

Metodi ecotossicogenomici nel monitoraggio degli ambienti acquatici: modulazione dell'attività trascrizionale in *Daphnia magna*

Antonio Suppa¹, Valerio Pellegrini¹, Serena Montalbano, Gessica Gorbi*, Annamaria Buschini

Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 11/A, 43124 Parma, Italia

1 equal contributors

* Referente per la corrispondenza: gessica.gorbi@unipr.it

Pervenuto il 24.2.2017; accettato il 28.4.2017

Riassunto

Nell'ambito di una ricerca finalizzata allo sviluppo e all'applicazione di metodi "effect-based" nel monitoraggio ambientale, è stato intrapreso uno studio basato su metodi tossicogenomici. Nello specifico, è stata messa a punto e successivamente applicata una procedura per la valutazione dell'alterazione dell'espressione genica in *Daphnia magna* esposta *in vivo* a campioni ambientali prelevati da sezioni del reticolo idrografico della Val Parma soggette a diverse pressioni antropiche. È stato analizzato il profilo trascrizionale di geni coinvolti nell'attività riproduttiva (vitellogenina 1, vtg1), nello sviluppo (cuticola 12, cut12, e il precursore della carbossipeptidasi A1, cpa1) e nell'allocatione delle risorse energetiche (emoglobina, dhb1). Per selezionare lo stadio di sviluppo degli organismi più appropriato e valutare la sensibilità del metodo, la prima fase dello studio è stata dedicata all'analisi dell'effetto di noti Interferenti Endocrini (20-idrossiecdisone e cadmio). Il protocollo standardizzato è stato quindi applicato al monitoraggio dei corsi d'acqua. Una sezione di monte è stata selezionata come possibile stazione di riferimento. Considerando i risultati nel loro insieme, appare evidente procedendo da monte verso valle (e nei canali di pianura) una generale alterazione dell'espressione genica negli organismi esposti. Inoltre, le evidenze ottenute dall'approccio tossicogenomico risultano in accordo con la classificazione delle sezioni basata sugli elementi biologici.

PAROLE CHIAVE: *Daphnia magna* / RT-qPCR / 20-HE / Cd / acque superficiali / genomica ambientale

Application of ecotoxicogenomics in freshwater ecosystem biomonitoring: transcriptional modulation in *Daphnia magna*

Within a research aimed at the development and application of "effect-based" methods in environmental monitoring, a study based on the toxicogenomic approach was undertaken. Specifically, a procedure for assessing the alteration of gene expression was developed and applied in *Daphnia magna in vivo* exposed to environmental samples taken from sections of the Val Parma hydrographic network subjected to different anthropogenic pressures. The transcriptional profile of genes involved in reproductive activity (vitellogenin1, vtg1), development (cuticle 12, cut12, and the carboxypeptidase A1 precursor, cpa1) and in energy resource allocation (hemoglobin, dhb1) was analyzed. To select the most appropriate development stage and to evaluate the sensitivity of the method, the first phase of the study was devoted to the analysis of the effects of known endocrine disruptors (20-hydroxyecdysone and cadmium) on gene transcriptional profile. The standardized protocol was then applied to the monitoring of watercourses. A mountain section of Parma river was selected as a possible reference station. Considering the results as a whole, a general alteration of gene expression is evident in organisms exposed to samples from small waterways in the plain and, in the main watercourse, along a downstream gradient. Additionally, evidences obtained from the toxicogenomic approach are in accordance with the classification of the sections based on biological elements.

KEY WORDS: *Daphnia magna* / RT-qPCR / 20-HE / Cd / freshwater ecosystems / environmental genomics

INTRODUZIONE

L'integrazione della tossicogenomica nella ricerca ecotossicologica è stata definita da Snape e collaboratori come "lo studio dell'espressione genica e proteica in organismi non bersaglio in risposta ad una esposizione ambientale" (Snape *et al.*, 2004). La variazione dell'espressione genica è considerata un utile biomarcatore in quanto consente di identificare l'esposizione a concentrazioni di contaminanti ambientali inferiori a quelle in grado di causare effetti rilevabili a livelli di organizzazione più elevati (Nuwaysir *et al.*, 1999).

L'acquisizione di informazioni sugli effetti a livello fisiologico, biochimico, genetico e molecolare in organismi utilizzati come bioindicatori è indispensabile per ottenere un quadro conoscitivo accurato sulle probabili cause e conseguenze della contaminazione ambientale (Hagger *et al.*, 2006). I biomarcatori forniscono dati indispensabili sull'esposizione a sostanze i cui effetti negativi possono non essere rilevabili mediante i test tossicologici che considerino solo endpoint di alto livello (sopravvivenza, riproduzione, accrescimento). Rientrano in questa categoria sostanze ad azione pseudo-ormonale (Interferenti Endocrini, IE) e le sostanze che hanno effetto genotossico (Pickering e Sumpter, 2003; Ohe *et al.*, 2004). L'immissione sempre più massiccia di questo tipo di inquinanti nell'ambiente ha portato le organizzazioni scientifiche internazionali a rivolgere particolare attenzione al rilevamento della loro diffusione e a richiedere nuovi metodi, più efficaci e sensibili, per la valutazione del rischio ad esse connesso. In questo contesto, un approccio tossicogenomico può risultare un utile strumento diagnostico. Il gruppo di sostanze che appartiene alla categoria degli IE è molto eterogeneo e comprende solventi industriali e loro derivati, pesticidi, composti usati in cosmetica, agenti farmaceutici, diossine e metalli pesanti (De Coster e van Larebeke, 2012) che possono presentare diversi meccanismi di azione e molteplici effetti negativi (Futran Fuhrman *et al.*, 2015). Per questo motivo nel 2000 la Commissione Europea ha stilato un elenco di 564 sostanze ad attività pseudo-ormonale, accertata o presunta, su animali e uomo (EC DG ENV, 2000). Nel contesto di un approccio di genomica ambientale, questo lavoro è volto ad esplorare la potenzialità di *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) quale bioindicatore della presenza di IE in campioni di acque superficiali. A tal fine sono stati individuati alcuni geni che possono essere considerati buoni marcatori della presenza di tali sostanze in campioni ambientali: vitellogenina 1 (vtg1, DY037239), cuticola 12 (cut12, DW985490), precursore della carbosipeptidasi A1 (cpa1, DW724601), emoglobina 1 (dhb1, DW724693). Nei BOX 1, 2, 3 e 4 sono riportate alcune informazioni sui geni selezionati. In letteratura sono riportati numerosi studi che dimostrano la correlazione tra l'esposizione a IE e alterazioni delle normali funzioni fisiologiche in *D.*

magna (Kim *et al.*, 2015). Gli studi su questo organismo hanno tuttavia preso in considerazione individui di età diverse, da pochi giorni a 21 gg di età, ed è noto che il profilo trascrizionale basale di vari geni può variare notevolmente con l'età dell'organismo (Kim *et al.*, 2011). Si è quindi reso necessario procedere alla selezione dell'età degli organismi e del metodo di estrazione di RNA più idoneo, cercando di temperare sensibilità, rapidità e applicabilità del saggio. La prima parte del lavoro ha avuto pertanto lo scopo di messa a punto e standardizzazione del metodo di saggio con l'organismo modello *D. magna* esposto *in vivo*. Il protocollo, messo a punto su sostanze chimiche che notoriamente inducono alterazioni nel sistema endocrino, è stato successivamente applicato alla valutazione degli effetti di campioni ambientali prelevati da corsi d'acqua superficiali soggetti a diverso impatto antropico. I risultati dell'approccio tossicogenomico sono stati confrontati con dati chimici (ottenuti da serie storiche) e indici di qualità ambientale.

MATERIALI E METODI

Allevamento di *Daphnia magna*, estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA e Real-Time PCR (RT-qPCR)

Femmine adulte della specie *Daphnia magna*, in fase di riproduzione partenogenetica, sono state allevate in acqua naturale secondo la procedura descritta da Pellegrini *et al.* (2014) e in accordo con il metodo APAT IRSA-CNR (2003).

Le prove di estrazione di RNA, sono state effettuate utilizzando un diverso numero di dafnidi di età pari a tre, cinque, sei e sette giorni. Per ottimizzare le condizioni a cui effettuare il saggio, gruppi di organismi (25 e 50) di eguale età sono stati sottoposti ad estrazione di RNA mediante il kit GeneJET RNA Purification Column (Thermo Fisher). Per l'estrazione, gli organismi sono stati disgregati mediante shock meccanico con amalgamatore (frequenza di oscillazione = 4200 strokes/min) in presenza di 300 µL di soluzione tampone di lisi (Lysis Buffer; Kit GeneJET RNA Purification), 6 µL di β-mercaptoetanolo e 70 µL di microsfere di vetro (Ø = 0,45 – 0,50 mm) in provette Eppendorf da 1,5 mL.

La determinazione della concentrazione dell'RNA nell'estratto è stata effettuata con spettrofotometro Thermo Scientific NanoDrop 2000. La sintesi del cDNA è stata effettuata mediante SensiFASTcDNA Synthesis kit (Bioline). Ogni reazione di RT-qPCR è stata eseguita in tre repliche utilizzando Thermo Scientific SYBR Green come rivelatore di fluorescenza. I primer per i geni selezionati, riportati da Soetaert *et al.* (2007), sono stati forniti dalla ditta Primm srl (Milano, Italia). I primer sono stati risospesi in tampone TE a pH > 7 e conservati a -20°C. I dati relativi all'attività trascrizionale dei geni studiati sono stati normalizzati considerando come

BOX 1**Vitellogenina 1 (vtg1-DY037239)**

La vitellogenina, necessaria per immagazzinare le riserve di amminoacidi, carboidrati, lipidi e fosfati per lo sviluppo degli embrioni, è il più abbondante polipeptide nelle uova di *D. magna* (Kato *et al.*, 2004). In generale, il gene vtg1 è up-regolato in risposta all'azione di sostanze ad attività ecdisteroidea (Tokishita *et al.*, 2006). La sua espressione cala drasticamente in *D. magna* esposta a composti ad azione antiestrogenica quali gli ormoni giovanili e pesticidi (quali methoprene, fenoxycarb, pyriproxyfen) frequentemente utilizzati in agricoltura (Kim *et al.*, 2011). La variazione della trascrizione di questo gene potrebbe essere correlata con una alterazione nel tasso di riproduzione e pertanto consentire di evidenziare un collegamento tra la risposta precoce a livello genomico (a breve termine) e l'effetto sulla attività riproduttiva (test a lungo termine) (Soetaert *et al.*, 2006).

BOX 2**cuticola 12 (cut12-DW985490)**

La cuticola è una proteina che si trova nell'esoscheletro degli artropodi ed ha la funzione di fornire resistenza all'esoscheletro, al fine di proteggere gli organi interni (Andersen *et al.*, 1995). L'alterazione dell'attività trascrizionale dei geni cuticolari è legata a variazioni del processo di muta (De Schampelaere *et al.*, 2008). In *D. magna*, l'attività trascrizionale dei geni per la cuticola è stata utilizzata per valutare la possibile presenza di ecdisteroidei ed ormoni giovanili, che rispettivamente inducono ed inibiscono il processo di muta (Charles *et al.*, 2010). Il gene cut12 nei daphnidi risulta responsivo a composti farmaceutici, pesticidi e metalli pesanti (Furuhagen *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2011; Poynton *et al.*, 2008).

BOX 3**Precursore della carbossipeptidasi A1 (cpa1-DW724601)**

La carbossipeptidasi (CPA1) è un enzima proteolitico che scinde gli amminoacidi presenti nella porzione C-terminale delle proteine. In *D. magna*, questo enzima potrebbe essere coinvolto nella strutturazione corretta dell'esoscheletro e necessario per il completamento del processo di formazione dell'exuvia (Soetaert *et al.*, 2007). L'alto numero di geni codificanti per CPA1 (30 loci) suggerisce un loro coinvolgimento nell'adattamento alle perturbazioni ambientali (Schwerin *et al.*, 2009). Il gene cpa1 è risultato modulato in risposta a vari pesticidi (il fungicida fenarimol, l'insetticida methomyl e l'erbicida propanil), e dalla esposizione al cadmio e al bisfenolo A (Soetaert *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2010; Taylor, 2010; Jeong *et al.*, 2013).

BOX 4**Emoglobina (dhh1-DW724693)**

Ad oggi, in *D. magna*, sono stati individuati 4 geni codificanti per l'emoglobina (Kimura *et al.*, 1999). Il livello di trascrizione di tre di tali geni è regolato da un percorso molecolare che può portare ad un aumento nella quantità di mRNA di 10 volte in caso di ipossia (Tokishita *et al.*, 1997). Tuttavia il gene da noi selezionato è scarsamente responsivo alla carenza di ossigeno (Zeis *et al.*, 2003) e risulta invece modulato da molteplici fattori di stress quali pesticidi analoghi degli ormoni giovanili (pyriproxyfen, fenoxycarb and methoprene), metalli pesanti (cadmio e nichel) ed erbicidi (glifosato e metidation) (Rider *et al.*, 2005; Soetaert *et al.*, 2007; Vandenbrouck *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2010).

housekeeping il gene proibitina 2 (phbr2, DW724510). Per ciascun gene, il dato relativo alla espressione è stato riportato usando il parametro Fold Change (FC) (Livak e Schmittgen, 2001) che indica la variazione dell'attività trascrizionale del gene indagato negli organismi trattati rispetto agli organismi controllo.

L'espressione dei singoli geni negli organismi esposti alle sostanze di riferimento ed ai campioni ambientali è stata considerata alterata quando il valore di FC è risultato > 2,0 (up-regolazione) rispetto agli organismi controllo o < 0,5 (down-regolazione). Valori di FC compresi fra 2 e 0,5 sono stati ritenuti variazioni casuali attribuibili ad acclimatazione degli organismi (Sumiya *et al.*, 2014).

Test con sostanze di riferimento

Per la messa a punto del protocollo di estrazione e la valutazione della sensibilità del metodo sono state utilizzate le seguenti sostanze:

- 20-idrossiecdisona (20-HE), noto IE, alla concentrazione nominale di 1 µM scelta in base a dati di letteratura (Sumiya *et al.*, 2014); in questo caso è

stato utilizzato il dimetilsolfossido (DMSO) come coadiuvante per la solubilizzazione ed è stato effettuato anche un secondo controllo contenente solo DMSO alla stessa concentrazione usata nel trattamento con 20-HE;

- cadmio (somministrato come CdCl₂) alla concentrazione nominale di 10 µg Cd/L, valore inferiore al limite di legge per gli scarichi in acque superficiali (0,02 mg Cd/L; D.Lgs 152/06).

Gruppi di 50 organismi di età omogenea (≤ 24 h) sono stati mantenuti per 4 giorni nelle stesse condizioni di allevamento sopra descritte e alimentati con *Pseudochironiella subcapitata* (3 x 10⁵ cell/mL/giorno) e *Saccharomyces cerevisiae* (3 x 10⁵ cell/mL/giorno). Dopo tale periodo, gli organismi sono stati trasferiti nelle soluzioni delle sostanze da saggiare (50 individui/200 mL) preparate con la stessa acqua naturale usata per l'allevamento, in assenza di alimento per evitare contaminazione con acidi nucleici dovuta alle fonti alimentari. Dopo 48 h di esposizione (24 h per Cd causa tossicità), le soluzioni sono state filtrate su un retino di nylon (a maglie di 50 µm) e gli organismi,

raccolti delicatamente con un ago, sono stati trasferiti in Eppendorf da 1,5 mL, congelati in azoto liquido (per migliorare la successiva frammentazione dei dafnidi) e conservati a -80 °C fino al momento della estrazione di RNA effettuata secondo la procedura sopra riportata.

Test su campioni ambientali

Il protocollo standardizzato è stato applicato al monitoraggio dei corsi d'acqua della Val Parma, selezionando sezioni del corso principale (Torrente Parma: stazioni 1, 2, 3) e di corpi idrici del reticolo idrografico minore (Canale Naviglio Navigabile, stazione 4, e Canale Galasso, stazione 5) soggette a diverso impatto antropico. Una sezione di monte (T. Parma, stazione 1, 785 m slm) è stata selezionata come possibile stazione di riferimento. Una breve descrizione delle singole sezioni è riportata in Pellegrini *et al.* (2017). In ogni stazione è stato prelevato un singolo campione puntuale raccolto con taniche in PET da 25 litri. Sui campioni sono stati misurati pH e conducibilità entro 2 ore dalla raccolta, e sono stati effettuati saggi di tossicità acuta con *D. magna* (48 ore di esposizione) per verificare l'assenza di tossicità acuta. I campioni sono stati quindi filtrati (0,45 µm), conservati a 4 °C e, al momento del loro utilizzo, riportati alla temperatura di 20 °C. Come controllo sono stati usati 50 organismi mantenuti nella stessa acqua naturale utilizzata per l'allevamento. L'esposizione degli organismi (48 h) e l'estrazione di RNA sono state quindi effettuate con la metodica precedentemente descritta.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Definizione del protocollo

La quantità di RNA estratto è risultata, come atteso, dipendente dall'età degli organismi (Fig. 1 A). Gli organismi di 7 giorni hanno permesso di ottenere quantità molto elevate di RNA, in parte attribuibile alla presenza di uova nella camera incubatrice: tale condizione si ritiene possa interferire con la valutazione della risposta degli organismi a livello trascrizionale (Biegala *et al.*, 1999; Gorokhova e Kyle, 2002). La nostra attenzione è stata pertanto rivolta agli organismi di 5 e 6 giorni di età. A questa età gli organismi si trovano in una fase preadulta e mostrano variazioni endogene delle concentrazioni ormonali (Martin-Creuzburg *et al.*, 2007) e potrebbero quindi essere più sensibili e responsivi all'azione pseudo-ormonale degli IE. Negli organismi di 5 e 6 giorni di età è stata valutata l'espressione di base dei geni *cut12* e *vtg1* (Fig. 1 B): il primo ha mostrato un livello di espressione simile, il secondo un'attività trascrizionale 46 volte superiore negli organismi di 6 giorni. Sulla base di questi risultati e considerata la maggiore quantità di RNA estratto, le successive fasi di definizione della procedura di saggio e valutazione

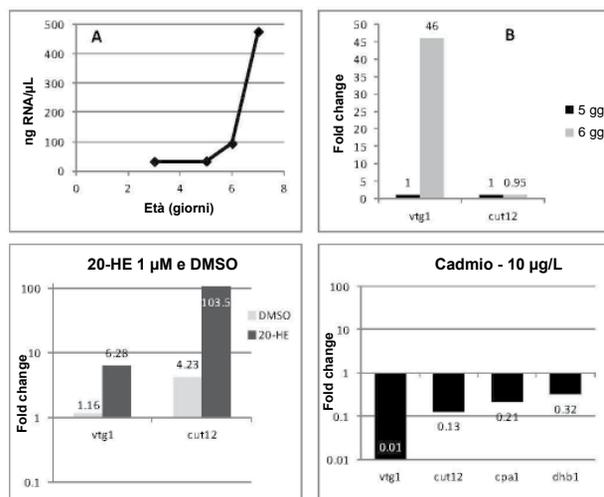


Fig. 1. Quantità di RNA estratto da *Daphnia magna* (50 organismi) a età diverse (A), espressione basale dei geni *vtg1* e *cut12* a 5 e 6 giorni di età (B) e profilo trascrizionale dei geni dopo esposizione alle sostanze di riferimento 20-idrossicidione (20HE) e cadmio (concentrazioni nominali).

della sua sensibilità sono state effettuate utilizzando organismi di 6 giorni di età (4 giorni di allevamento in condizioni standard + 2 giorni di esposizione in assenza di alimento).

Saggi con sostanze di riferimento

L'esposizione al 20-HE ha causato l'up-regolazione di *vtg1* e *cut12* (Fig. 1). In particolare *cut12* ha mostrato un aumento dell'attività trascrizionale a valori circa 100 volte superiori rispetto agli organismi controllo, in accordo con l'attività ormonale descritta per questa sostanza (Subramoniam, 2000). È infatti noto che il 20-HE interferisce con il processo di muta (Martin-Creuzburg *et al.*, 2007); l'alterazione dell'espressione del gene *cut12* sembra essere in accordo con l'effetto fenotipico di questa sostanza. È tuttavia da sottolineare che anche il DMSO ha causato un'alterazione dell'espressione genica, diversa su geni diversi: per il gene *vtg1* l'alterazione è trascurabile, mentre per il gene *cut12* è risultata relativamente elevata. Effetti del DMSO su *D. magna* sono stati riportati anche da Haap *et al.*, (2008). L'esposizione al Cd ha invece causato una down-regolazione di tutti i geni considerati, con un effetto più rilevante a carico del gene *vtg1*. I risultati ottenuti per i geni *vtg1* e *dhb1* sono in accordo con i dati riportati da Soetaert *et al.* (2006). La down-regolazione di omologhi dei geni *cut12* e *cpa1* è stata osservata da Connor *et al.* (2008) e Poynton *et al.* (2008) a concentrazioni di Cd nel range 6-37 µg/L. Come riportato nella sezione Materiali e Metodi, la concentrazione di Cd saggiata è inferiore al valore del limite imposto dalla legislazione Italiana (20 µg Cd/L) per gli scarichi in acque superficiali, con-

centrazione che è risultata anche genotossica in dafnidi esposti *in vivo* (Pellegrini *et al.*, 2014). Considerando che attualmente molti corsi d'acqua soffrono eventi di magra estremi e prolungati, concentrazioni prossime a 10 µg/L potrebbero risultare non sufficientemente cautelative e rappresentare un rischio da non sottovalutare.

Saggi su campioni ambientali

I risultati ottenuti dall'applicazione del saggio ai campioni ambientali sono riportati in figura 2.

Il gene *vtg1* ha mostrato una down-regolazione in tutte le stazioni campionate ed è l'unico gene, fra quelli analizzati, che abbia mostrato un'alterazione dell'attività trascrizionale anche nella stazione di monte (St. 1), considerata come possibile stazione di riferimento in base allo stato ecologico e chimico. Il gene *cut12* ha mostrato un aumento dell'attività trascrizionale in tutte le stazioni di pianura e nella stazione collinare (St. 2). Le alterazioni più marcate sono state osservate negli organismi esposti ai campioni prelevati dalle sezioni localizzate sui corsi del reticolo idrografico minore (St. 4 e 5). L'espressione del gene *cpa1* non è risultata alterata dall'esposizione ai campioni prelevati nelle sezioni del corso d'acqua principale ma ha presentato una forte down-regolazione nei campioni delle stazioni 4 e 5. Negli organismi esposti ai campioni prelevati in queste stazioni è stata osservata anche una marcata riduzione dell'attività trascrizionale del gene *dhb1*, che ha mostrato down-regolazione crescente anche lungo l'asta del Torrente Parma in direzione monte-valle.

Considerando i risultati nel loro insieme, appare evidente una generale alterazione dell'espressione genica negli organismi esposti ai campioni prelevati dai corsi

d'acqua minori e lungo l'asta del corso principale già dalla stazione pedemontana (St. 2). Questo risultato è in linea con il giudizio sullo stato ecologico, ma appare in contrasto con il giudizio sullo stato chimico. Tuttavia un confronto con dati relativi alla contaminazione ambientale riportati nel rapporto ARPA-ER Sezione di Parma (2014), permette di fare alcune considerazioni relative alle possibili cause della modulazione dei geni da noi considerati. In particolare, nelle stazioni 3, 4 e 5 è stata rilevata la presenza di numerosi xenobiotici utilizzati in campo agricolo come insetticidi, fungicidi ed erbicidi, anche se a livelli inferiori ai rispettivi limiti di legge. Per alcuni di questi sono noti gli effetti negativi in *D. magna* sia a livello trascrittomico che fenotipico ed è nota o sospettata l'attività pseudo-ormonale (<http://endocrinedisruption.org/endocrine-disruption/tedx-list-of-potential-endocrine-disruptors/overview>). Nelle stazioni 3, 4 e 5, nei campioni analizzati da ARPA, è stata rilevata la contemporanea presenza del dimetoato (un insetticida carbammato) ed epossiconazolo, procloraz e propiconazolo (tre fungicidi azolici), per i quali è stata dimostrata un'azione sinergica in *D. magna* (Nørgaard e Cedergreen, 2010). La forte modulazione dell'attività trascrizionale dei geni da noi selezionati potrebbe essere il risultato dell'effetto miscela causato dalla compresenza di queste sostanze nelle acque. È comunque da sottolineare che, mentre l'approccio chimico-specifico consente di evidenziare la presenza delle sole sostanze ricercate (Prasse *et al.*, 2015), i sistemi biologici rispondono al complesso di sostanze contaminanti e di pressioni presenti in un corpo idrico. Il risultato dell'approccio tossicogenomico è quindi in accordo con la classificazione delle sezioni

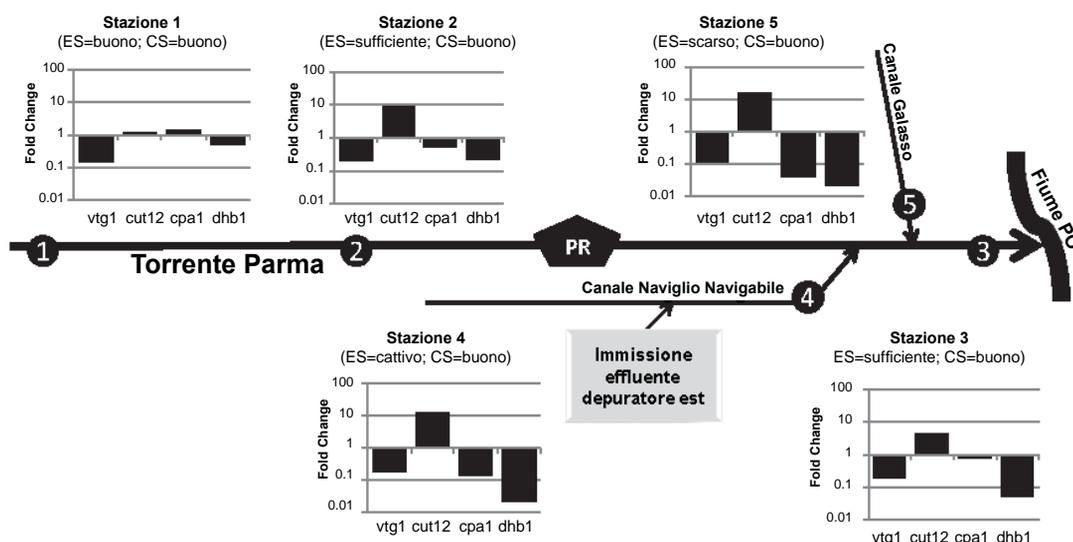


Fig. 2. Modulazione dell'espressione dei geni *vtg1*, *cut12*, *cpa1* e *dhb1* in *Daphnia magna* esposta *in vivo* (48 h) ai campioni prelevati nelle diverse sezioni (1, 2, 3, 4 e 5) di alcuni corsi d'acqua della Provincia di Parma. Per ciascuna sezione sono riportati stato ecologico (ES) e stato chimico (CS). PR = città di Parma.

studiate basata sugli elementi biologici ed evidenza ancora una volta la sottostima del rischio, posto dalla contaminazione dei corsi d'acqua, da parte del solo approccio chimico-specifico.

CONCLUSIONI

La metodologia di saggio è risultata relativamente agevole, rapida (durata complessiva del saggio 6 gg, tempo di esposizione 48 h) e sensibile e permette l'esposizione *in vivo* ai campioni ambientali tal quali, garantendo quindi una buona aderenza a quelle che possono essere le condizioni di esposizione degli organismi in ambiente. I risultati ottenuti sottolineano la necessità

di utilizzare un pool di geni che possano rispondere a diversi fattori di stress, anche in considerazione del fatto che negli ambienti acquatici sono presenti miscele di sostanze che possono avere meccanismi di azione diversi. La definizione delle condizioni di riferimento per il bacino idrografico, in base alle quali identificare le sezioni in cui intervengono significative alterazioni, rappresenta un aspetto critico per l'applicazione dell'approccio tossicogenomico: nel nostro studio le acque prelevate nella stazione identificata come possibile riferimento hanno comunque causato alterazione dell'attività trascrizionale, sia pure limitata ad uno solo dei geni considerati.

BIBLIOGRAFIA

- Andersen S.O., Højruo P., Roepstorff P., 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **25** (2): 153-176.
- APAT IRSA-CNR, 2003. *Metodi ecotossicologici*. Manuali e linee guida 29/2003-Serie 8000.
- ARPA-Emilia-Romagna-Sezione di Parma, 2014. *Report sullo stato delle acque superficiali in provincia di Parma*.
- Biegala I.C., Harris R.P., Bergeron J.P., 1999. ATCase activity, RNA:DNA ratio, gonad development stage, and egg production in the female copepod *Calanus helgolandicus*. *Marine Biology*, **135**: 1-10.
- Charles J.P., 2010. The regulation of expression of insect cuticle protein genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **40**: 205-213.
- Connor R., Hooper H.L., Sibly R.M., Lim F.L., Heckmann L.H., Moore D.J., Watanabe H., Soetaert A., Cook K., Maund S.J., Hutchinson T.H., Moggs J., De Coen W., Iguchi T., Callaghan A., 2008. Linking Molecular and Population Stress Responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. *Environmental Science & Technology*, **42**: 2181-2188.
- De Coster S., Van Larebeke N., 2012. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. *Journal of Environmental and Public Health*, 52 pp.
- De Schamphelaere K.A.C., Vandenbrouck T., Muysen B.T.A., Soetaert A., Blust R., De Coen W., Janssen C.R., 2008. Integration of molecular with higher-level effects of dietary zinc exposure in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, **3**: 307-14.
- EC DG ENV, 2000. *Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption - preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting*. Final Report (Incorporating corrigenda to final report dated 21 June 2000).
- Furuhagen S., Fuchs A., Lundström Belleza E., Breitholtz M., Gorokhova E., 2014. Are pharmaceuticals with evolutionary conserved molecular drug targets more potent to cause toxic effects in non-target organisms? *Plos ONE*, **9** (8): e105028. doi:10.1371/journal.pone.0105028.
- Futran Fuhrman V., Tal A., Arnon S., 2015. Why endocrine disrupting chemicals (EDCs) challenge traditional risk assessment and how to respond. *Journal of Hazardous Materials*, **286**: 589-611.
- Gorokhova E., Kyle M., 2002. Analysis of nucleic acids in *Daphnia*: development of methods and ontogenetic variations in RNA-DNA content. *Journal of Plankton Research*, **24** (5): 511-522.
- Haap T., Triebkorn R., Köhler H.R., 2008. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: Immobilisation and hsp70-induction. *Chemosphere*, **73**: 353-359.
- Hagger J.A., Jones M.B., Leonard D.R.P., Owen R., Gallo-way T.S., 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management*, **2** (4): 312-329.
- Jeong S.W., Lee S.M., Yum S.S., Iguchi T., Seo Y.R., 2013. Genomic expression responses toward bisphenol-A toxicity in *Daphnia magna* in terms of reproductive activity. *Molecular & Cellular Toxicology*, **9**: 149-158.
- Kato Y., Tokishita S.I., Ohta T., Yamagata H., 2004. A vitellogenin chain containing a superoxide dismutase-like domain is the major component of yolk proteins in cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Gene*, **334**: 157-165.
- Kim J., Kim Y., Lee S., Kwak K., Chung W.J., Choi K., 2011. Determination of mRNA expression of DMRT93B, vitellogenin, and cuticle 12 in *Daphnia magna* and their biomarker potential for endocrine disruption. *Ecotoxicology*, **20**: 1741-1748.
- Kim H.J., Koedrith P., Seo Y.R., 2015. Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, *Daphnia* model organism. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**: 12261-12287.
- Kimura S., Tokishita S., Ohta T., Kobayashi M., Yamagata H., 1999. Heterogeneity and differential expression under hypoxia of two-domain hemoglobin chains in the water flea, *Daphnia magna*. *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (15): 10649-10653.
- Le T.H., Lim E.S., Lee S.K., Choi Y.W., Kim Y.H., Min

- J., 2010. Effects of glyphosate and methidathion on the expression of the Dhb, Vtg, Arnt, CYP4 and CYP314 in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **79**: 67-71.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods*, **25**: 402-408.
- Martin-Creuzburg D., Westerlund S.A., Hoffmann K.H., 2007. Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle: Determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). *General and Comparative Endocrinology*, **151**: 66-71.
- Nørgaard K.B., Cedergreen N., 2010. Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. *Environmental Science and Pollution Research*, **17**: 957-967.
- Nuwaysir E.F., Bittner M., Trent J., Barrett J.C., Afshari C.A., 1999. Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics. *Molecular Carcinogenesis*, **24**: 153-159.
- Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, **567**: 109-149.
- Pellegrini V., Gorbi G., Buschini A., 2014. Comet Assay on *Daphnia magna* in eco-genotoxicity testing. *Aquatic Toxicology*, **155**: 261-268.
- Pellegrini V., Suppa A., Buschini A., Gorbi G., 2017. Dalla valutazione dello stato qualitativo alla identificazione delle cause di alterazione negli ambienti acquatici: un obiettivo raggiungibile? *Biologia Ambientale*, **31**: 227-231 (questo volume)
- Pereira J.L., Hill C.J., Sibly R.M., Bolshakov V.N., Goncalves F., Heckmann L.H., Callaghan A., 2010. Gene transcription in *Daphnia magna*: Effects of acute exposure to a carbamate insecticide and an acetanilide herbicide. *Aquatic Toxicology*, **97**: 268-276.
- Pickering A.D., Sumpter J.P., 2003. Comprehending endocrine disrupters in aquatic environments. *Environmental Science & Technology*, **37**: 331A-336A.
- Poynton H.C., Loguinov A.V., Varshavsky J.R., Chan S., Perkins E.J., Vulpe C.D., 2008. Gene expression profiling in *Daphnia magna* Part I: Concentration-dependent profiles provide support for the no observed transcriptional effect level. *Environmental Science & Technology*, **42**: 6250-6256.
- Prasse C., Stalter D., Schulte-Oehlmann U., Oehlmann J., Ternes T.A., 2015. Spoilt for choice: A critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment technologies. *Water Research*, **87**: 237-270.
- Rider C.V., Gorr T.A., Olmstead A.W., Wasilak B.A., Leblanc G.A., 2005. Stress signalling: coregulation of haemoglobin and male sex determination through a terpenoid signalling pathway in a crustacean. *The Journal of Experimental Biology*, **208**: 15-23.
- Schwerin S., Zeis B., Lamkemeyer T., Paul R.J., Koch M., Madlung J., Fladerer C., Pirow R., 2009. Acclimatory responses of the *Daphnia pulex* proteome to environmental changes. II. Chronic exposure to different temperatures (10 and 20 °C) mainly affects protein metabolism. *BMC Physiology*, **9**: 1-18.
- Snape J.R., Maund S.J., Pickford D.B., Hutchinson T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, **67**: 143-154.
- Soetaert A., Moens L.N., Van Der Ven K., Van Leemput K., Naudts B., Blust R., De Coen W. M., 2006. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **142**: 66-76.
- Soetaert A., Van Der Ven K., Moens L.N., Vandebrouck T., Van Remortel P., De Coen W. M., 2007. *Daphnia magna* and ecotoxicogenomics: Gene expression profiles of the anti-ecdysteroidal fungicide fenarimol using energy-, molting-, and life stage-related cDNA libraries. *Chemosphere*, **67**: 60-71.
- Subramoniam T., 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **125** (2): 135-156.
- Sumiya E., Ogino Y., Miyakawa H., Hiruta C., Toyota K., Miyagawa S., Iguchi T., 2014. Roles of ecdysteroids for progression of reproductive cycle in the fresh water crustacean *Daphnia magna*. *Frontiers in Zoology*, **11**: 60.
- Taylor N.S., 2010. *Novel approaches to toxicity testing in Daphnia magna*. PhD Thesis
- Tokishita S., Shiga Y., Kimura S., Ohta T., Kobayashi M., Hanazato T., Yamagata H., 1997. Cloning and analysis of a cDNA encoding a two-domain hemoglobin chain from the water flea *Daphnia magna*. *Gene*, **189**: 73-78.
- Tokishita S., Kato Y., Kobayashi T., Nakamura S., Ohta T., Yamagata H., 2006. Organization and repression by juvenile hormone of a vitellogenin gene cluster in the crustacean, *Daphnia magna*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **345**: 362-370.
- Vandebrouck T., Soetaert A., Van Der Ven K., Blust R., De Coen W., 2009. Nickel and binary metal mixture responses in *Daphnia magna*: Molecular fingerprints and (sub)organismal effects. *Aquatic Toxicology*, **92**: 18-29.
- Zeis B., Becher B., Goldmann T., Clark R., Vollmer E., Bölke B., Bredebusch I., Lamkemeyer T., Pinkhaus O., Pirow R., Paul R.J., 2003. Differential haemoglobin gene expression in the crustacean *Daphnia magna* exposed to different oxygen partial pressures. *The Journal of Biological Chemistry*, **384** (8): 1133-45.

