

©Dudarev Mikhail/www.shutterstock.com.

La *Ciona intestinalis* (ascidie) come organismo modello indicatore di inquinamento marino

ALESSANDRA GALLO
ELISABETTA TOSTIDipartimento di Biologia ed Evoluzione
degli Organismi Marini
Stazione Zoologica, Napoli

Negli ultimi decenni, enormi quantità di sostanze chimiche sono state immesse nell'ambiente a seguito di attività antropiche (agricole/urbane/industriali) e sono state definite xenobiotici data la loro estraneità all'ambiente in cui

sono stati riversati. È noto che alcuni xenobiotici possono influire sulle funzioni ormonali animali e umane e pertanto sono anche detti distruttori endocrini.

Questi ultimi stanno creando un crescente allarme nella comunità scientifica internazio-

nale dato il costante aumento dell'inquinamento ambientale, soprattutto marino.

La contaminazione del mare costituisce un grave pericolo per la vita acquatica poiché l'impatto degli inquinanti sui sistemi endocrini può incidere negativamente sulla capacità riproduttiva.

È stato dimostrato infatti che gli xenobiotici possono influire sui meccanismi di fecondazione e sviluppo con notevoli conseguenze sulle funzioni riproduttive nell'età adulta (Danzo 1997).

Tra gli xenobiotici più noti si annoverano metalli pesanti, erbicidi, pesticidi, fungicidi, diossine e organotine (Wurl e Obbard 2004). Queste ultime e in particolare la tributina (TBT) sono state utilizzate fin dagli anni '60 per la loro azione biocida nelle vernici antivegetative, composti atti ad impedire l'adesione e la crescita di organismi sulle superfici sommerse di imbarcazioni e navi.

Il TBT è stato definito il prodotto più tossico mai riversato nell'ambiente (Goldberg, 1986) e pertanto dal 2001 la International Maritime Organization (IMO, 2001) ha ban-

dito il suo utilizzo nelle vernici antivegetative.

Nonostante il divieto sia diventato definitivo dal 2008, gli effetti negativi del TBT sulla salute umana e l'ambiente persistono a causa dell'accumulo di questa sostanza nei sedimenti, il seguente rilascio nell'ambiente idrico, nonché l'accumulo nei tessuti di organismi.

È ormai comunemente riconosciuto (Tittley O'Neal et al., 2011) che un irreversibile induzione di caratteristiche sessuali maschili sulle femmine (imposex) dei gasteropodi è causato dall'esposizione a organotine, ma vi sono evidenze in letteratura che spiegano come queste esercitino un impatto negativo sui processi riproduttivi come la funzionalità dei gameti, l'embriogenesi, lo sviluppo embrionale e larvale nonché sulla crescita e la sopravvivenza degli organismi marini.

A seguito dell'eliminazione del TBT dal commercio numerosi studi sono stati effettuati per mettere a punto nuovi biocidi alternativi al TBT da inserire nelle vernici antivegetative. Tra questi il diuron e il chlorotalonil sono i più utilizzati. Nonostante il

loro inserimento nel mercato, non sono ancora noti i loro effetti sugli organismi marini e in particolare sui processi riproduttivi della fauna e flora marina.

Nel nostro laboratorio abbiamo utilizzato come modello animale l'invertebrato marino *Ciona intestinalis* (ascidie, tunicati) riportato in figura 1, per valutare l'effetto di alcuni xenobiotici come i metalli pesanti e biocidi di vecchia e nuova generazione (TBT, diuron e chlorotalonil) su alcuni meccanismi di riproduzione.

Con un peculiare approccio sperimentale abbiamo effettuato studi elettrofisiologici per testare gli effetti di queste sostanze sulle correnti ioniche di membrana che giocano un ruolo fondamentale nella fisiologia degli ovociti (Tosti, 2006; Tosti et al., 2011; Gallo e Tosti, 2015a) e dell'embrione (Tosti, 2010).

Lo studio della membrana plasmatica dell'ovocita è importante perché questa rappresenta il confine tra il compartimento cellulare e il suo ambiente circostante ed è inoltre la sede dove sono allocati i ligandi e i recettori di molti dei meccanismi di attiva-

Xenobiotico	Effetto sull'ovocita	Effetto sulla fecondazione	Effetto sullo sviluppo embrionale	Effetto sulla larva	Bibliografia
Piombo	Riduce correnti di sodio	Riduce la contrazione			Gallo et al., Marine Ecology, 2011
Cadmio	Riduce correnti di sodio		Riduce l'hatching	Induce anomalie	"
Mercurio	Riduce correnti di sodio	Inibisce la corrente di fecondazione	Inibisce in modo reversibile	Induce anomalie	"
Zinco	Riduce correnti di sodio	Inibisce la corrente di fecondazione	Inibisce in modo reversibile	Induce anomalie	"
TBT	Riduce correnti di sodio	Riduce la corrente di fecondazione		Induce anomalie	Gallo & Tosti, Marine Drugs, 2013
Diuron	Riduce correnti di sodio			Induce anomalie	"
Chlorotalonil	Riduce correnti di sodio	Riduce la corrente di fecondazione		Induce anomalie	Gallo & Tosti, PLoS one, 2015

Tabella 1. Impatto di quattro metalli pesanti e tre sostanze antivegetative sulla fisiologia riproduttiva della *Ciona intestinalis*.

zione dei gameti, come il riconoscimento il legame e la fusione tra spermatozoi e ovociti.

I risultati ottenuti, oggetto di diverse pubblicazioni scientifiche (Gallo et al., 2011; Gallo e Tosti, 2013; Gallo e Tosti, 2015b) e riportati in tabella 1, hanno dimostrato un comune denominatore che è la riduzione dell'attività delle correnti di sodio che nell'ovocita maturo di *Ciona intestinalis* giocano un fondamentale ruolo fisiologico. In uno studio del 2006 infatti (Cuomo et al., 2006) è stato dimostrato in *Ciona intestinalis* che le correnti ioniche di sodio costituiscono una componente fondamentale della corrente di fecondazione, altro evento elettrico basilare dell'attivazione dell'ovocita (Dale e De Felice 1984; Tosti e Boni, 2004), e che tale effetto è amplificato perché la corrente di fecondazione esercita a sua volta un impatto a lungo termine sul successivo sviluppo embrionale (Tosti et al., 2003).

Viceversa, ognuno di questi xenobiotici esercita un effetto diverso sulla corrente di fecondazione stessa e sulla contrazione del corpo cellulare che negli ovociti di ascidie costituiscono l'evento morfologico della fecondazione mancando in questi i granuli corticali.

Saggi di spermiosità effettuati esponendo gli spermatozoi agli xenobiotici non hanno rivelato alcun impatto negativo sulla capacità fecondante dello spermatozoo.

I nostri risultati mostrano i diversi effetti indotti, in particolare sono significativamente importanti gli effetti teratogeni sullo sviluppo larvale e sulla formazione della coda della larva.

Questo è un parametro particolarmente importante in quanto nelle ascidie la ritrazione della coda costituisce l'evento chiave per la metamorfosi da larva ad organismo adulto. Di particolare interesse è l'effetto dello zinco, che pur essendo un metallo essenziale, è in grado di esercitare effetti dannosi sugli stessi organismi in cui gioca un ruolo fisiologico. Comunque nel caso dello zinco e di altre sostanze abbiamo osservato che l'effetto dannoso è reversibile una volta rimosso l'inquinante.

Ciò mostra una capacità di adattamento e di recupero degli organismi marini e la-

scia intravedere la possibilità di ripresa delle popolazioni marine in caso di bonifica ambientale.

Questi studi, oltre a rilevare gli effetti tossici di molte sostanze presenti nell'ambiente marino hanno chiarito in parte i meccanismi d'azione degli stessi, evidenziando che gli effetti tossici si ripercuotono in particolare sulla fisiologia dell'ovocita con un impatto a lungo termine sullo sviluppo embrionale. In particolare risentono della tossicità ambientale le correnti che attraversano i canali ionici presenti sulla membrana plasmatica degli ovociti, che conferma il ruolo rivestito da queste correnti nei meccanismi di riproduzione, fecondazione e sviluppo embrionale.

Queste ricerche e altre in corso sono finalizzate non solo a valutare il rischio ecologico relativo all'impatto dello stress ambientale sui meccanismi di riproduzione degli animali marini, ma sono tese anche ad individuare possibili biomarcatori e bioindicatori nell'ambito di programmi di biomonitoraggio (Holt e Miller, 2011).

Un biomarcatore è un processo e un bioindicatore è un organismo, entrambi in grado di fornire informazioni sulla qualità ambientale attraverso reazioni identificabili (biochimiche, fisiologiche e morfologiche).

Programmi di biomonitoraggio dell'ambiente marino sono concentrati a individuare il migliore biomarcatore e bioindicatore come strumento prognostico per i livelli di inquinamento marino.

In un programma di biomonitoraggio, specie stanziali e filtratori possono rappresentare ottimi bioindicatori; tali organismi, infatti, in quanto bioaccumulatori, sono in grado di fornire informazioni sullo stato di qualità dell'ambiente e dei possibili danni indotti dall'inquinamento.

Molti biomarcatori molecolari sono stati utilizzati come strumenti diagnostici per evidenziare la presenza di sostanze inquinanti nell'ambiente e i loro potenziali effetti sui sistemi endocrini e riproduttivi.

Tra questi, sono stati proposti la vitellogenina e le ossidasi in specie ittiche di interesse commerciale (Fossi et al., 2002).

Altri autori hanno identificato proteine estrogeno-regolate come la catepsina D e la sua espressione genica indotta dall'impatto di inquinanti. Inoltre, un ruolo chiaro di biomarcatore è stato riconosciuto alla Heat Shock Protein 70 (HSP70) che protegge le cellule da condizioni dannose legandosi alle proteine danneggiate.

L'espressione del gene HSP70 è stata vista aumentare significativamente dopo l'esposizione agli inquinanti in teleostei marini (Carnevali e Maradonna, 2003).

Tra gli altri marcatori una particolare attenzione è stata dedicata all'induzione del citocromo P4501A, l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) e l'induzione delle metalotioneine.

Ciascuno di essi può essere utilizzato con successo come un potenziale biomarcatore di esposizione ad inquinanti specifici (Sarkar et al., 2006). In un recente sondaggio, alcuni di questi biomarcatori sono stati usati per indicare neurotossicità; in particolare la AChE è considerata il biomarcatore più reattivo nei siti influenzati da attività agricole, urbane ed industriali (Tsangaris et al., 2010).

Di notevole interesse è anche il ruolo svolto da enzimi che sono atti a metabolizzare gli xenobiotici. Il loro utilizzo è oggetto di studi ed è in aumento grazie a diversi approcci sperimentali. Anche se i dati sono contrastanti, è riportato in letteratura (Cajarville et al., 2000) che l'induzione del citocromo P4501A, enzima coinvolto nella cancerogenesi chimica, svolge un ruolo chiave nella trasformazione dei pesticidi negli organismi acquatici (Katagi, 2010).

L'utilizzo di metalotioneine (MTS) sembra essere invece il metodo più valido per indicare l'esposizione di un organismo ai metalli. Infatti le MTS sono indotte da metalli residui e la misurazione dei loro livelli è attualmente applicata per vertebrati e invertebrati (Sarkar et al., 2006).

Recenti strategie di monitoraggio stanno iniziando a rimpiazzare quelle classiche, prendendo in considerazione gli organismi e alcuni dei loro peculiari processi fisiologici per individuare biomarcatori alternativi. Vi

è una crescente evidenza in letteratura del ruolo rivestito dagli invertebrati marini nella valutazione dell'impatto dello stress da inquinanti ambientali.

Pertanto negli ultimi anni sono stati effettuati numerosi studi finalizzati ad identificare nuovi organismi modello per testare la tossicità, basandosi su alcune caratteristiche quali l'abbondanza in natura, l'importanza ecologica e commerciale e la posizione nella catena alimentare.

Sebbene il riciclo di mare sia stato considerato per decenni il miglior modello per studi di ecotossicologia (Bellas et al., 2005) e molti autori puntano sui vertebrati (Hotchkiss et al., 2008; Ankley e Johnson, 2004; Gray et al., 2004; Scholz e Mayer, 2008), diverse specie di organismi sentinella come policheti, copepodi, mitili, pesci etc. (Sarkar et al., 2006; Raisuddin et al., 2007; Hutchinson et al., 1995; Lee et al., 2007) sono possibili candidati per i test di routine di ecotossicità.

I meccanismi riproduttivi di invertebrati marini sembrano essere molto sensibili alle sostanze inquinanti, per cui molti studi si sono concentrati sull'importanza della riproduzione e i sistemi e processi correlati

ad essa come obiettivo di contaminazione ambientale.

I nostri recenti lavori che hanno evidenziato come gli xenobiotici siano in grado di interferire con i meccanismi molecolari alla base del processo riproduttivo dell'ascidia *Ciona intestinalis* confermano precedenti osservazioni (Zega et al., 2009) sul ruolo dei tunicati come organismo modello per testare la tossicità indotta dall'inquinamento costiero. Il fatto che quest'ascidia abbia tutti i requisiti per essere un buon bioindicatore e in più sia evolutivamente l'invertebrato più simile ai vertebrati (Delsuc et al., 2006), rende i suoi processi riproduttivi un interessante oggetto sperimentale per individuare il rischio ecologico a livello di popolazioni e di comunità.

Conclusioni

Identificare nuovi biomarcatori nell'ambito del monitoraggio ambientale marino è un'esigenza portata di recente all'attenzione della comunità scientifica internazionale nel corso di incontri tra esperti del

settore (2° Congresso iberico su contaminazione ambientale e tossicologia; la sessione di lavoro Wingspread; OCSE Programma Disciplinare per le prove; US Environmental Protection Agency).

I dati che abbiamo discusso in quest'articolo mostrano risultati contrastanti sulla possibile selezione di nuove molecole e di appropriati sistemi e modelli animali; ciò rende ancora arduo indicare il sistema test più affidabile e pertinente a tali scopi. Tuttavia, poiché gli invertebrati sono componenti importanti di tutti gli ecosistemi marini (Ramirez Llodra, 2002) e dato che la loro riproduzione e sopravvivenza sono seriamente minacciate dall'inquinamento marino come emerge dagli studi da noi effettuati, possiamo *bona fide* affermare che la *Ciona intestinalis* può essere considerato un "top model" (Figura 2) indicatore dei livelli di inquinamento e dell'impatto dei contaminanti marini mentre il processo riproduttivo della *Ciona* stessa può essere un biomarcatore adeguato agli scopi di un programma di biomonitoraggio. ●

© Riproduzione riservata

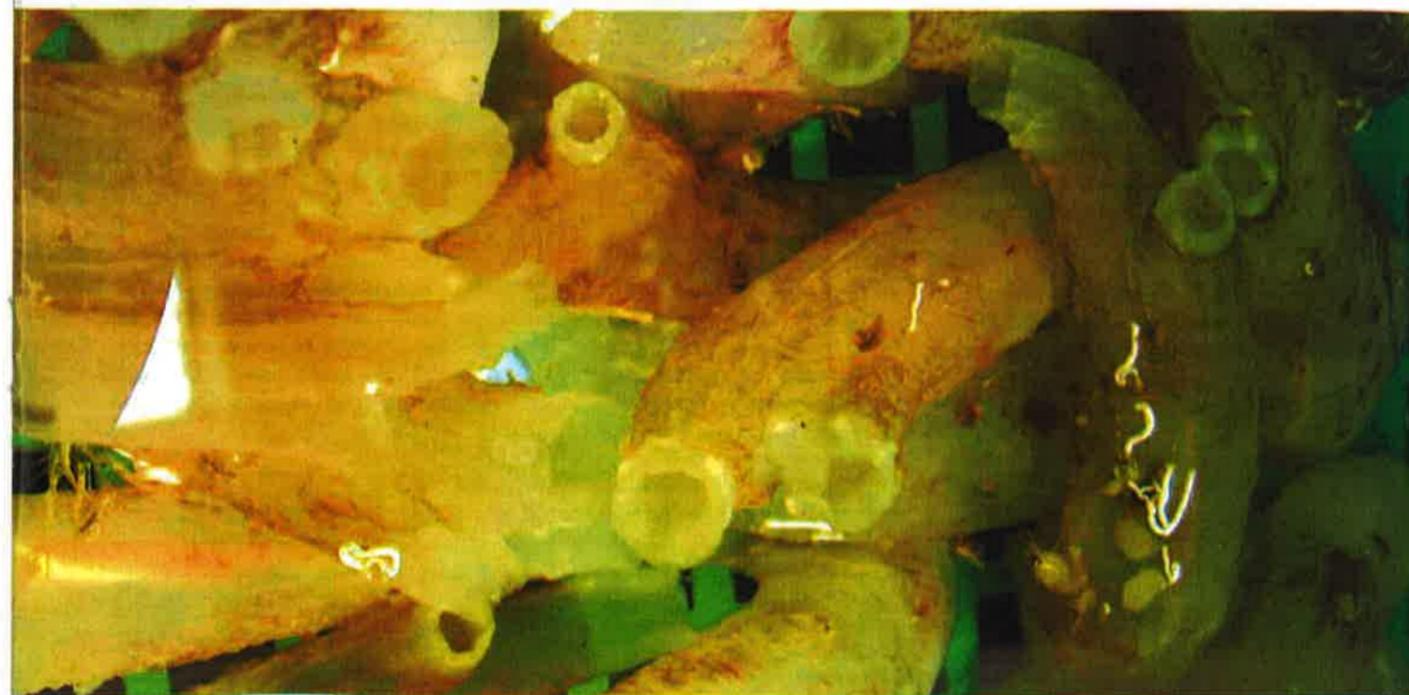


Figura 1. L'invertebrato marino *Ciona intestinalis* (ascidia).

© Paola Cirino.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Ankley GT, Johnson RD. 2004 Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *ILAR J.* 45, 469-83.
- 2 Bellas J, Beiras R, Mariño-Balsa JC, Fernández N. 2005 Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology.* 14(3), 337-53.
- 3 Cajaville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. 2000 The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ.* 247, 295-311.
- 4 Carnevali O, Maradonna F. 2003 Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers. *Gen Comp Endocrinol.* 131, 203-8.
- 5 Dale B, DeFelice LJ. 1984 Sperm-activated channels in ascidian oocytes. *Dev Biol.* 101, 235-239.
- 6 Danzo BJ. 1997 Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ Health Persp.* 105, 294-301.
- 7 Delsuc F, Brinkmann H, Chourrou D, Philippe H. 2006 Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature.* 439, 965-68.
- 8 Fossi MC, Casini S, Marsili L, Neri G, Mori G, Ancora S, Moscatelli A, Ausili A, Notarbartolo-Sciarra G. 2002 Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish. *Mar Environ Res.* 54, 667-71.
- 9 Gallo A, Silvestre F, Cuorno A, Papoff F, Tosti E. 2011 Impact of metals on the reproductive mechanism of *Ciona intestinalis*. *Marine Ecology.* 32, 222-231.
- 10 Gallo A, Tosti E. 2013 Adverse Effect of Antifouling Compounds on the Reproductive Mechanisms of the Ascidian *Ciona intestinalis*. *Marine Drugs.* 11, 3554-3568.
- 11 Gallo A, Tosti E. 2015a Ion currents in gametes physiology. *Int. J. Dev. Biol.* 59: 261-270.
- 12 Gallo A, Tosti E. 2015b Reprotoxicity of the antifoulant chlorothalonil in ascidians: an ecological risk assessment. *PLoS ONE.* 10(4): e0123074.
- 13 Goldberg ED. 1986 TBT: an environmental dilemma. *Environ. Sci. Policy.* 28, 17-44.
- 14 Gray LE Jr, Wilson V, Noriega N, Lambright C, Furr J, Stoker TE, Laws SC, Goldman J, Cooper RL, Foster PM. 2004 Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. *ILAR J.* 45, 425-37.
- 15 Holt EA, Miller SW. 2010 Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. *Nature Education Knowledge.* 3(10), 8.
- 16 Horiguchi T. 2006 Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanisms of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex. *Environ Sci.* 13, 77-87.
- 17 Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson VS, Hartig PC, Ankley GT, Foster PM, Gray CL, Gray LE. 2008 Fifteen years after "Wingspread"—environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci.* 105, 235-59.
- 18 Hutchinson TH, Jha AN, Dixon DR. 1995 The polychaete *Platynereis dumerilii* (Audouin and Milne-Edwards): a new species for assessing the hazardous potential of chemicals in the marine environment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 31, 271-81.
- 19 Katagi T. 2010 Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. *Rev Environ Contam Toxicol.* 204, 1-132.
- 20 IMO 2001. Antifouling Systems. International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships, London.
- 21 Lee KW, Raisuddin S, Hwang DS, Park HG, Lee JS. 2007 Acute toxicities of trace metals and common xenobiotics to the marine copepod *Tigriopus japonicus*: Evaluation of its use as a benchmark species for routine ecotoxicity tests in Western Pacific coastal regions. *Environ Toxicol.* 22, 532-8.
- 22 Raisuddin S, Kwok KW, Leung KM, Schlenk D, Lee JS. 2007 The copepod *Tigriopus*: a promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat Toxicol.* 83, 161-73.
- 23 Ramirez Llodra E. 2002 Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Adv Mar Biol.* 43, 87-170.
- 24 Sarkar A, Ray D, Shrivastava AN, Sarkar S. 2006 Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology.* 15, 333-40.
- 25 Scholz S, Mayer I. 2008 Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Mol Cell Endocrinol.* 293, 57-70.
- 26 Titley-O'Neal CP, Munkittrick KR, Macdonald BA. 2011 The effects of organotin on female gastropods. *J Environ Monit.* 13, 2360-2388.
- 27 Tosti E. 2006 Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod Biol Endocr.* 4, 26.
- 28 Tosti E. 2010 Dynamics functions of ion currents in early development. *Mol Repr Dev.* 77, 856-867.
- 29 Tosti E, Boni R. 2004 Electrical events during gamete maturation and fertilisation in animals and human. *Human Reproduction Update.* 10, 53-65.
- 30 Tosti E, Gallo A, Silvestre F. 2011 Ion currents involved in oocyte maturation, fertilization and early developmental stages of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol Repr Dev.* 78, 854-60.
- 31 Tsangaris C, Kormas K, Stroglyoudi E, Hatzianestis I, Neofitou C, Andral B, Galgani F. 2010 Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 151, 369-78.
- 32 Wurl O, Obbard JP. 2004 A review of pollutants in the sea-surface microlayer (SML): a unique habitat for marine organisms. *Mar Poll Bulletin.* 48, 1016-30.
- 33 Zega G, Pennati S, Pestarino M, De Bernardi F. 2009 Solitary ascidian embryos (Chordata, Tunicata) as model organisms for testing coastal pollutant toxicity. *ISJ.* 6, 529-534.



Figura 2. La *Ciona intestinalis*: da specie minacciata e a rischio estinzione a "top model" per gli studi ecotossicologici.

©Giampiero Lanzotti.

Lifevin^C

... un nuovo **BENESSERE** per la tua microcircolazione

SEMI E FOGLIE DI UVA ROSSA, UNITI ALLA VITAMINA C



UVA ROSSA

- sostiene la microcircolazione
- aiuta le normali funzioni cardiovascolari

VITAMINA C

- protegge le cellule dallo stress ossidativo
- favorisce la normale formazione del collagene

Lifevin C è un'ottima combinazione sinergica di semi e foglie di uva rossa e vitamina C.

L'uva rossa (*Vitis Vinifera*) dalle spiccate proprietà antiossidanti, favorisce le funzioni del microcircolo e la regolare attività cardiovascolare; le foglie di uva rossa sono utili per le funzioni vasoprotettive. Per un'azione ancora più efficace è stata aggiunta la vitamina C che contribuisce a proteggere le cellule dallo stress ossidativo. La vitamina C inoltre, grazie alla sua capacità di intervenire nella formazione del collagene, concorre al mantenimento della funzionalità dei vasi sanguigni.

L'integratore alimentare Lifevin C viene prodotto senza eccipienti, coloranti e dolcificanti. In vendita nelle erboristerie, negozi di alimentazione naturale, farmacie e parafarmacie.

L'integratore alimentare Lifevin C viene prodotto senza eccipienti, coloranti e dolcificanti. In vendita nelle erboristerie, negozi di alimentazione naturale, farmacie e parafarmacie.

Ringraziamenti:

Ringraziamo la Dott.ssa Paola Cirino del RIMAR, Stazione Zoologica, per averci fornito le immagini della *Ciona intestinalis* (figura 1).

Ringraziamo la Dott.ssa Flammitta Formisano e il Sig. Giampiero Lanzotti per il disegno e l'elaborazione della figura 2.



Natural Point srl • via Pompeo Mariani, 4 - 20128 Milano
tel. 02.27007247 - info@naturalpoint.it - www.naturalpoint.it

**NATURAL
POINT**