

## METODI DI INDAGINE TOSSICOLOGICA SU PARALARVE DI *O. VULGARIS*

I.A.M.C.-C.N.R. di Capo Granitola



### Metodi di indagine tossicologica su paralarve di *Octopus vulgaris*.

C. Bennici<sup>A</sup>, A. Cuttitta<sup>A</sup>, A. Nicosia<sup>A</sup>, T. Masullo<sup>A</sup>, M. Tagliavia<sup>A</sup>, G. Biondo<sup>A</sup>, G. M. Armeri<sup>A</sup>,  
M. Salamone<sup>A</sup>, M. Musco<sup>A</sup>, S. Mazzola<sup>B</sup>.

A- Laboratory of Molecular Ecology and Biotechnology, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia;

B - Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

## 1. INTRODUZIONE

Lo scopo del seguente lavoro è quello di mettere a punto nuove metodiche finalizzate alla conduzione di studi tossicologici relativi alla risposta delle paralarve di *Octopus vulgaris* in relazione a determinati agenti inquinanti. E' nota la difficoltà di mantenimento in vita di paralarve di *O. Vulgaris* in cattività, soprattutto quando gli animali sono prossimi al passaggio dalla fase larvale pelagica alla fase giovanile bentonica. Per questo motivo gli esperimenti sono stati svolti nel periodo che viene subito dopo la schiusa, per non alterare, con dati di mortalità caratteristici dell'allevamento larvale di questa specie, gli studi sugli effetti dei contaminanti. Per far ciò ci si è occupati in una prima fase della riproduzione di *Octopus vulgaris* in cattività ed in condizioni controllate, ed una volta ottenute le paralarve si è passati ad effettuare sulle stesse esperimenti di eco tossicologia-molecolare. In particolare, sono state messe a punto tecniche di stabulazione dei riproduttori e mantenimento in vita delle paralarve, somministrazione dei contaminanti, e in ultima analisi è stata effettuata una valutazione biomolecolare della risposta degli organismi ai contaminanti.

## 2. *Octopus vulgaris*

### 2.1 *Octopus vulgaris* –Biologia

Il polpo, nome scientifico *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797), della famiglia Octopodinae è un mollusco appartenente alla grande classe Cephalopoda (dal greco *kephale*= testa e *pous*=piede. Sono invertebrati marini diffusi in quasi tutti gli oceani e mari del mondo, ad eccezione delle zone polari e subpolari.

Il loro habitat è caratterizzato dalle zone tropicali, subtropicali e temperate entro i 100-150 metri di profondità. Vivono soprattutto nelle acque costiere e nella parte superiore della piattaforma continentale.

Il polpo presenta un corpo ovale, con la testa ed il corpo fusi insieme a formare un'unica struttura chiamata mantello; sono presenti otto protuberanze che costituiscono i tentacoli o braccia. Nella testa sono localizzati lateralmente due piccoli occhi sporgenti.

Il corpo ha una pelle liscia che può cambiare di colore a seconda dell'ambiente nel quale si trova l'animale. Questa forma di mimetismo è una strategia adottata dal polpo per meglio mimetizzarsi con l'ambiente ed avviene grazie a particolari cellule pigmentate (cromatofori) poste nella cute e a cellule, dette iridofori, responsabili dei riflessi e delle iridescenze.

Tra i diversi animali è sicuramente quello che meglio riesce a mimetizzarsi più rapidamente. Possiede otto tentacoli (di cui uno trasformato in organo copulatore chiamato ectocotilo) ciascuno provvisto di due serie di ventose, maggiormente sviluppate nei maschi piuttosto che nelle femmine. Al centro dei tentacoli, sulla parte inferiore del corpo, si trova la bocca che termina con un becco corneo usato per rompere i gusci delle conchiglie ed il carapace dei crostacei, i quali costituiscono il principale alimento di *O. vulgaris*.

Nella parte posteriore del mantello sono presenti da 7 a 11 lamelle branchiali ed un sifone che serve per espellere l'acqua, utile per la respirazione e la locomozione.

Privi di scheletro e di conchiglie all'interno del corpo, possiedono una ghiandola del nero che produce un liquido, comunemente chiamato inchiostro, che viene espulso nelle situazioni di pericolo al fine di confondere gli aggressori e sfuggire dagli stessi nascondendosi o mimetizzandosi. Il polpo ha un encefalo di grandi dimensioni ed è un animale che ha dimostrato la capacità di apprendere azioni che dipendono dalla memoria.



Fig. 1: Esemplare di *Octopus vulgaris*

I polpi sono degli attivi predatori e si nutrono principalmente di bivalvi (cozze, vongole, ostriche, ecc.), gasteropodi e crostacei. Relativamente alla riproduzione, il genere *Octopus* presenta entrambi i sessi, quando arriva il periodo dell'accoppiamento il maschio si avvicina alla femmina e dopo un breve corteggiamento inserisce nella spermateca della femmina i suoi spermatozoi. L'atto riproduttivo può durare anche diverse ore. La stessa coppia può ripetere l'accoppiamento più volte nell'arco di una settimana. La femmina, dopo un periodo di circa 30 giorni durante il quale trattiene le uova all'interno del suo corpo, le depone in acque poco profonde e le attacca alla parete superiore della tana, in un luogo protetto (sia esso un buco o una crepa). Vengono deposte da 100.000 a 500.000 uova e durante tutto il periodo dell'incubazione la femmina non si allontana dalle covate. Infatti, durante tutto il periodo di incubazione, la femmina rimane vicino al nido, pulendolo e difendendo le uova da eventuali predatori, ossigenandole inoltre tramite getti d'acqua prodotti con il sifone esalante.

Durante questo periodo le femmine non mangiano ed infatti in genere muoiono poco dopo la schiusa delle uova avendo perso circa un terzo del loro peso.

### **3. Fasi di allevamento**

#### **3.1 Costituzione dello stock di riproduttori e loro condizionamento**

Il reperimento dei riproduttori attraverso la cattura di animali selvatici avviene solitamente nel mese di settembre e si protrae sino alla fine di ottobre, quando si raggiunge un numero consistente di esemplari adulti (generalmente tra 30 e 40 individui sopra i 500g di peso) tra maschi e femmine.

Il reperimento dei riproduttori necessari per il nostro studio è avvenuto nel mese di gennaio. Gli esemplari sono stati reclutati tramite cattura manuale effettuata da un operatore. Gli individui sono stati prelevati dalle tane avendo cura di non procurare ferite o mutilazioni.

Gli animali sono stati mantenuti in vasche cilindriche da 2,5 m<sup>3</sup> in PRFV, ciascuna con ricambio continuo di acqua di mare disposte all'ombra al fine di evitare e/o ridurre la proliferazione di macro alghe ma con mantenimento del fotoperiodo naturale.

L'acqua di mare prima di arrivare nelle vasche è stata mantenuta a ciclo termico naturale.

Gli adulti al loro arrivo sono stati mantenuti separati con delle gabbie individuali.

I maschi sono stati quindi spostati nel momento in cui le femmine hanno assunto il loro comportamento tipico del periodo riproduttivo (rimangono molto rintanate e non si alimentano), sintomatico del fatto che sicuramente si sono accoppiate e sono prossime alla deposizione.

Il mantenimento degli adulti è stato effettuato alimentando gli animali con alimenti freschi e congelati (granchi, cozze, gamberi e pesci vari). La costituzione ed il mantenimento di uno stock di riproduttori in cattività, consente di avere elevate sopravvivenze dei soggetti adulti e ottime percentuali di

fecondazione delle femmine con relative abbondanti deposizioni di uova (Iglesias et al., 2000; Lenzi et al., 2002; Mattei et al., 2002; De Wolf et al., 2004).

Le femmine fertili, in cattività riescono a deporre tra le 50.000 e 300.000 uova, con quantità crescenti in relazione alla maggiore taglia.

In condizioni di allevamento si ottengono mediamente delle schiuse di paralarve viabili superiori al 90%. Il miglioramento della gestione di tutto il ciclo dei riproduttori fino alla fase della schiusa delle uova, ha consentito di aumentare sia la quantità di uova prodotte per femmina, sia la schiusa di quelle viabili e come conseguenza finale ottenere paralarve alla schiusa con un potenziale di crescita superiore a quello che si poteva ottenere solo alcuni anni fa.

In letteratura sono riportate sopravvivenze sino ai 30 giorni di età di paralarve riprodotte che arrivano a circa il 50% (Iglesias et al., 2004; Carrasco et al., 2005; Okumura et al., 2005) per poi scendere rapidamente a meno del 20% dopo i 40 giorni (Carrasco et al., 2005).

### **3.2 Deposizione e mantenimento delle uova**

Nel mese di giugno sono iniziate le prime deposizioni di uova.

La deposizione delle uova da parte delle femmine, è avvenuta sulle pareti delle vasche. Generalmente le femmine protraggono la deposizione per un periodo variabile tra 5 e 15 giorni.

Le uova sono state lasciate in presenza delle cure parentali della madre in quanto da studi precedenti, è emerso che questo consente una schiusa pressoché totale delle paralarve (Boletzky, S.v., 1987). La madre infatti ha ossigenato e pulito costantemente i grappoli con intermittenti getti d'acqua emessi dal sifone esalante. Le uova si presentano di piccole dimensioni, di forma simile ad un chicco di riso e di colore chiaro, biancastro. La lunghezza media delle uova era  $3,18 \pm 0,5$  mm e la larghezza  $1,04 \pm 0,07$  mm.

Le uova emesse sono attaccate fra loro a formare una serie di grappoli grazie ad un secreto ghiandolare che viene prodotto durante la deposizione (Figura 2).



Fig. 2: Grappoli di uova di *O. vulgaris*

Questo secreto è un mucopolisaccaride che si indurisce a contatto con l'acqua comportandosi come un cementificante. Il numero di uova per cm che si trova in queste stringhe ovali è di 29-32 uova. In Figura 3 riportiamo alcune fasi dello sviluppo embrionale.

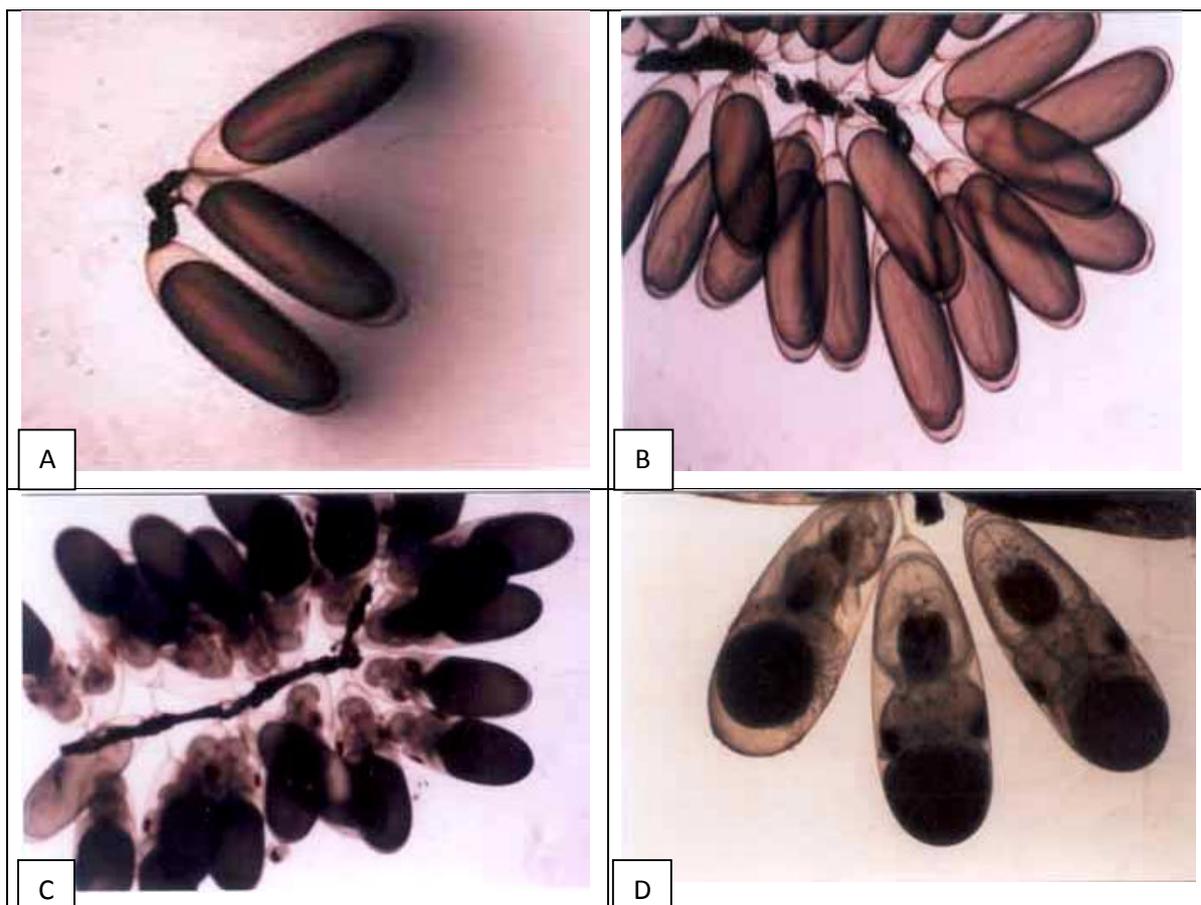


Figura 3 - Quattro diverse fasi dello sviluppo embrionale di *O. vulgaris*

La schiusa delle prime larve è avvenuta dopo sei settimane dall'inizio della deposizione e si è protratta per cinque giorni. Le paralarve sono state alimentate fin dalla schiusa con naupli appena nati di *Artemia salina* provenienti da cisti precedentemente decapsulate con metodo chimico.

Già dalla schiusa le paralarve erano dotate di alcuni cromatofori (Figura 4a )

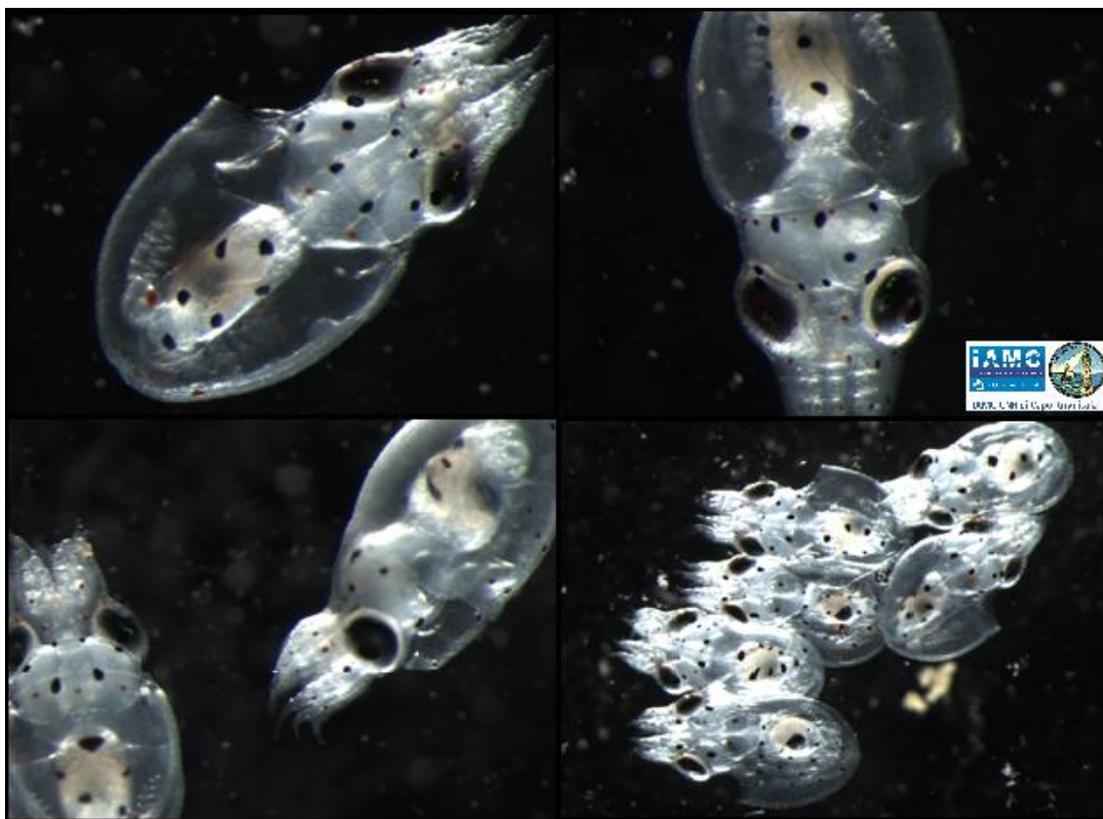


Fig 4a – Paralarve di *O. vulgaris* a 5 giorni



Fig. 4b- Paralarve di *Octopus vulgaris* a 7 giorni

#### **4 Isolamento ed analisi biomolecolari.**

Le differenti cellule di ogni organismo pur avendo il medesimo patrimonio genetico, esprimono in modalità diverse particolari set genici. Il Gene Expression Pattern derivante, ha la funzione di permettere di svolgere le differenti attività fisiologiche a cui quel determinato tipo cellulare (e non un altro caratterizzato da un profilo d'espressione diverso) è destinato, come il differenziamento, la proliferazione o molto più genericamente, di rispondere agli stimoli esterni come quelli derivanti da insulti chimico fisici.

È possibile pertanto individuare tra i geni espressi in un determinato momento ed in risposta a specifici stimoli, dei marcatori di un particolare stato. Su tale base Yang et al., utilizzando l'embrione di zebra fish come modello, hanno determinato i "Gene Expression Patterns" specifici per la risposta ad 11 diversi agenti tossici.

Al fine di caratterizzare la risposta in seguito al trattamento con cationi divalenti quali **Cadmio** e **Manganese**, sono state utilizzate n°7 contenitori in vetro contenenti ognuno 1 l di acqua di mare precedentemente filtrata (MFSW-Millipore filtered sea water) e 50 larve. In n°3 contenitori è stato aggiunto Cadmio (sotto forma di  $CdCl_2$ ) a tre diverse concentrazioni 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 1 mM. In altri tre contenitori è stata aggiunta la stessa concentrazione di Manganese (sotto forma di  $MnCl_2$ ). Le restanti 50 paralarve sono state incubate in acqua di mare non contaminata come controllo.

Al fine di mantenere costante la temperatura dell'acqua durante l'esperimento, i contenitori sono stati immersi nella vasca dalle quali erano state prelevate le larve.

##### **4.1 Processamento**

Dopo 24 ore dall'esposizione ai contaminanti, si è proseguito con il prelievo delle paralarve. Una volta prelevate, sono state inserite all'interno di provette contenenti sufficienti volumi di RNA later, un reagente stabilizzante acquoso non tossico, in grado di permeare i tessuti rapidamente per stabilizzare e proteggere l'integrità dell'RNA in situ. La stabilizzazione dell'RNA è infatti un prerequisito fondamentale per l'analisi dell'espressione genica in quanto eventuali attività di degradazione devono essere bloccate al fine di evitare alterazioni delle specie in reazione. Pertanto, nelle fasi successive verranno approntate analisi di natura quantitativa. Il reagente è in grado di preservare la stabilità dell'RNA fino ad un giorno a 37° C, 7 giorni a temperature comprese tra 15–25°C, circa 4 settimane in un range di temperatura tra 2 ed 8°; alternativamente i campioni possono essere conservati a lungo termine a –20°C or –80°C.

#### 4.2 Estrazione dell'RNA

L'RNA è una macromolecola costituita da una catena di ribonucleotidi la cui sintesi è catalizzata da diverse classi di RNA polimerasi (negli eucarioti I,II,III), esse utilizzano un filamento di DNA come stampo che viene dunque trascritto in RNA sia esso messaggero, tRNA o rRNA.

Varie sono le procedure più o meno sovrapponibili tra loro finalizzate all'estrazione dell'RNA totale a partire da matrici diverse siano esse tessuti o cellule. Qualora si lavori con tessuti risulta necessario inizialmente disgregare lo stesso, degradando con l'ausilio di mezzi chimici e fisici la matrice extracellulare e le connessioni tipiche del tessuto in esame, mediante omogeneizzazione. Quest'ultima può essere effettuata manualmente, con appositi sistemi come il Dounce costituito da un tubo in vetro o pyrex ed un pestello in teflon, od utilizzando specifici tissue grinder, mulini o microdismembratori. La lisi è avvenuta in presenza di agenti riducenti, quali:

- $\beta$ -mercaptoetanolo in grado di denaturare le proteine rompendo i ponti disolfuro indispensabili per il mantenimento della struttura dell'RNasi;
- guanidinio tiocianato, un agente lisante caotropico, il quale utilizzato ad alte concentrazioni (5M) è capace di proteggere l'RNA dalle RNasi endogene, enzimi molto stabili, che non necessitano di alcun cofattore, molto resistenti alle alte temperature e presenti ovunque e in grado di degradare l'RNA.

Data la tossicità dei reagenti utilizzati si è reso necessario lavorare utilizzando la cappa chimica aspirante. Inoltre, sono indispensabili degli accorgimenti da parte degli operatori, relativi ad esempio alla sterilizzazione delle soluzioni e della vetreria con materiale RNAasi free, in quanto non è sempre sufficiente l'uso del DEPC (dietilpirocarbonato) per la rimozione dell'RNasi, o ancora l'uso dei guanti sterili per tutto il periodo di manipolazione di campioni, provette, pipette, reagenti e soluzioni.

Dopo di ciò si proceduto all'estrazione dell'RNA utilizzando un sistema cromatografico liquido-solido di adsorbimento in cui la fase solida è costituita da una matrice in silica o fibra di vetro che opportunamente attivata è in grado di legare gli acidi nucleici. Più precisamente la purificazione consta di 3 step (fig. 5a):

- **binding**: il lisato viene applicato sulla colonna in presenza di etanolo così da favorire il legame dell'RNA alla matrice che verrà dunque immobilizzato. Tale fase avviene in particolari condizioni derivanti dall'alta forza ionica della soluzione. La presenza di guanidinio tiocianato in concentrazione pari a valori superiori a 4M ne permette un'elevata capacità di legame;

- **lavaggio**: soluzioni a forza ionica decrescente vengono fatte fluire attraverso la matrice così da rimuovere molecole legatesi specificatamente alla fase solida conferendo così purezza alla procedura eliminando contaminanti che potrebbero co-purificare con l'RNA ed inibire le reazioni a valle;

- **eluizione**: il distacco dell'RNA totale dalla matrice avviene in condizioni opposte a quelle del binding, per cui in presenza di soluzioni a bassa forza ionica quali Tris 10mM pH7.5 o dH<sub>2</sub>O RNase-free l'acido nucleico passerà dalla fase stazionaria a quella liquida ed eluito. Il materiale così purificato può esser conservato a -20°C o a -80°C per almeno un anno.

In realtà insieme all'RNA totale co purifica una certa quota di DNA genomico che deve essere rimosso eliminando così interferenze ed il rischio di alterazioni dei risultati a valle. Tale contaminazione verrà rimossa mediante trattamento successivo con DNasi.

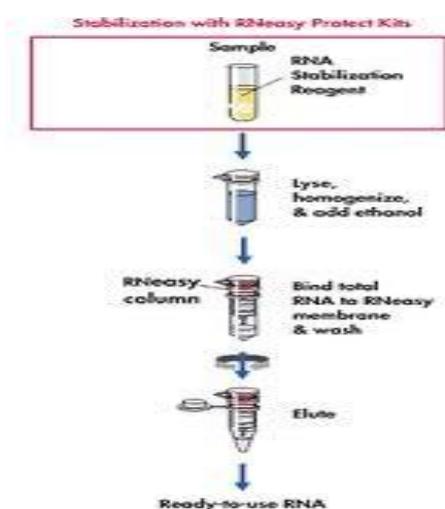


Fig. 5a

### 5.3 Quantificazione e valutazione della qualità dell'RNA estratto.

L'RNA estratto è stato quantizzato mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm (Figura 5b). Gli acidi nucleici in virtù delle basi azotate di cui sono costituiti presentano un elevato coefficiente di estinzione molare a tale lunghezza d'onda che è dunque caratteristico del DNA a doppio e singolo filamento e dell'RNA.

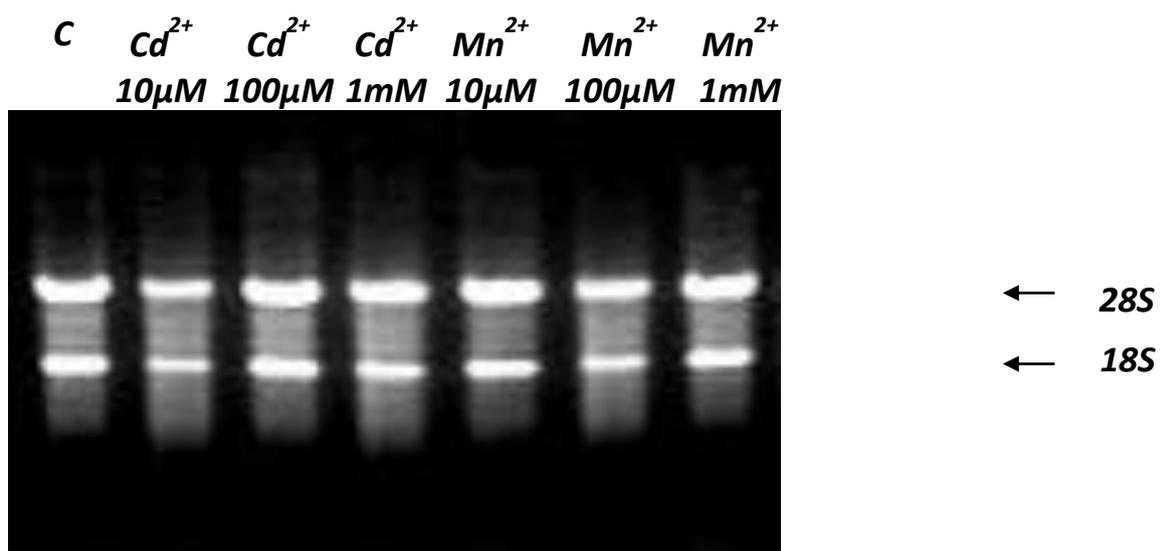
Un valore di assorbimento alla lunghezza d'onda di 260 nm pari ad 1 corrisponde ad una soluzione 44 µg/ml di RNA ( $Abs_{260}=1 \rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ ).



**Figura 5b:** Strumento che misura l'assorbimento luminoso e permette di quantificare gli acidi nucleici.

L'interferenza dovuta a contaminanti può essere evidenziata mediante il calcolo dei "rapporti" di Abs a lunghezza d'onda diverse. Per stimare la purezza dell'RNA, dal momento che le proteine assorbono a 280nm, il rapporto 260/280 dovrebbe dare approssimativamente un valore pari a 2.0.

Così quantizzati i differenti campioni di RNA (circa 1µg) sono stati caricati su gel d'agarosio in condizioni denaturanti al fine di valutarne l'integrità e la distribuzione delle bande. (Fig. 5c)



**Figura 5c:** Analisi su gel d'agarosio 1.5% degli RNA totali estratti dai diversi campioni

In particolare è stato analizzato il rapporto tra le popolazioni a più elevato peso molecolare di RNA ribosomale 28S e 18 S; essendo questo approssimativamente pari a 3:1 si è assunto che la qualità dell'RNA estratto fosse sufficiente per le successive reazioni.

La rimozione del DNA genomico copurificante è stata effettuata mediante trattamento con DNasi-I che in presenza di 2mM MgCl<sub>2</sub> e 50mM KCl (cofattori essenziali) è in grado di digerire DNA a singolo o a doppio filamento e ridurlo in oligonucleotidi contenenti presentanti un'estremità 5'-fosfato. Eliminate in tal modo la contaminazione di DNA genomici, l'RNA è pronto per la successiva conversione in cDNA.

#### **4.3 RT.PCR.**

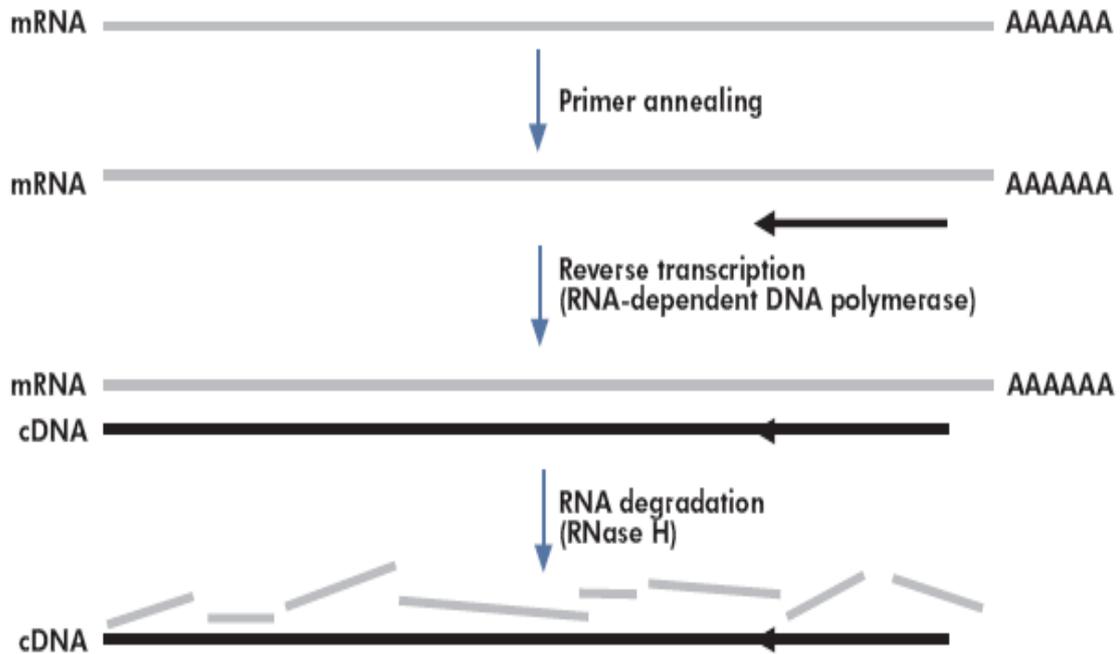
La PCR con retrotrascrizione è una tecnica che permette di ottenere copie in DNA a partire da molecole di RNA che vengono sottoposte inizialmente a reazione di retro trascrizione così da ottenere copie di quel determinato trascritto sotto forma di cDNA, molecola che può essere utilizzata da stampo dalla Taq polimerasi.

Le reverse transcriptase sono enzimi caratteristici di retrovirus come l'avian myeloblastosis virus (AMV), il Moloney murine leukemia virus (MMLV), o ancora lo human immunodeficiency virus (HIV); generalmente si tratta di enzimi multifunzionali caratterizzati da 3 distinte attività enzimatiche/domini: DNA polimerasi RNA-dipendente, un'esoribonucleasi DNA/RNA dipendente (RNase H), ed una DNA-polimerasi DNA-dipendente.

In vivo, la combinazione di queste tre differenti attività consente la conversione del genoma ad RNA in un duplex di DNA necessario per il processo infettivo ed eventualmente integrativo.

La DNA polimerasi RNA-dipendente (retrotrascrittasi) catalizza la reazione di reverse transcription utilizzando come templatò l'RNA e convertendolo in cDNA (DNA complementare) in presenza di dNTPs ed oligo-dT (in grado di appaiarsi alla coda polyA del messaggero) e random primers (da soli o in combinazione) che fungeranno da innesco.

La reazione di retrotrascrizione in vitro richiede quasi esclusivamente una sola attività enzimatica dal momento che l'RNasi H non viene più utilizzata attuando la fase di PCR utilizzando cDNA a singolo filamento (Figura 6).



**Figura 6:** Processo di retrotrascrizione.e sintesi del cDNA

Eguali quantità dei sei differenti RNA (500ng) sono stati sottoposti a retrotrascrizione in presenza di una mix di oligo dT e random primers e della trascrittasi inversa nell'opportuno buffer di reazione.

Al termine della reazione, ottenuti i cDNA questi sono stati sottoposti a reazioni di PCR separate, in presenza di primer specifici per ogni gene analizzato.

#### **4.4 PCR: Reazione a catena della polimerasi.**

La PCR è una tecnica che consente di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico, infatti è una reazione di amplificazione *in vitro* di uno specifico frammento di DNA per mezzo di una DNA polimerasi.

Lo strumento utilizzato è il termociclatore. (Figura 7a)



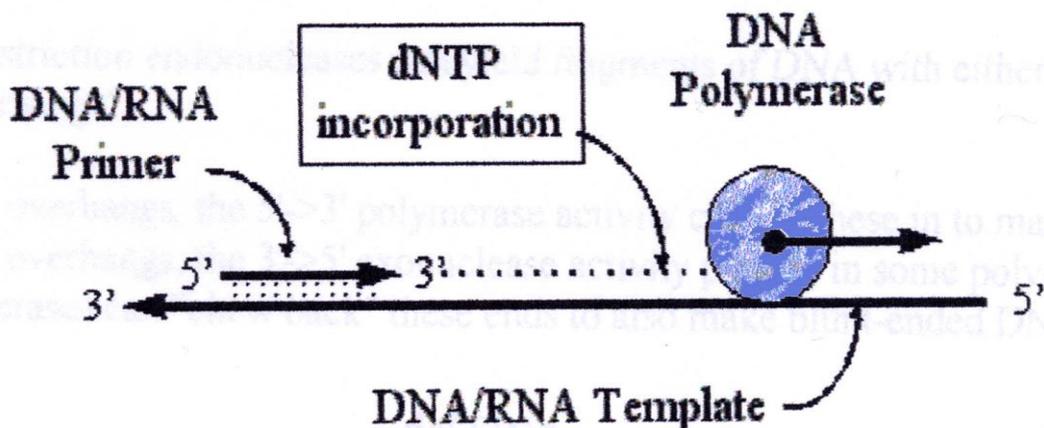
**Figura 7a:** Strumento programmabile e autoriscaldante, in cui è possibile settare le varie fasi della reazione.

Questa reazione utilizza una polimerasi termostabile, la Taq polimerasi, isolata da *Thermus aquaticus*, un batterio che vive nelle acque termali.

Questa polimerasi ha un optimum a 72°C e resiste alle alte temperature usate negli step di denaturazione, permettendo l'automazione dell'intera procedura ed un notevole miglioramento della specificità di reazione.

Un prerequisite indispensabile al realizzarsi della reazione è la conoscenza delle sequenze alle estremità della regione bersaglio.

Infatti, nella reazione sono coinvolti due oligonucleotidi a singolo filamento (*primer*) complementari uno all'estremità 3' e l'altro all'estremità 5' del segmento di DNA che si vuole amplificare, che costituiscono gli elementi di innesco dell'attività della DNA polimerasi. (Figura 7b)



**Figura 7b:** La DNA polimerasi aggiunge nucleotidi all'estremità 3'OH di un primer.

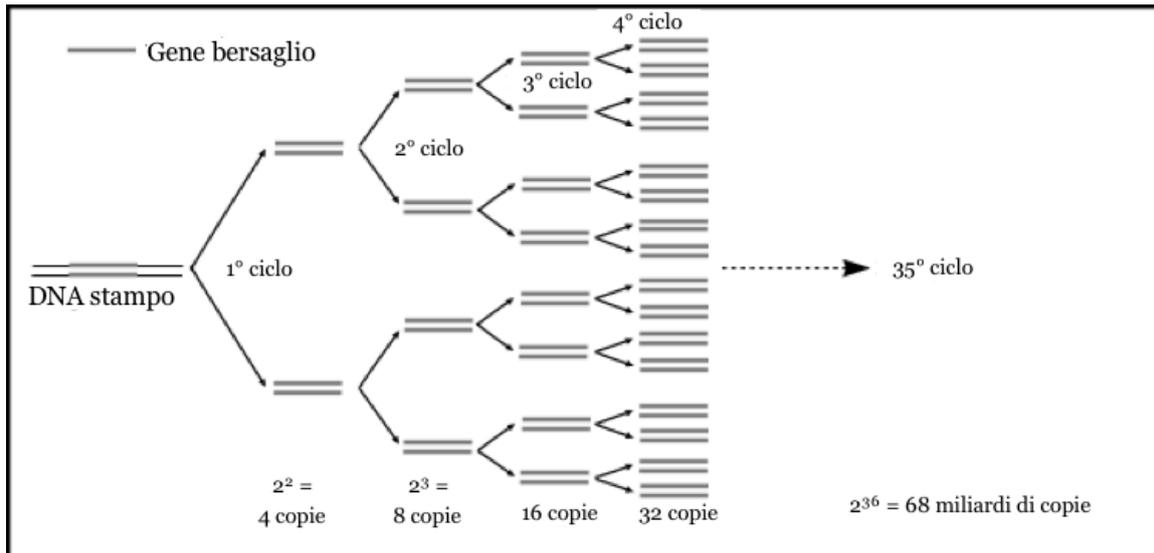
Altri elementi coinvolti nella reazione sono i desossiribonucleotidi e il  $MgCl_2$ : i primi sono necessari per la sintesi delle nuove eliche ed il secondo rappresenta il cofattore indispensabile alla DNA polimerasi. La reazione prevede il succedersi di cicli di amplificazione durante i quali si alternano tre diverse temperature che rendono possibile rispettivamente:

- 1) la **denaturazione** della doppia elica del DNA stampo in due singole eliche (alla temperatura di 95 °C);
- 2) l'**appaiamento** degli inneschi oligonucleotidici alle sequenze di DNA a singola elica ad essi complementari e localizzati alle estremità del frammento bersaglio (ad una temperatura in genere compresa tra i 50 ed i 70 °C)
- 3) l'**estensione** degli inneschi mediante aggiunta di nucleotidi nella direzione 5'-3' ad opera della DNA polimerasi che porta alla sintesi di una nuova elica complementare al DNA stampo (ad una temperatura compresa tra i 68 e i 72 °C).

Il numero di nuove molecole di DNA aumenta al succedersi di ogni ciclo.

Infatti, durante il primo ciclo da un singola molecola di DNA si ottengono due molecole, ciascuna costituita da un'elica "vecchia" che ha fatto da stampo alla sintesi dell'elica "nuova"; al secondo ciclo ciascuna delle due molecole si denatura, i quattro filamenti di DNA che si ottengono fanno da stampo per l'attività della DNA polimerasi ed alla fine le molecole di DNA diventano quattro.

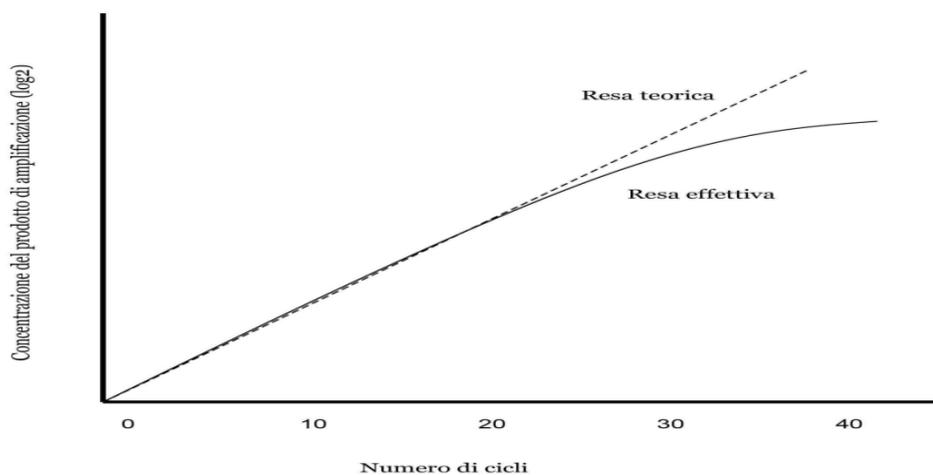
Il processo di amplificazione procede in questo modo di ciclo in ciclo (Figura 7c).



**Figura 7c:** Rappresentazione schematica del processo di amplificazione.

In teoria quindi ad ogni ciclo il numero di copie della sequenza bersaglio aumenta in maniera esponenziale, di fatto, il numero di copie si duplica ad ogni ciclo fino al raggiungimento di un plateau, in cui nelle fasi tardive dell'amplificazione il tasso di accumulo di prodotto diminuisce a causa di numerosi fattori tra cui l'esaurimento dei reagenti (dNTPs), diminuzione di efficienza dell'enzima e inibizione da parte del pirofosfato accumulato (inibizione da prodotto).

In generale il numero di cicli è compreso tra 30 e 45 (Figura 7d).



**Figura 7d:** Effetto plateau della reazione di PCR causato dalla degradazione dei reagenti e dall'accumulo dei prodotti.

**4.4.1 Denaturazione del DNA**

Normalmente il DNA si trova nella classica conformazione a due filamenti tenuti assieme dai legami a ponte di idrogeno formati tra le basi azotate complementari (A:T;G:C). Il DNA deve essere portato ad una condizione di singola elica in modo che successivamente si verifichi l'appaiamento (*annealing*) alle molecole di primer (anch'esse a singolo filamento). Per fare ciò la soluzione contenente il DNA viene portata ad una temperatura al di sopra della sua "temperatura di fusione" (*Temperatura di melting*), nella quale i legami ad idrogeno, non più stabili, permettono la separazione tra i due singoli filamenti del DNA.

La *Taq* DNA polimerasi ha solitamente una emivita di 30 min a 95 °C. Questo fatto limita il numero di cicli della PCR ed il tempo di denaturazione del primo step. Infatti considerando una incubazione di 1 min a 95 °C per ogni ciclo di PCR il numero di cicli effettuabili non può essere superiore a 30-35.

**4.4.2 Appaiamento dei primer (annealing).**

L'annealing consiste nella programmazione della temperatura e del tempo di appaiamento dei primer. La temperatura di annealing ( $T_a$ ) dei primer dipende dal loro contenuto in G+C e dalla loro lunghezza e quindi dalla temperatura di fusione tra primer e la sua elica complementare sul DNA stampo. Considerando primer di lunghezza media di 20 basi una formula empirica spesso utilizzata per il calcolo della  $T_m$  è la seguente:

$$T_m = [4(G + C) + 2(A + T)] \text{ °C.}$$

Nel caso che i due primer abbiano  $T_m$  diverse generalmente si considera quello con la  $T_m$  più bassa. Solitamente si utilizza come temperatura di annealing la  $T_m - 5 \text{ °C}$  anche se spesso l'utilizzo diretto della stessa  $T_m$  può portare ad avere ottime rese nella reazione di PCR.

Una  $T_a$  troppo bassa porta all'annealing dei primer a sequenze non esattamente complementari e quindi all'amplificazione di frammenti non specifici, mentre una  $T_a$  troppo alta può ridurre la resa in quanto solo una frazione delle molecole del primer riesce ad innescare la polimerizzazione a causa dell'elevata instabilità del loro appaiamento con il DNA stampo.

Il tempo di annealing infine non deve essere troppo lungo (in modo da sfavorire appaiamenti a stampi con bassa complementarietà), di solito si utilizzano tempi dell'ordine di 30 sec o meno.

**5.5.3 Estensione dei primer (elongation)**

L'elongation è la fase di allungamento dei primer. La temperatura utilizzata è solitamente compresa tra 68 e 72 °C, temperature corrispondenti all'optimum della *Taq* DNA polimerasi ma nonostante ciò una certa attività è posseduta anche a temperature inferiori; questo infatti permette la stabilizzazione del primer a temperature al di sopra di quella di annealing. La velocità di estensione del primer è direttamente correlata alla processività dell'enzima e cioè dalla capacità della *Taq* di rimanere associata allo stampo. Le comuni attività enzimatiche sono in grado di sintetizzare 1Kb di duplex in circa 50 sec

mentre enzimi specifici di ultima generazione consentono l'amplificazione di ampliconi da 1kb in tempi nettamente inferiori e corrispondenti a 20 sec.

#### 5.5.4 Primer

Si deve ovviamente tener conto di disegnare un primo primer (*primer forward*) sull'elica senso del DNA e l'altro (*primer reverse*) sull'elica opposta (antisenso) in modo da avere i due terminali 3' dei primer a delimitare il segmento da amplificare (Figura 8a).



**Figura 8a** : La complementarietà dei primer forward e reverse alle due eliche del DNA (senso e antisenso).

La lunghezza ottimale di un primer dipende sia dal suo contenuto in A+T, sufficientemente basso da poter avere  $T_m$  (e quindi  $T_a$ ) superiori a  $50^\circ\text{C}$ , sia dalla composizione nucleotidica della sua sequenza in modo che la probabilità di avere siti di annealing diversi da quello voluto sia estremamente bassa (alta specificità). Solitamente la lunghezza di un primer non supera le 20-25 basi. Il contenuto in G+C si aggira tra il 40 e il 60%. La presenza di regioni a bassa complessità, cioè di sequenze ripetute (sia di singoli nucleotidi sia di regioni di- o tri-nucleotidiche) all'interno di un primer deve essere evitata in quanto può portare ad uno slittamento dell'appaiamento o all'annealing su siti aspecifici (occorre ricordare che i genomi eucarioti sono ricchi di sequenze a bassa complessità) e quindi all'amplificazione di prodotti aspecifici.

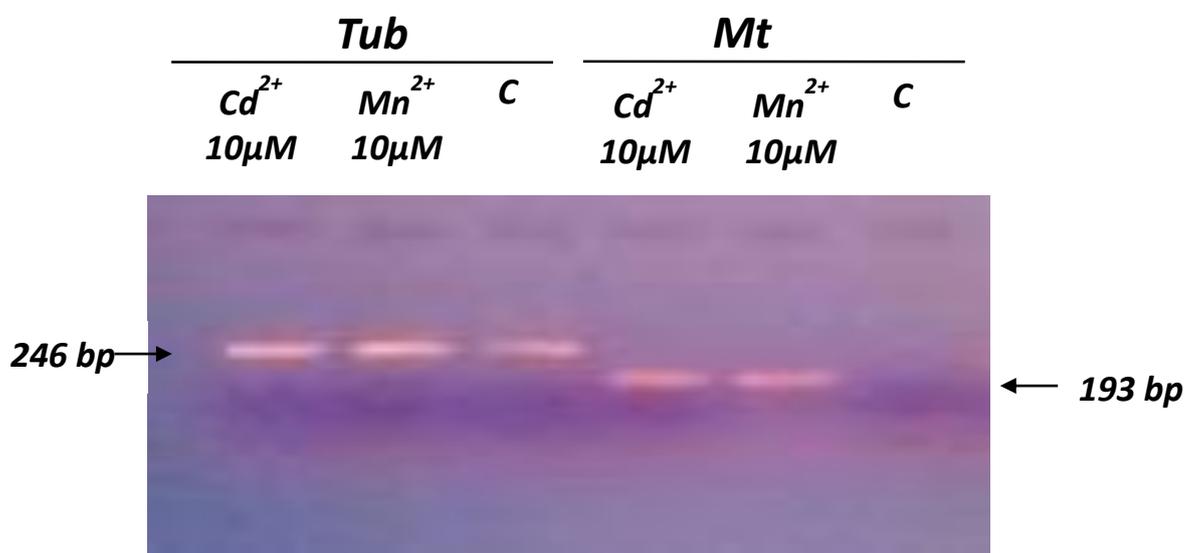
La presenza di strutture secondarie intramolecolari o intermolecolari può determinare una diminuzione della resa di amplificazione o addirittura un'assenza di amplificazione. Le strutture secondarie infatti competono per l'annealing del primer con lo stampo sulla sequenza di DNA bersaglio, diminuendo drasticamente la concentrazione effettiva di primer disponibile per la reazione di amplificazione.

I vantaggi di questa tecnica sono: la velocità e la facilità d'uso, infatti in poche ore si possono ottenere milioni di copie della sequenza di DNA target; elevata sensibilità e robustezza, infatti l'amplificazione è possibile anche utilizzando DNA di bassa qualità. Ma come tutte le altre tecniche possiede anche degli svantaggi, infatti è necessario conoscere la sequenza del DNA da amplificare per sintetizzare i primers; la dimensione dell'amplicone è mediamente 0.1-5kb (quantità limitata rispetto alle tecniche di clonaggio) e infine la Taq polimerasi manca di attività  $3' \rightarrow 5'$  esonucleasica, cioè non è in grado di

rimuovere eventuali nucleotidi scorretti appena incorporati, non permettendo così di diminuire il tasso di errore della DNA polimerasi (rif. 32).

Nonostante un genoma non sequenziato ed annotato di *octopus vulgaris*, sfruttando sequenze di specie affini e quelle già presenti in banca dati si è riusciti ad ottenere un panel genico da analizzare, contenenti sequenze specifiche presumibilmente correlabili, data la letteratura, ai meccanismi di risposta e detossificazione del sistema associato ad un controllo interno, nominalmente definito come costante in termini di espressione.

Sulla base delle poche sequenze nucleotidiche presenti sui database e relative a tale specie sono stati identificati una serie di geni che dalla letteratura risultano essere correlati alla risposta a metalli pesanti o impegnati in meccanismi di detossificazione. Più precisamente da un'analisi in silico utilizzando gli algoritmi BlastX e Tblastn EST (expressed sequences Tags) sono emerse sequenze codificanti per le putative metallothioneine (MT), heat shock protein 70 (Hsp70), glutatione perossidasi (GPX) e tubulina (Tub, utilizzata come controllo). I primer sono stati disegnati su tali sequenze ed utilizzati in esperimenti pilota per la verifica della loro funzionalità sui cDNA ottenuti mediante reazione di RT-PCR. In figura 8b è riportato un gel d'agarosio 2% TAE riportante il risultato di amplificazione per i geni Mt (193 bp) e Tub (246 bp) da larve controllo e trattate con  $Cd^{2+}$  10 $\mu$ M e  $Mn^{2+}$  10 $\mu$ M. È possibile evidenziare la presenza della banda specifica per la metallothioneina nei campioni trattati con entrambi i metalli e l'assenza della stessa nel campione controllo a fronte di una costante espressione di tubulina in tutti i campioni.



**Figura 8b:** gel d'agarosio 2% TAE riportante l'amplificazione di bande specifiche per Tub (246 bp) e Mt (193 bp) nei diversi campioni analizzati.

## 5 DISEGNO SPERIMENTALE

Le paralarve sono state divise in 7 gruppi da 50 esemplari (uno dei quali controllo) ed incubate in 1L di MFSW contenente rispettivamente CdCl<sub>2</sub> (Fluka) e MnCl<sub>2</sub> (Fluka) a concentrazioni nominale pari a 10µM, 100 µM ed 1mM per 24 a temperatura controllata. Le larve sono state successivamente recuperate mediante filtrazione e conservate in *RNAlater* (Ambion).

### **Estrazione dell'RNA**

Un numero di paralarve pari a 50 sono state sottoposte ad estrazione utilizzando l'RNasy mini kit (Qiagen); brevemente i campioni sono stati lisati in 600µl di buffer RLT, dopo aver aggiunto un ugual volume di etanolo al 70%, la sospensione è stata caricata sulla colonna e lasciata adsorbire. Sono state effettuate le tappe di lavaggio seguite da centrifugazioni a 13000 rpm per rimuovere le molecole specificamente legatesi ed il tutto è stato eluito in 100 µl di tris 10mM pH 7,5.

La concentrazione e relativa qualità è stata valutata mediante analisi in spettrofotometria; il recupero per ogni campione è compreso tra i 70 ed i 90 µg di RNA (massima capacità di legame delle colonne=100 µg). L'RNA estratto è stato sottoposto ad elettroforesi seguendo le istruzioni consigliate ed in particolare 1.2 gr di agarosio sono stati sciolti in presenza di FA gel buffer e formaldeide 0.24M.

I campioni sono stati miscelati con un egual volume di 5xRNA loading buffer e caricati su gel.

### **Reverse transcription-PCR**

500 ng di RNA totale è stato retrotrascritto utilizzando QuantiTect Rev. Transcription Kit Qiagen, in presenza di Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, eRT Primer Mix. La miscela è stata incubata per 30 min a 42° e successivamente diluizioni di questa, sono state utilizzate in reazioni di PCR.

5µl di una diluizione 1:10,

0.5µM c.f.,

200 µM c.f. dNTPmix,

1.5 µM c.f. MgCl<sub>2</sub>,

1.5 unità di Taq polimerasi e dell'opportuno buffer di reazione.

Le condizione utilizzate per il programma di amplificazione sono:

denaturazione iniziale 95°C 2min

denaturazione 95°C 30sec

annealing 58°C 20 sec

extension 72°C 15 sec

le tappe 2, 3,4 sono state ripetute per 30 cicli;

i prodotti di reazione sono stati quindi analizzati su gel d'agarosio 2% w/v.

**7 BIBLIOGRAFIA**

- Abou-Eisha A, Creus A, Marcos R (1999) Genotoxic evaluation of the antimicrobial, trimethoprim, in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 440:157–162.
- Abou-Eisha A (2006) Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antibacterial drug, trimethoprim. *Toxicol In Vitro* 20:601–607.
- Achefors H., 1999 - The positive effects of established crayfish introductions in Europe. *Crustacean Issues*, 11: 281-292.
- Ankley GT, Brooks BW, Huggett DB, Sumpter JP (2007) Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environ Sci Technol.* 41:8211–8217.
- Antoniou T, Games T, Mamdani MM, Juurlink DN, 2011. Trimethoprim/sulfamethoxazole-induced phenytoin toxicity in the elderly: a population-based study. *Br J Clin Pharmacol.* 71, 544-549.
- Ashton D, Hilton M, Thomas KV (2004) Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci Total Environ* 333:167–184.
- Baccanari DP (1995) Trimethoprim-sulfamethoxazole. In: Munson PL, Mueller RA, Breese GR (eds) *Principles of pharmacology: basic concepts and clinical applications*. Chapman & Hall, New York, pp 1301–1317.
- Binelli A, Cogni D, Parolini M, Riva C, Provini A (2009a) Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposure to triclosan and trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes. *Comp Biochem physiol C* 150:50–56.
- Binelli A, Parolini M, Cogni D, Pedriali A, Provini A (2009b) A multi-biomarker assessment of the impact of the antibacterial trimethoprim on the non-target organism zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comp Biochem physiol C* 150:329–336.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F., 2008. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquat. Toxicol.* 89, 257-266.
- Boletzky, S.v., 1987. Embryonic phase. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles. Comparative Reviews*, vol. II. Academic Press, London, pp. 23– 25.
- Bound JP, Voulvoulis N (2004) Pharmaceuticals in the aquatic environment- a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere* 56:1143–1155.
- Brooks BW, Huggett DB, Boxall ABA (2009) Pharmaceuticals and personal care products: research needs for the next decade. *Environ. Toxicol. Chem.* 28:2469–2472.
- Carrasco J.F., Rodriguez C., Rodriguez Z., 2005. Cultivo intensivo de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797), en tanques parabólicos de 30l utilizando como base de la alimentación zoeas vivas de

crustaceos. In: Libro de Actas. IX Congreso Nacional de Acuicultura, Octubre 2005, Sevilla, Spain, pp.191-194.

Chomarar M (2000) Resistance of bacteria in urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 16:483–487.

Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multibiomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp. Biochem. Physiol.*149C, 281-288.

Fernandes, D., Potrykus, J., Morsiani, C., Raldua, D., Lavado, R., Porte, C., 2002. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream rivers (NE Spain). *Environ. Res.* 90, 169-178.

Gagne F, Blaise C, Andre C (2006) Occurance of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicol Environ Saf* 64:329–336.

Galloway SM, Miller JE, Armstrong MJ, Bean CL, Skopek TR, Nichols WW (1998) DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens. *Mutat Res* 400:169–186.

Genther CS, Schoeny RS, Lopper JC, Smith CC (1977) Mutagenic studies of folic acid antagonists. *Antimicrob Agents Chemother* 12:84–92.

Gherardi F., Bertolino S., Bodon M., Casellato S., Cianfanelli S., Ferraguti M., Lori E., Mura G., Nocita A., Riccardi N., Rossetti G., Rota E., Scalera R., Zerunian S. & Tricarico E., 2008 - Animal xenodiversity in Italian inland waters: distribution, modes of arrival, and pathways. *Biol. Invas.*, 10: 435-454.

Gherardi F., Barbaresi S., Salvi G., 2000. Spatial and temporal patterns in the movement of *Procambarus clarkii*, an invasive crayfish. *Aquatic Sciences – Research Across Bondaries*, 62: 179–193.

Gherardi, F., et al. Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Mar. Freshwater Behav. Phys.*39(3),175–191.

Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz K-L (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* 225:109–118.

Holdich, D. M. 1999. The negative effects of established crayfish introductions. In: Gherardi, F. & D. M. Holdich. 1999. Crayfish in Europe as alien species. Balkema, Rotterdam: 31-48.

Huner J.V. & Barr J.E., 1984 - *Red Swamp Crayfish: Biology and Exploitation*. Louisiana Sea Grant College Program, Baton Rouge, Louisiana: 136 pp.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002) Pharmaceuticals, hormones, other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202–1211.

Mclean DA, Faed MJF (1990) Improved fragile site detection with trimethoprim. *Hum Genet* 85:241–243.

Rasool SA, Khan MA, Alvi AZ, Umer MN (1987) Genetic activity of trimethoprim in the Salmonell/microsomal screening system. *Mutat Res* 188:197–200.

Sánchez, F.J., Gil, M.D., Martínez, J.L., Aguilera, P.A. Frenich, G., et al. Assessment of metal contamination in Donana National Park (Spain) using crayfish (*Procambarus clarkii*). *Environ. Monit. Assess.* 93, 17-29.

Stevenson AC, Clarke G, Patel CR, Hugues TD (1973) Chromosomeal studies in vivo and in vitro of trimethoprim and sulfamethoxazole (co-trimoxazole). *Mutat Res* 17:255–260.

Lixin Yang\*, Jules R Kemadjou\*, Christian Zinsmeister\*, Matthias Bauer\*, Jessica Legradi\*, Ferenc Müller\*, Michael Pankratz\*, Jens Jäkel†‡ and Uwe Strähle\*, 2007, Transcriptional profiling reveals barcode-like toxicogenomic responses in the zebrafish embryo. Institute of Toxicology and Genetics.

<http://www.sartorius-stedim.com/index.php?id=4387> (6-01-2012).

Jeremy W. Dale, Malcolm von Schantz (2004). *Dai geni ai genomi*, I edizione. Edises.