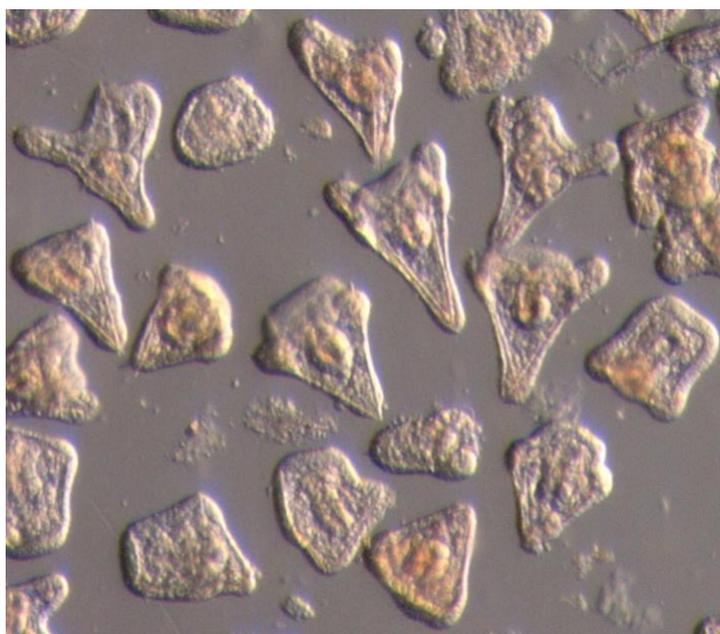




**Report finale Progetto**  
**Centro Internazionale di Studi Avanzati su Ambiente**



***WP3: Ecosistemi e contaminanti***

**Alterazioni trascrizionali ed effetti transgenerazionali**

*Marilena Di Natale*

Istituto di Studi sul Mediterraneo, S.S. di Palermo, Via F. Parlatore, 65 90145 Palermo

marilena.dinatale@ismed.cnr.it

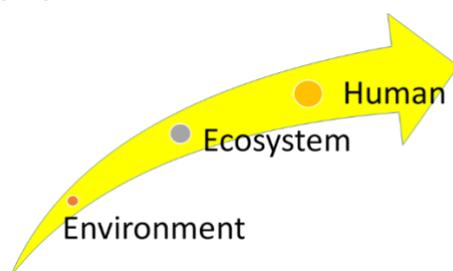
## Indice

### Sommario

<b>1. Sintesi del progetto</b> .....	<b>3</b>
<b>2. WP3 “Ecosistemi e contaminanti”</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Descrizione delle attività scientifiche</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1 Analisi del pattern di espressione genica nei tessuti riproduttivi</b> .....	<b>5</b>
<b>3.2 Valutazione degli effetti degli inquinanti in embrioni di <i>Paracentrotus lividus</i> derivanti da adulti esposti</b> .....	<b>7</b>
<b>4. Bibliografia</b> .....	<b>8</b>

## 1. Sintesi del progetto

Il progetto “Centro Internazionale di Studi Avanzati su Ambiente, ecosistema e Salute umana” – CISAS – ha offerto uno schema organizzativo complesso e concreto idoneo ad indagare con una moderna visione multidisciplinare l'inquinamento ambientale e il suo legame con l'ecosistema e la salute umana. Il principale obiettivo del programma di ricerca effettuato è stato comprendere i processi ed i meccanismi per il trasferimento di contaminanti convenzionali (metalli pesanti, POP, radionuclidi, ecc.) ed emergenti (es. PBDE, antibiotici, farmaci di nuova generazione, antitumorali, ecc.) dall'ambiente (come complesso di atmosfera, suolo, sedimenti, acque interne e matrici marine) all'ecosistema e all'uomo.



Il progetto di ricerca, sulla base di un moderno approccio multidisciplinare, è stato sviluppato in 6 pacchetti di lavoro (WP) strettamente interconnessi. Un WP1 focalizzato al coordinamento, gestione e comunicazione del progetto. Un WP2 incentrato sui processi fisico-chimici degli inquinanti convenzionali ed emergenti caratterizzanti le diverse matrici ambientali nelle tre aree di studio (Augusta, Milazzo e Crotone). Un WP3 volto a fornire nuove informazioni sui meccanismi di tossicità esercitati dai diversi inquinanti negli animali marini. Un WP4 mirato a sviluppare eventuali associazioni tra inquinanti e condizioni sanitarie epidemiologiche. Un WP5 focalizzato sulla modellazione in vitro, ex vivo e in vivo degli effetti ambientali sulla salute. E infine un WP6 volto a costruiti modelli matematici capace di rappresentare i fenomeni ambientali.

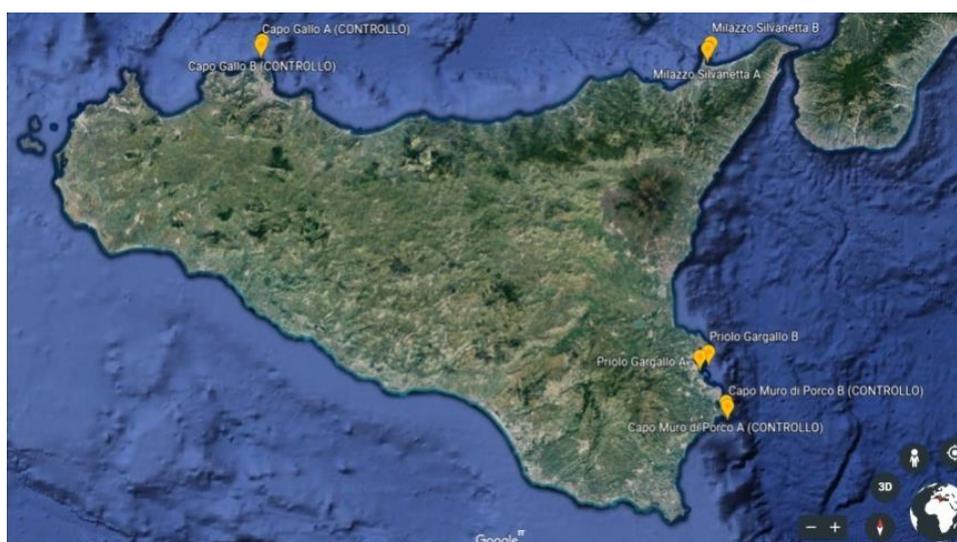
Il progetto ha coinvolto diversi istituti del CNR e diversi partner ad esso esterni come Arpa, Università, Enea ecc.

CNR INSTITUTES	
Dipartimento Scienze del Sistema Terra e Tecnologie per l'Ambiente	DTA-CNR
Istituto per l'Ambiente Marino Costiero	IAMC-CNR
Istituto di Analisi dei Sistemi ed Informatica "A. Ruberti"	IASI-CNR
Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare	IBIM-CNR
Istituto di Fisiologia Clinica	IFC-CNR
Istituto sull'Inquinamento Atmosferico	IIA-CNR
Istituto delle Scienze del Clima e dell'Atmosfera	ISAC-CNR

## 2. WP3 “Ecosistemi e contaminanti”

Nell’ambito del Progetto CISAS, il WP3 “Ecosistemi e contaminanti” ha mirato allo studio delle risposte biologiche e tossicologiche ai diversi contaminanti, anche emergenti, con l'obiettivo di evidenziare possibili relazioni con le malattie umane. Le risposte biologiche sono state valutate attraverso un ampio pannello di biomarcatori in organismi marini modello di diversa complessità in modo da fornire informazioni utili per la protezione e la gestione degli ecosistemi naturali. Al fine di svelare le risposte e le modificazioni indotte dall'esposizione a determinati inquinanti, è stata svolta una caratterizzazione dei meccanismi di risposta cellulare e molecolare coinvolti nella tossicità degli inquinanti.

In seno alla realizzazione di uno dei principali obiettivi del progetto CISAS ossia lo sviluppo di una complessa e multidisciplinare azione di ricerca scientifica volta alla comprensione dei fenomeni di inquinamento ambientale e del loro impatto sull’ecosistema e la salute umana, gli studi condotti permettono di fornire nuove informazioni sui meccanismi di tossicità posti in essere su organismi marini esposti ad inquinanti, convenzionali ed emergenti, identificati nei tre SIN (Siti di Interesse Nazionale) di Augusta/Priolo, Milazzo e Crotona.



La scelta di un approccio multidisciplinare, caratterizzato da indagini morfologiche, molecolari e biochimiche, ha permesso di focalizzare lo studio sui principali effetti nei vari livelli di organizzazione biologica e di approfondire i meccanismi di risposta coinvolti.

### 3. Descrizione delle attività scientifiche

Al fine di fornire nuove informazioni sui meccanismi di tossicità esercitati su organismi marini esposti ad inquinanti, convenzionali ed emergenti, il progetto CISAS ha svolto le principali seguenti attività/output:

- Identificazione degli inquinanti caratterizzanti le aree di studio (Augusta, Milazzo, Crotona)
- Esposizione in mesocosmo degli organismi modello agli inquinanti selezionati
- Analisi del pattern di espressione genica nei tessuti riproduttivi della specie selezionata (*P. lividus*) in risposta all'esposizione agli inquinanti
- Valutazione degli effetti degli inquinanti in embrioni di *Paracentrotus lividus* derivanti da adulti esposti

#### 3.1 Analisi del pattern di espressione genica nei tessuti riproduttivi

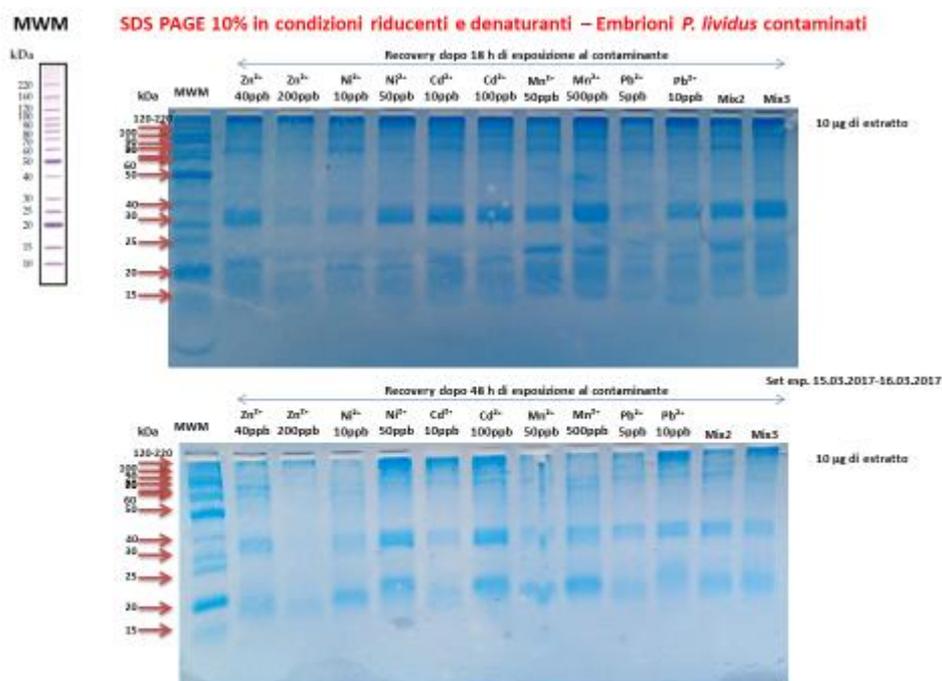
Gli effetti molecolari dell'esposizione ai metalli e mix di essi nei tessuti riproduttivi di individui adulti esposti a concentrazioni non letali, sono stati analizzati mediante uno studio dei profili di espressione trascrizionale di specifici geni coinvolti nella risposta allo stress, nella detossificazione, regolazione trascrizionale e post-trascrizionale (HSP56/57, 60, 70, 90, DNMT, p38MAPK, CAT, MDR1, HIF-1). Gli individui adulti di *P. lividus* sono stati raccolti nella costa sud-occidentale della Sicilia, vicino a Capo Granitola (37° 34' 19.800N, 12° 39' 03.200E) e trasportati al laboratorio entro 1 ora dopo la cattura. Gli animali sono stati sottoposti ad un periodo di acclimatazione di 15 giorni in acquario con acqua di mare artificiale (ASW). Dopo l'acclimatazione, gli organismi (n = 3 maschi e 3 femmine per trattamento) sono stati mantenuti per 10 giorni in presenza di diversi metalli a 3 diverse concentrazioni (Tabella 1), mentre gli animali mantenuti in ASW sono stati usati come controlli. Ogni esperimento è stato eseguito tre volte.

Treatment	Low ( $\mu\text{g/l}$ )	Intermediate ( $\mu\text{g/l}$ )	High ( $\mu\text{g/l}$ )
	L	I	H
<b>Cd<sup>2+</sup></b>	1	10	100
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	5	50	500
<b>Ni<sup>2+</sup></b>	1	10	50
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	1	5	10
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	4	40	200
<b>Mix*</b>	-	$\Sigma^*$ intermediate	$\Sigma^*$ high

Tabella 1: concentrazioni di metalli utilizzate per gli esperimenti in mesocosmo

Le concentrazioni dei metalli testati sono state scelte in accordo a quanto riscontrato in ambienti caratterizzati da diverso grado di inquinamento o in relazione ai più recenti dati presenti in letteratura (Varotto *et al.*, 2013; Martinez-Soto *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016; Baltas *et al.*, 2017); inoltre, considerando che l'esposizione a combinazioni di diversi tipi di metalli potrebbe produrre effetti neutralizzanti, additivi e/o sinergici e determinare livelli di tossicità variabili (WahChu & Chow, 2002; Kumar *et al.*, 2015), sono state testate anche delle misture di tutti i metalli a differenti concentrazioni (vedi Tabella 2).

Dopo esposizione e dissezione, il tessuto riproduttivo maschile e femminile è stato pesato e conservato a  $-80^\circ\text{C}$  fino al momento dell'utilizzo. Lo stadio riproduttivo dei campioni è stato valutato mediante indice gonadosomatico (GSI), mentre le alterazioni trascrizionali sono state valutate mediante analisi qPCR.



### 3.2 Valutazione degli effetti degli inquinanti in embrioni di *Paracentrotus lividus* derivanti da adulti esposti

Al fine di valutare gli effetti intergenerazionali e transgenerazionali indotti dagli inquinanti ambientali sulla gametogenesi e soprattutto sulle prime fasi dello sviluppo embrionale, gli adulti di *P. lividus* sono stati esposti a concentrazioni note di due contaminanti singolarmente e in miscela (zinco e cadmio) per 10 giorni. Lo zinco (Zn) e il cadmio (Cd) sono stati scelti in quanto mostrano effetti tossici noti a concentrazioni rilevanti per l'ambiente o simili a quelle utilizzate in altri rapporti. Poiché l'esposizione simultanea di organismi a metalli diversi può determinare livelli variabili di tossicità a causa di effetti neutralizzanti, additivi o sinergici, sono state testate anche due miscele, costituite da Cd e Zn a diverse concentrazioni.

Gli embrioni ottenuti post esposizione sono stati osservati durante lo sviluppo embrionale. Parallelamente allo studio del fenotipo embrionale ed alla valutazione della mortalità, si è focalizzata l'attenzione sullo stress ossidativo e sul livello di espressione di un insieme di geni selezionati, inclusi i membri del Network di Regolazione Genica relativo alla scheletogenesi (*dri*, *hex*, *sm50*, *p16*, *p19*, *msp130*) e allo sviluppo dell'endoderma (*foxa*, *hox11 / 13b*, *wnt8*), nonché i regolatori epigenetici coinvolti nell'accessibilità della cromatina (*kat2A*, *hdac1*, *ehmt2*, *phf8* e *UBE2a*).

## 4. Bibliografia

Varotto, L., Domeneghetti, S., Rosani, U., Manfrin, C., Cajaraville, M.P., Raccanelli, S., Pallavicini, A., Venier, P., 2013. DNA Damage and Transcriptional Changes in the Gills of *Mytilus galloprovincialis* Exposed to Nanomolar Doses of Combined Metal Salts (Cd, Cu, Hg). *PloS One* 8, e54602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054602>.

Martínez-Soto, M.C., Tovar-Sanchez, A., Sanchez-Quiles, D., Rodellas, V., Garcia- Orellana, J., Basterretxea, G., 2016. Seasonal variation and sources of dissolved trace metals in Mao Harbour, Minorca Island. *Sci. Total Environ.* 565, 191e199. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.244>.

Zhu, B., Wang, Q., Shi, X., Guo, Y., Xu, T., Zhou, B., 2016. Effect of combined exposure to lead and decabromodiphenyl ether on neurodevelopment of zebrafish larvae. *Chemosphere* 144, 1646e1654. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.056>.

Baltas, H., Kiris, E., Sirin, M., 2017. Determination of radioactivity levels and heavy metal concentrations in seawater, sediment and anchovy (*Engraulis encrasicolus*) from the Black Sea in Rize, Turkey. *Mar. Pollut. Bull.* 116, 528e533. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.016>.

Wah Chu, K., Chow, K.L., 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquat. Toxicol.* 61, 53e64.

Kumar, N.V., Yang, J., Pillai, J.K., Rawat, S., Solano, C., Kumar, A., Grøtli, M., Stemmler, T.L., Rosen, B.P., Tamas, M.J., 2015. Arsenic directly binds to and activates the yeast AP-1-like transcription factor Yap 8. *Mol. Cell Biol.* 36, 913e922. <https://doi.org/10.1128/MCB.00842-15>.