxin and Its New Analogue, Ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* Collected Along the Ligurian Coasts During the 2006 Toxic Outbreak. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19: 111-120.

Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Grauso, L.; Tartaglione, L.; Florio, C.; Lorenzon, P.; De Bortoli, M.; Tubaro, A.; Poli, M.; Bignami, G. (2009). Stereostructure and biological activity of 42-hydroxy-palytoxin: A new palytoxin analogue from Hawaiian *Palythoa* subspecies. *Chemical Research in Toxicology* 22: 1851-1859.

Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Iacovo, E.D.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Grauso, L.; Tartaglione, L.; Guerrini, F.; Pistocchi, R. (2010a). Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24: 2735-2744.

Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Iacovo, E.D.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Tartaglione, L. (2010b). LC-MS of palytoxin and its analogues: State of the art and future perspectives. *Toxicon*, in press.

Deeds, J.R.; Schwartz, M.D. (2010). Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon* 56: 150-162.

Deguchi, T.; Urakawa, N.; Takamatsu, S. (1976). Some pharmacological properties of palythoatoxin isolated from the zoanthid, *Palythoa tuberculosa*. In: A. Ohsaka, K. Hayashi e Y. Sawai, Editori, *Animal, Plant and Microbial Toxins* vol. 2: 379–394. Plenum Press, New York.

Di Turi, L.; Lo Caputo, S.; Marzano, M.C.; Pastorelli, A.M.; Pompei, M.; Rositani, L.; Ungaro, N. (2003). Ostropsidiaceae (Dinophyceae) presence along the coastal area of Bari. *Biol. Mar. Mediterr.* 10: 675–678.

- Dubois, J.M.; Cohen, J.B. (1977). Effect of palytoxin on membrane and potential and current of frog myelinated fibers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 201: 148-155.
- Durando, P.; Ansaldi, F.; Oreste, P., Moscatelli, P.; Marensi, L.; Grillo, C.; Gasparini, R.; Icardi, G. (2007). *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two year syndromic surveillance, 2005–2006, in north-west Italy. *Euro Surveill.* 12.
- Ecault, E.; Sauviat, M.-P. (1991). Characterization of the palytoxin-induced sodium conductance in frog skeletal muscle. *British Journal of Pharmacology* 102: 523-529.
- EFSA (European Food Safety Authority), (2009). Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish - palytoxin group. *EFSA Journal* 7: 1393, 1-38.
- Espiña, B.; Cagide, E.; Louzao, M.C.; Fernandez, M.M.; Vieytes, M.R.; Katikou, P.; Villar, A.; Jaen, D.; Maman, L.; Botana, L.M. (2009). Specific and dynamic detection of palytoxins by in vitro microplate assay with human neuroblastoma cells. *Bioscience reports* 29: 13-23.
- Evans, K.J.; Greenberg, A. (2005). Hyperkalemia: a review. *J. Intensive Care Med.* 20: 272-290.
- Falciola, J.; Volet, B.; Anner, R.M.; Moosmayer, M.; Lacotte, D.; Anner, B.M. (1994). Role of cell membrane Na,K-ATPase for survival of human lymphocytes in vitro. *Bioscience Reports* 14: 189-204.
- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis, terza ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Frelin, C.; Van Renterghem, C. (1995). Palytoxin. Recent electrophysiological and pharmacological evidence for several mechanisms of action. *General Pharmacology* 26: 33-37.

Frolova, G.M.; Kuznetsova, T.A.; Mikhailov, V.V.; Elyakov, G.B. (2000). An enzyme linked immunosorbent assay for detecting palytoxin-producing bacteria. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 26: 285-289.

Fujiki, H.; Suganuma, M.; Nakayasu, M. (1986). Palytoxin is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 7: 707-710.

Gadsby, D.C.; Takeuchi, A.; Artigas, P.; Reyes, N. (2009). Peering into an ATPase ion pump with single-channel recordings. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 229-238.

Gallitelli, M.; Ungaro, N.; Addante, L.M.; Procacci, V.; Gentiloni, N.; Sabbà, C. (2005). Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *JAMA* 293: 2599-2600.

Garet, E.; Cabado, A.G.; Vieites, J.M.; González-Fernández, Á. (2010). Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: Palytoxin. *Toxicon* 55: 1519-1526.

Gleibs, S.; Mebs, D. (1999). Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon* 37: 1521-1527.

- Guerrini, F.; Pezzolesi, L.; Feller, A.; Riccardi, M.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Tartaglione, L.; Iacovo, E.D.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Pistocchi, R. (2010). Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* 55: 211-220.
- Habermann, E.; Ahnert-Hilger, G.; Chhatwal, G.S.; Beress, L. (1981a). Delayed haemolytic action of palytoxin. General characteristics. *Biochimica et Biophysica Acta* 649: 481-486.
- Habermann, E.; Chhatwal, G.S.; Hessler, H.J. (1981b). Palytoxin raises the nonspecific permeability of erythrocytes in an ouabain sensitive manner. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 317: 13.
- Habermann, E.; Chhatwal, G.S. (1982). Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 319: 101-107.
- Habermann, E. (1983). Action and binding of palytoxin, as studied with brain membranes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 323: 269-275.
- Habermann, E. (1989). Palytoxin acts through Na⁺,K⁺-ATPase. *Toxicon* 27: 1171-1187.
- Habermann, E.; Hudel, M.; Dauzenroth, M.-E. (1989). Palytoxin promotes potassium outflow from erythrocytes, Hela and bovine adrenomedullary cells through its interaction with Na⁺, K⁺-ATPase. *Toxicon* 27: 419-430.
- Harmel, N.; Apell, H.-J. (2006). Palytoxin-induced effects on partial reactions of the Na,K-ATPase. *Journal of General Physiology* 128: 103-118.

Hilgemann, D.W. (2003). From a pump to a pore: How palytoxin opens the gates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 386-388.

Hirata, Y.; Uemura, D.; Ueda, K.; Takano, S. (1979). Several compounds from *Palythoa tuberculosa* (Coelenterata). *Pure appl. Chem.* 51: 1875–1883.

Hoffmann, K.; Hermanns-Clausen, M.; Buhl, C.; Büchler, M.W.; Schemmer, P.; Mebs, D.; Käuferstein, S. (2008). A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury. *Toxicon* 51: 1535-1537.

Hoffmann, W.E.; Wilson, B.W.; Solter, P.F. (1999). Clinical enzymology. In: Loeb, W.F.,

Ichida, S.; Tawada, E.; Watanebe, Y.; Minami, S.; Horiba, M. (1988). Two cases of rhabdomyolysis induced by parrotfish liver poisoning. *Kidney Dial.* 25: 541–544.

Ikeda, M.; Mitani, K.; Ito, K. (1988). Palytoxin induces a nonselective cation channel in single ventricular cells of rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 337: 591-593.

Inuzuka, T.; Fujisawa, T.; Arimoto, H.; Uemura, D. (2007). Molecular shape of palytoxin in aqueous solution. *Organic and Biomolecular Chemistry* 5: 897-899.

Inuzuka, T.; Uemura, D.; Arimoto, H. (2008). The conformational features of palytoxin in aqueous solution. *Tetrahedron* 64: 7718-7723.

Ishida, Y.; Takagi, K.; Takahashi, M. (1983). Palytoxin isolated from marine coelenterates. The inhibitory action on (Na,K)-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 258: 7900-7902.

- Ishida, Y.; Satake, N.; Habon, J.; Kitano, H.; Shibata, S. (1985). Inhibitory effect of ouabain on the palytoxin-induced contraction of human umbilical artery. *J Pharmacol Exp Ther* 232: 557-560.
- Ito, K.; Karaki, H.; Urakawa, N. (1977). The mode of contractile action of palytoxin on vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology* 46: 9-14.
- Ito, K.; Karaki, H.; Urakawa, N. (1979). Effects of palytoxin on mechanical and electrical activities of guinea pig papillary muscle. *Japanese Journal of Pharmacology* 29: 467-476.
- Ito, K.; Urakawa, N.; Koike, H. (1982). Cardiovascular toxicity of palytoxin in anesthetized dogs. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 258: 146-154.
- Ito, I.; Ohkusu, M.; Yasumoto, T. (1996). Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice. *Toxicon* 34: 643-652.
- Ito, E.; Yasumoto, T. (2009). Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes. *Toxicon* 54: 244-251.
- Kaul, P.N.; Farmer, M.R.; Ciereszko, L.S. (1974). Pharmacology of palytoxin: The most potent marine toxin known. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 17: 294-301.
- Kermarec, F.; Dor, F.; Armengaud, A.; Charlet, F.; Kantin, R.; Sauzade, D.; de Haro, L. (2008). Health risks related to *Ostreopsis ovata* in recreational waters. *Env. Risques Santé* 7: 357-363.

Kimura, S.; Hashimoto, Y.; Yamazato, K. (1972). Toxicity of the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Toxicon* 10: 611-612.

Kodama, A.M.; Hokama, Y.; Yasumoto, T.; Fukui, M.; Manea, S.J.; Sutherland, N. (1989). Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *decapterus macrosoma* (mackerel). *Toxicon* 27: 1051-1053.

Kudo, Y.; Shibata, S. (1980). The potent depolarizing action of palytoxin isolated from *Palythoa tuberculosa* on the isolated spinal cord of the frog. *British Journal of Pharmacology* 71: 575-579.

Ledreux, A.; Krys, S.; Bernard, C. (2009). Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins). *Toxicon* 53: 300-308.

Lenoir, S.; Ten-Hage, L.; Turquet, J.; Quod, J.-P.; Bernard, C.; Hennion, M.-C. (2004). First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean. *Journal of Phycology* 40: 1042-1051.

Levine, L.; Xiao, D.M.; Fujiki, H. (1986). Combinations of palytoxin or 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and recombinant human insulin growth factor-I or insulin synergistically stimulate prostaglandin productions in cultured rat liver cells and squirrel monkey aorta smooth muscle cells. *Prostaglandins* 31: 669-681.

Levine, L.; Fujiki, H.; Gjika, H.B.; Van Vunakis, H. (1987). Production of antibodies to palytoxin: Neutralization of several biological properties of palytoxin. *Toxicon* 25: 1273-1282.

- Levine, L.; Fujiki, H.; Gjika, H.B.; Van Vunakis, H. (1988). A radioimmunoassay for palytoxin. *Toxicon* 26: 1115-1121.
- Llewellyn, L.E. (2001). Human fatalities in Vanuatu after eating a crab (*Daira perlata*). *Medical Journal of Australia* 175: 343-344.
- Mahmud, Y.; Arakawa, O.; Noguchi, T. (2000). An epidemic survey on the freshwater puffer poisoning in Bangladesh. *J. Nat. Toxins* 9: 319–326.
- Mereish, K.A.; Morris, S.; McCullers, G.; Taylor, T.J.; Bunner, D.L. (1991). Analysis of palytoxin by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography* 14: 1025-1031.
- Moore, R.E.; Scheuer, P.J. (1971). Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science* 172: 495-498.
- Moore, R.E.; Dietrich, R.F.; Hatton, B.; Higa, T.; Scheuer, P.J. (1975). Nature of the λ 263 chromophore in the palytoxins. *J. Org. Chem.* 40: 540–542.
- Moore, R.E.; Bartolini, G. (1981). Structure of palytoxin. *J Am Chem Soc* 103: 2491-2494.
- Moore, R.E.; Bartolini, G.; Barchi, J.; Bothner-By, A.A.; Dadok, J.; Ford, J. (1982). Absolute stereochemistry of palytoxin. *Journal of the American Chemical Society* 104: 3776-3779.
- Mullin, J.M.; Snock, K.V.; McGinn, M.T. (1991). Effects of apical vs. basolateral palytoxin on LLC-PK1 renal epithelia. *The American journal of physiology* 260: 1201-1211.

Munday, R. (2006). Toxicological requirements for risk assessment of shellfish contaminants: A review. *African Journal of Marine Science* 28: 447-449.

Munday, R. (2008). Occurrence and toxicology of palytoxin. In: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, 693-713.

Munday, R. (2010). Palytoxin toxicology: Animal studies. *Toxicon*, in Press.

Nagase, H.; Karaki, H.; Urakawa, N. (1987). Palytoxin-induced endothelium-dependent relaxation in the isolated rat aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 335: 575-579.

Noguchi, T.; Hwang, D.-F.; Arakawa, O.; Daigo, K.; Sato, S.; Ozaki, H.; Kawai, N.; Ito, M.; Hashimoto, K. (1987). Palytoxin as the causative agent in the parrotfish poisoning. In: Gopalakrishnakone, P., Tan, C.K. (Eds.), *Progress in Venom and Toxin Research: Proceedings of the First Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins*. Faculty of Medicine, National University of Singapore, 325–335.

Ohizumi, Y.; Shibata, S. (1980). Mechanism of the excitatory action of palytoxin and N-acetylpalytoxin in the isolated guinea-pig vas deferens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 214: 209-212.

Ohuchi, K.; Watanabe, M.; Yoshizawa, K. (1985). Stimulation of prostaglandin E₂ production by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-type and non-TPA-type tumor promoters in macrophages and its inhibition by cycloheximide. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 834: 42-47.

Okano, H.; Masuoka, H.; Kamei, S.; Seko, T.; Koyabu, S.; Tsuneoka, K.; Tamai, T.; Ueda, K.; Nakazawa, S.; Sugawa, M.; Suzuki, H.; Watanabe, M.; Yatani, R.; Nakano, T. (1998). Rhabdomyolysis and myocardial damage induced by palytoxin, a toxin of blue humphead parrotfish. *Internal Medicine* 37: 330-333.

Oku, N.; Sata, N.U.; Matsunaga, S.; Uchida, H.; Fusetani, N. (2004). Identification of palytoxin as a principle which causes morphological changes in rat 3Y1 cells in the zoanthid *Palythoa aff. Margaritae*. *Toxicon* 43: 21-25.

Onuma, Y.; Satake, M.; Ukena, T.; Roux, J.; Chanteau, S.; Rasolofonirina, N.; Ratsimaloto, M.; Naoki, H.; Yasumoto, T. (1999). Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon* 37: 55-65.

Ozaki, H.; Tomono, J.; Nagase, H.; Urakawa, N. (1983). The mechanism of contractile action of palytoxin on vascular smooth muscle of guinea-pig aorta. *Japanese Journal of Pharmacology* 33: 1155-1162.

Ozaki, H.; Nagase, H.; Urakawa, N. (1984). Sugar moiety of cardiac glycosides is essential for the inhibitory action on the palytoxin-induced K^+ release from red blood cells. *FEBS Letters* 173: 196-198.

Posangi, J.; Zar, M.A.; Harris, J.B. (1992). The action of palytoxin on the isolated detrusor muscle of the rat. *British Journal of Pharmacology* 106: 307-314.

- Posangi, J.; Harris, J.B.; Zar, M.A. (1994). Palytoxin-induced transmitter release in the autonomic nervous system of the rat. *Toxicon* 32: 965-975.
- Post, R.L.; Hegyvary, C.; Kume, S. (1972). Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 247: 6530-6540.
- Quimby, F.W. (1999). *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. (Second Edition)*, Taylor and Francis, Philadelphia, PA, 399-454.
- Quinn, R. J.; Kashiwagi, M.; Moore, R. E.; Norton, T. R. (1974). Anticancer activity of zoanthids and the associated toxin, palytoxin, against ehrlich ascites tumor and P-388 lymphocytic leukemia in mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 63: 257–260.
- Rayner, M.D.; Sanders, B.J.; Harris, S.M. (1975). Palytoxin: effects on contractility and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in isolated ventricle strips. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.* 11: 55-64.
- Redondo, J.; Fiedler, B.; Scheiner-Bobis, G. (1996). Palytoxin-induced Na^+ influx into yeast cells expressing the mammalian sodium pump is due to the formation of a channel within the enzyme. *Molecular Pharmacology* 49: 49-57.
- Rhodes, L.; Towers, N.; Briggs, L.; Munday, R.; Adamson, J. (2002). Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 36: pp. 631-636.

Riobó, P.; Paz, B.; Franco, J.M. (2006). Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 566: 217-223.

Riobó, P.; Paz, B.; Franco, J.M.; Vázquez, J.A.; Murado, M.A.; Cacho, E. (2008a). Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationships. *Food and Chemical Toxicology* 46: 2639-2647.

Riobó, P.; Paz, B.; Franco, J.M.; Vázquez, J.A.; Murado, M.A. (2008b). Proposal for a simple and sensitive haemolytic assay for palytoxin. Toxicological dynamics, kinetics, ouabain inhibition and thermal stability. *Harmful Algae* 7: 415-429.

Riobó, P.; Franco, J.M. (2010). Palytoxins: Biological and chemical determination. *Toxicon*, in press.

Robinson, C.P.; Franz, D.R. (1991). Effects of palytoxin on guinea pig tracheal strips. *Pharmaceutical Research* 8: 859-864.

Robinson, C.P.; Franz, D.R.; Bondura, M.E. (1992). Effects of palytoxin on porcine coronary artery rings. *Journal of Applied Toxicology* 12: 185-189.

Rossi, R.; Castellano, V.; Scalco, E.; Serpe, L.; Zingone, A.; Soprano, V. (2010). New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Toxicon* 56: 1381-1387.

Samek, O.; Jonáš, A.; Pilát, Z.; Zemánek, P.; Nedbal, L.; Tríska, J.; Kotas, P.; Trtílek, M. (2010). Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells: Sensing Unsaturation of Storage Lipids *in vivo*. *Sensors* 10: 8635-8651.

Sansoni, G.; Borghini, B.; Camici, G.; Casotti, M.; Righini, P.; Rustighi, C. (2003). Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente. *Biol. Amb* 17: 17–23.

Scheiner-Bobis, G.; Zu Heringdorf, D.M.; Christ, M.; Habermann, E. (1994). Palytoxin induces K⁺ efflux from yeast cells expressing the mammalian sodium pump. *Molecular Pharmacology* 45: 1132-1136.

Scheiner-Bobis, G.; Hübschle, T.; Diener, M. (2002). Action of palytoxin on apical H⁺/K⁺-ATPase in rat colon. *European Journal of Biochemistry* 269: 3905-3911.

Schilling, W.P.; Snyder, D.; Sinkins, W.G.; Estacion, M. (2006). Palytoxin-induced cell death cascade in bovine aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 291: C657-C667.

Seemann, P.; Gernert, C.; Schmitt, S.; Mebs, D.; Hentschel, U. (2009). Detection of hemolytic bacteria from *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Zoantharia) using a novel palytoxin-screening assay. *Antonie van Leeuwenhoek* 96: 405-411.

Sheridan, R.E.; Deshpande, S.S.; Adler, M. (2005). Cytotoxic actions of palytoxin on aortic smooth muscle cells in culture. *Journal of Applied Toxicology* 25: 365-373.

Shinzato, T.; Furusu, A.; Nishino, T.; Abe, K.; Kanda, T.; Maeda, T.; Kohno, S. (2008). Cowfish (Umisuzume, *Lactoria diaphana*) poisoning with rhabdomyolysis. *Internal Medicine* 47: 853-856.

Tabata, H.; Nanjo, K.; Kokuoka, H.; Machida, K.; Miyamura, K. (1989). Two cases of fish poisoning caused by ingesting parrot fish. *Int. Med.* 64: 974-977.

Taniyama, S.; Mahmud, Y.; Tanu, M.B.; Takatani, T.; Arakawa, O.; Noguchi, T. (2001). Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon* sp. toxin. *Toxicon* 39: 725-727.

Taniyama, S.; Sagara, T.; Nishio, S.; Kuroki, R.; Asakawa, M.; Noguchi, T.; Yamasaki, S.; Takatani, T.; Arakawa, O. (2009). Survey of food poisoning incidents in Japan due to ingestion of marine boxfish, along with their toxicity. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 50: 270-277.

Taylor, T.J.; Parker, G.W.; Fajer, A.B.; Mereish, K.A. (1991). Non-specific binding of palytoxin to plastic surfaces. *Toxicology Letters* 57: 291-296.

Taylor, T.J.; Smith, N.C.; Langford, M.J.; Parker Jr., G.W. (1995). Effect of palytoxin on endothelium-dependent and -independent relaxation in rat aortic rings. *Journal of Applied Toxicology* 15: 5-12.

Terao, K.K.; Ito, E.; Yasumoto, T. (1992). Light and electron microscopic observation of experimental palytoxin poisoning in mice. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* 85: 494-496.

Tichadou, L.; Glaizal, M.; Armengaud, A.; Grosseil, H.; Lemée, R.; Kantin, R.; Lasalle, J.-L.; Drouet, G.; Rambaud, L.; Malfait, P.; De Haro, L. (2010). Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clin. Toxicol.* 48: 839–844.

Tubaro, A.; Durando, P.; Del Favero, G.; Ansaldi, F.; Icardi, G.; Deeds, J.R.; Sosa, S. (2011). Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon*, in press.

Uemura, D.; Ueda, K.; Hirata, Y. (1981). Further studies on palytoxin. II. Structure of palytoxin. *Tetrahedron Lett* 22: 2781-2784

Uemura, D.; Hirata, Y.; Iwashita, T.; Naoki, H. (1985). Studies on palytoxins. *Tetrahedron* 41: 1007-1017.

Ukena, T.; Satake, M.; Usami, M.; Oshima, Y.; Naoki, H.; Fujita, T.; Kan, Y.; Yasumoto, T. (2001). Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65: 2585-2588.

Usami, M.; Satake, M.; Ishida, S.; Inoue, A.; Kan, Y.; Yasumoto, T. (1995). Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Journal of the American Chemical Society* 117: 5389-5390.

Usup, G.; Hamid, S.Z.; Chiet, P.K.; Wah, C.K.; Ahmad, A. (2008). Marked differences in fatty acid profiles of some planktonic and benthic marine dinoflagellates from Malaysian waters. *Phycologia* 47: 105-111.

(Utermöhl, 1958) - Lund, J.W.G.; Kipling, C.; Le Cren, E.D. (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting.

Hydrobiologia 11: 143-170.

Vick, J.A.; Wiles, J.S. (1975). The mechanism of action and treatment of palytoxin poisoning.

Toxicology and Applied Pharmacology 34: 214-223.

Vila, M.; Garcés, E.; Masó, M. (2001). Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 26: 51–60.

Wachi, K.M.; Hokama, Y.; Haga, L.S.; Shiraki, A.; Takenaka, W.E.; Bignami, G.S.; Levine, L. (2000). Evidence for palytoxin as one of the sheep erythrocyte lytic in lytic factors in crude extracts of ciguateric and non-ciguateric reef fish tissue. *Journal of Natural Toxins* 9: 139-146.

Wattenberg, E.V. (2007). Palytoxin: Exploiting a novel skin tumor promoter to explore signal transduction and carcinogenesis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 292: C24-C32.

Wattenberg, E.V. (2010). Modulation of protein kinase signaling cascades by palytoxin. *Toxicon*. In Press.

Wiles, J.S.; Vick, J.A.; Christensen, M.K. (1974). Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species. *Toxicon* 12: 427-433.

Wood, B.R.; Heraud, P.; Stojkovic, S.; Morrison, D.; Beardall, J.; McNaughton, D. (2005). A portable Raman acoustic levitation spectroscopic system for the identification and environmental monitoring of algal cells. *Analytical Chemistry* 77: 4955-4961.

Wu, Q.; Nelson, W.H.; Hargraves, P.; Zhang, J.; Brown, C.W.; Seelenbinder, J.A. (1998). Differentiation of algae clones on the basis of resonance Raman spectra excited by visible light. *Analytical Chemistry* 70: 1782-1787.

Yamasaki, H.; Nishiyama, K.; Kataoka, Y.; Okamoto, K.; Yamasaki, F.; Shimazu, Y.; Manabe, M. (2003). Mass poisoning caused by a palytoxin-like substance. *J. Jap. Assoc. Acute Med.* 14: 211–214.

Yasumoto, T. (2001). The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chem Rec.* 1: 228-242.

Yoshimine, K.; Orita, S.; Okada, S.; Sonoda, K.; Kubota, K.; Yonezawa, T. (2001). Two cases of parrotfish poisoning with rhabdomyolysis. *Japanese Society of Internal Medicine* 90: 1339-1341.

I dati presentati in questa tesi sono discussi nei seguenti lavori:

Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Grauso, L.; Tartaglione, L.; Florio, C.; Lorenzon, P.; De Bortoli, M.; Tubaro, A.; Poli, M.; Bignami, G. (2009). Stereostructure and biological activity of 42-hydroxy-palytoxin: A new palytoxin analogue from Hawaiian *Palythoa* subspecies. *Chemical Research in Toxicology* 22: 1851-1859.

Sosa, S.; Del Favero, G.; De Bortoli, M.; Vita, F.; Soranzo, M.R.; Beltramo, D.; Ardizzone, M.; Tubaro, A. (2009). Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice. *Toxicology Letters* 191: 253-259.

Tubaro, A.; Del Favero, G.; Beltramo, D.; Ardizzone, M.; Forino, M.; De Bortoli, M.; Pelin, M.; Poli, M.; Bignami, G.; Ciminiello, P.; Sosa, S. (2011). Acute oral toxicity in mice of a new palytoxin analog: 42-Hydroxy-palytoxin. *Toxicon*, in press

Honsell, G.; De Bortoli, M.; Boscolo, S.; Dell'Aversano, C.; Battocchi, C.; Fontanive, G.; Penna, A.; Berti, F.; Yasumoto, T.; Ciminiello, P.; Poli, M.; Tubaro, A. (2011). The harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* Fukuyo: detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using anti-palytoxin antibodies. In preparation.

Honsell, G.; Battocchi, C.; De Bortoli, M.; Bonifacio, A.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Penna, A.; Yasumoto, T.; Fattorusso, E.; Tubaro, A. (2011). *Ostreopsis ovata* as a source of palytoxin-like compounds: ultrastructural features, Raman and mass spectroscopic analyses. In preparation.