

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
PROGRAMMA SHORT TERM MOBILITY 2014

Visiting researcher

Dr.ssa Adele Fabbrocini
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto di Scienze Marine, UOS Lesina
Via Pola, 4 71010 Lesina (FG), ITALY

Hosting researcher

Prof.a Eduinetty Ceci P.M. de Sousa
Laboratório de Ecotoxicologia Marinha-LEcotox
Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo
Praça do Oceanográfico, 191 São Paulo, SP, BRAZIL

RELAZIONE DI ATTIVITÀ

02.10.2014 – 23.10.2014

Introduzione

Le alterazioni ambientali, dovute ad eventi naturali o alla pressione antropica, rendono necessario lo sviluppo di strumenti sempre più flessibili e sensibili per il controllo e la prevenzione dei rischi da esse derivanti; lo sviluppo di test sempre meglio rispondenti a queste esigenze è uno dei principali focus della ricerca in ecotossicologia.

I gameti delle specie acquatiche hanno elevata sensibilità e capacità di rispondere all'effetto combinato dei fattori (naturali ed antropici) che possono impattare un ecosistema acquatico.

La motilità spermatica è fondamentale per il successo della fecondazione; le alterazioni nella fisiologia dello spermatozoo si riflettono in alterazioni nei parametri di motilità, e di conseguenza in una riduzione della capacità fecondante del seme (Fauvel et al., 2010; Beirão et al., 2011); il pattern di motilità spermatica può essere quindi considerato un valido indicatore di potenziali situazioni di stress, e per questo motivo è sempre più spesso utilizzato per valutare i potenziali effetti sia di tossici che di matrici ambientali (Au et al., 2000; Dietrich et al., 2010; Li et al., 2010; Fabbrocini et al., 2010; 2012; 2013a).

Sebbene test ecotossicologici con gameti ed embrioni di organismi acquatici siano stati ormai standardizzati per numerose specie, in alcuni casi la disponibilità limitata alla stagione riproduttiva, la difficoltà di reperimento e di trasporto, la spesso elevata variabilità biologica ancora ne limitano l'utilizzo (Schipper et al., 2008; Fabbrocini and D'Adamo, 2011).

Le biotecnologie riproduttive possono essere di supporto alla ecotossicologia per il superamento di questi limiti. La crioconservazione dei gameti, ad esempio, li rende conservabili per lungo tempo, disponibili tutto l'anno e facilmente trasportabili; molte ricerche sono attualmente finalizzate alla creazione di banche criogeniche di gameti ed embrioni da utilizzare per le attività di laboratorio, in particolare per l'esecuzione di test ecotossicologici (Bellas and Paredes, 2011; Fabbrocini et al., 2012; 2013a; 2014).

I sistemi biologici da utilizzare nei biosaggi, inoltre, dovrebbero sempre provenire da ambienti il più possibile simili a quelli dell'area da monitorare, in modo da non dover alterare i parametri chimici e fisici delle matrici da testare, con il rischio di modificare la reattività delle sostanze tossiche eventualmente presenti (Chapman, 2002). Per questo motivo c'è la necessità di standardizzare biosaggi utilizzando gameti di specie provenienti da ambienti differenti, in vista del loro utilizzo in batterie di test sempre più appropriate per l'ambiente oggetto di studio.

L'attività di ricerca svolta in questi anni, nel quale anche un ricercatore ospite proveniente dal laboratorio LEcotox dell'IO-USP è stato coinvolto, è attualmente focalizzata sulla standardizzazione di test ecotossicologici usando seme, sia fresco che crioconservato, di specie comuni nell'area Mediterranea, quali il riccio di mare *Paracentrotus lividus* e l'orata *Sparus aurata* (Fabbrocini et al., 2010; 2012; 2013abc). Sarebbe quindi di notevole importanza, per un più ampio e mirato utilizzo di questi strumenti di valutazione, l'opportunità di testare l'applicazione di queste biotecnologie ad un sempre più elevato numero di specie, partendo da quelle già ampiamente utilizzate nei programmi di valutazione della qualità delle aree marino-costiere.

Obiettivi

Sulla base di queste considerazioni, e tenendo conto l'esperienza dei ricercatori del laboratorio ospitante LEcotox dell'Istituto Oceanográfico dell'USP nell'uso del riccio di mare *Lytechinus variegatus* in test

ecotossicologici, obiettivi dell'attività di ricerca svolta nell'ambito del presente Short Term Mobility Program sono stati:

- 1) Valutazione dei parametri di motilità spermatica nel riccio di mare autoctono *Lytechinus variegatus* in comparazione con quelli della specie Mediterranea *Paracentrotus lividus* ed identificazione delle migliori condizioni di attivazione della motilità per questa specie.
- 2) Valutazione degli effetti di crioprotettivi di uso comune per le specie acquatiche (DMSO, glicerolo) e di differenti gradienti di equilibratura al crioprotettivo e congelamento sulla motilità degli spermatozoi di *Lytechinus variegatus* per la standardizzazione di un protocollo di criopreservazione specie-specifico.
- 3) Standardizzazione di protocolli comuni per la valutazione della motilità spermatica e per la criopreservazione per entrambe le specie, per permettere ai due gruppi di ricerca, italiano e brasiliano, di continuare a condurre ricerche congiunte anche successivamente, intercalibrando di volta in volta i risultati ottenuti.

Materiali e Metodi

L'attività di ricerca oggetto del presente programma è stata svolta presso il Laboratório de Ecotoxicologia Marinha-LEcotox dell'Instituto Oceanográfico della Universidade de São Paulo, SP Brazil.



Fig. 1. Instituto Oceanográfico - USP

Esemplari

Esemplari adulti di *Lytechinus variegatus* sono stati prelevati da un sommozzatore, lungo la costa settentrionale dello Stato di São Paulo (Ubatuba, SP); gli animali sono stati stabulati in laboratorio in acquari a circuito chiuso (temperatura 24 °C; salinità 35‰; fotoperiodo naturale) ed alimentati con *Ulva* spp. per tutta la durata delle sperimentazioni.



Fig. 2. Esemplari di Lytechinus variegatus utilizzati nelle sperimentazioni

Prelievo dei gameti

L'emissione dei gameti è stata indotta mediante iniezione di KCl 0.5M nella cavità celomatica. Gli spermatozoi sono stati prelevati a secco e conservati, separatamente, non diluiti a freddo fino al momento dell'utilizzo.

Analisi della motilità

Aliquote di seme sono state diluite in acqua di mare filtrata (FSW, 35‰) e la percentuale di spermatozoi dotati di motilità progressiva e vigorosa (PVM) è stata calcolata mediante osservazione diretta al microscopio.

Sono stati inizialmente testati rapporti di diluizione crescenti (1:100; 1:200; 1:500; 1:1000) per valutare le migliori condizioni per l'attivazione della motilità e per la relativa valutazione mediante analisi visuale (Fabbrocini et al., 2012). E' stato inoltre valutata l'efficacia dell'aggiunta di BSA (Bovine Serum Albumin) al mezzo di diluizione per evitare l'adesione degli spermatozoi al vetrino. Le migliori condizioni di attivazione sono state poi utilizzate per la definizione del protocollo di valutazione della motilità spermatica, utilizzato nelle fasi successive della ricerca.

Per ogni campione la motilità è stata valutata all'attivazione (2min) e dopo 10min, 20min, 30min e 60min a 22 °C. Ogni valutazione della motilità è stata effettuata da tre osservatori indipendenti e le tre letture sono state poi mediate. Sono stati utilizzati 10 esemplari, analizzati separatamente.

Prove di inibizione e riattivazione della motilità

Aliquote di seme secco venivano diluite in rapporto 1:6 in NaCl 1%, incubate x 10min alle temperature di 9 °C e 22 °C; il seme veniva poi attivato mediante diluizione 1:200 in FSW35‰ + BSA 0.05% sempre alla temperatura di 22 °C e la motilità veniva valutata a 2min dall'attivazione, come precedentemente descritto. La prova è stata replicata 3 volte.

Prove di tossicità dei crioprotettivi

Aliquote di seme venivano diluite in rapporto 1:6 in NaCl 1% contenente dimetilsolfossido (DMSO) o glicerolo (gIOH) alle concentrazioni di 5 e 10%. Il controllo era costituito da NaCl 1%. Dopo 30min a 22 °C il seme veniva attivato mediante diluizione 1:200 in FSW35‰ + BSA 0.05% e la motilità veniva valutata a 2min dall'attivazione, come precedentemente descritto. La prova è stata replicata 4 volte.

Prove di congelamento

Aliquote di seme venivano diluite in rapporto 1:6 in NaCl 1% + trealosio 0.04M contenente quale crioprotettivi DMSO 5% e 7%, selezionati sulla base dei risultati ottenuti nelle prove di tossicità

precedentemente descritte. Il seme veniva aliquotato in nunc per criogenia da 2ml e fatto equilibrare per 10min alle temperature di 22 °C (E1) o 9 °C (E2), poi congelato alla velocità di -20 °C/min fino a -70 °C ed infine immerso in azoto liquido. Il sistema utilizzato per congelare era costituito da un contenitore in polistirolo contenente azoto liquido su cui veniva fatta galleggiare una zatterina nella quale erano allocati i nunc, come descritto in dettaglio in Fabbrocini et al (2014) e rappresentato in Fig. 3.

Il seme veniva scongelato per immersione (circa 30 sec) in bagnetto a 70 °C ed immediatamente diluito con FSW35‰ + BSA 0.05% in rapporto di 1:300; la motilità veniva valutata a 2min dall'attivazione, come precedentemente descritto.

La prova è stata replicata 3 volte, per un totale di 12 nunc per ognuna delle condizioni testate.



Fig. 3. Sistema per il congelamento sui fumi di azoto liquido

Analisi statistica

Le percentuali di spermatozoi PVM sono state trasformate in $\arcsen\sqrt{}$ prima dell'analisi statistica. Le variazioni nelle % di spermatozoi PVM in funzione del tempo dall'attivazione, così gli effetti della inibizione/riattivazione, della diluizione nei crioprotettivi e delle curve di congelamento sono stati valutati mediante ANOVA a una via e Duncan post-hoc test; il test post-hoc di Dunnett è stato utilizzato per identificare le eventuali differenze dal controllo. Nel caso delle % di spermatozoi PVM allo scongelamento gli assunti dell'ANOVA non erano rispettati; veniva quindi condotto il test non parametrico Kruskal-Wallis on ranks, mentre le differenze rispetto al seme fresco venivano analizzate mediante U-Mann-Whitney test. Il livello di significatività è stato fissato a $P < 0.05$.

Risultati

Analisi della motilità

Sulla base delle osservazioni preliminari il protocollo per l'attivazione della motilità degli spermatozoi di *Lytechinus variegatus* è stato così definito:

Fattore di diluizione 1:1000; mezzo diluente: FSW35‰ + BSA 0.05%; temperatura: 22 °C.

In Fig. 4 è riportato l'andamento della motilità al momento dell'attivazione e nei 60min successivi. La % di spermatozoi PVM rimane costante nei primi 10min; a 20min dall'attivazione si ha il primo significativo decremento della motilità, che poi rimane costante intorno al 50% fino a 60min, senza ulteriori significativi decrementi.

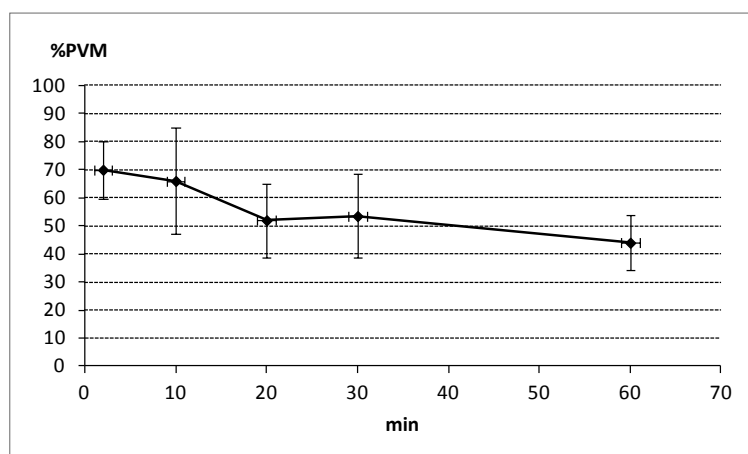


Fig. 4. Percentuale di spermatozoi dotati di motilità progressiva vigorosa e lineare (PVM) dopo attivazione in FSW ($M \pm SD$)

Inibizione e riattivazione della motilità

In figura 5 sono riportate le percentuali di spermatozoi PVM dopo inibizione in NaCl 1% alle due temperature testate, ed alla successiva riattivazione. Entrambe le condizioni di temperatura/pressione osmotica sono in grado di inibire la motilità spermatica in *L. variegatus*. All'attivazione il test di Dunnett mostra come la motilità risulta essere per entrambe le condizioni leggermente, sebbene significativamente, inferiore rispetto al controllo; non si riscontrano invece differenze tra le due condizioni di inibizione, come evidenziato dal test di Duncan.

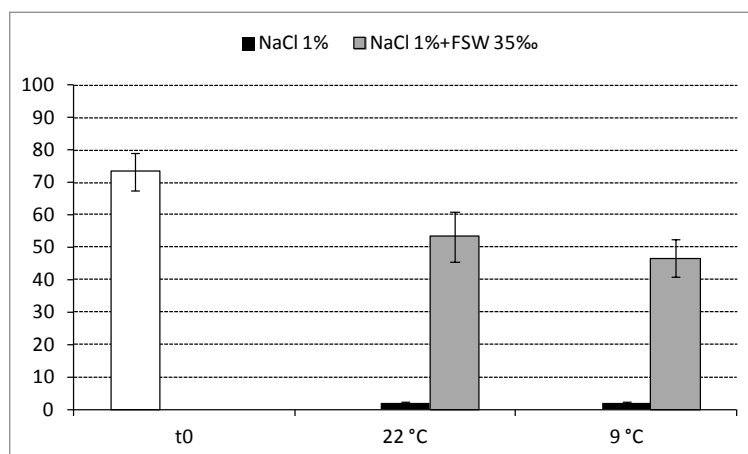


Fig. 5. Percentuale di spermatozoi dotati di motilità progressiva vigorosa e lineare (PVM) dopo inattivazione in NaCl 1% alle 2 temperature e riattivazione in FSW a 22 °C ($M \pm SD$)

Tossicità dei crioprotettivi

In Figura 6 sono riportate le percentuali di spermatozoi PVM dopo 30min di esposizione ai crioprotettivi selezionati. Il test di Dunnett evidenzia come solo per il DMSO 5% non ci sono significative differenze rispetto al controllo; nel caso del glicerolo 10%, la motilità all'attivazione era sempre inferiore al 10%.

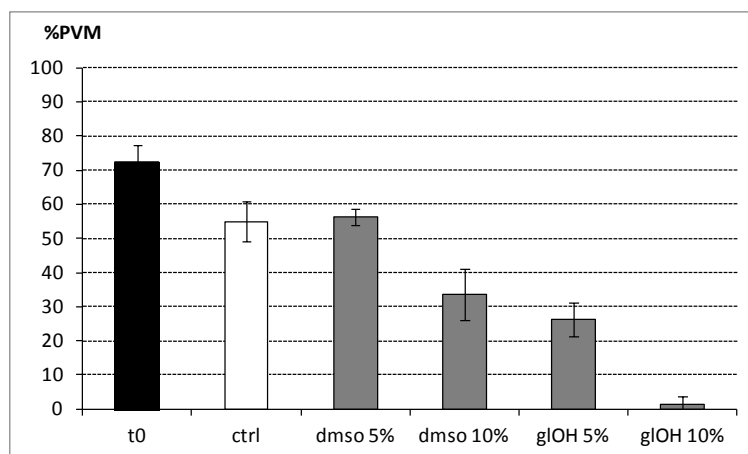


Fig. 6. Percentuale di spermatozoi dotati di motilità progressiva vigorosa e lineare (PVM) all'attivazione (2min) in FSW dopo incubazione nei crioprotettivi testati ($M \pm SD$)

Prove di congelamento

In Figura 7 sono riportate le percentuali di spermatozoi PVM allo scongelamento. Il test di U-Mann-Whitney evidenzia in tutti i casi un significativo decremento della motilità rispetto al seme fresco. In particolare, la fase di adattamento/equilibrazione al crioprotettivo a 22 °C è risultata essere particolarmente dannosa per gli spermatozoi, che hanno recuperato allo scongelamento una % di spermatozoi PVM sempre inferiore al 20%, e significativamente minore di quella riscontrata nei campioni equilibrati a 9 °C. Inoltre, nei campioni equilibrati a freddo, la motilità è risultata essere sempre leggermente superiore (intorno al 50%) in presenza di DMSO 7% rispetto al DMSO 5%, anche se senza significative differenze.

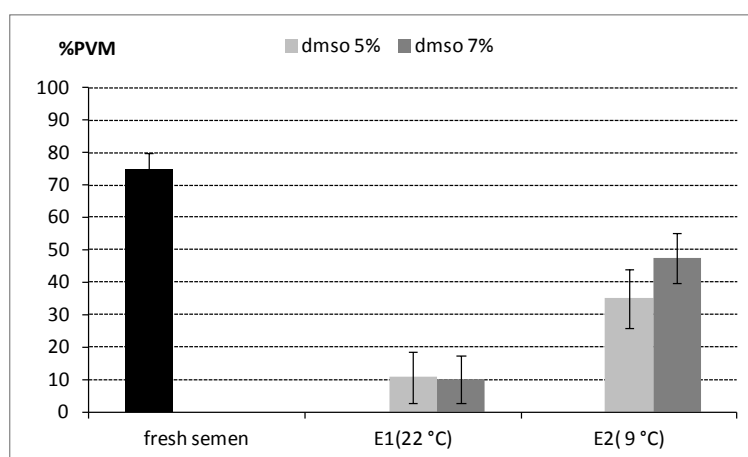


Fig. 7. Percentuale di spermatozoi dotati di motilità progressiva vigorosa e lineare (PVM) dopo attivazione (2min) in FSW allo scongelamento ($M \pm SD$)

Discussione

L'attività di ricerca svolta nell'ambito del presente programma ha permesso di fare una prima valutazione relativa alla possibilità di applicare il MOT-test (Fabbrocini et al., 2010) ed il CRYO-Ecotest (Fabbrocini et al., 2012) anche agli spermatozoi del riccio di mare *Lytechinus variegatus*, già utilizzato quale specie test con il saggio di embriotossicità nei programmi di monitoraggio ambientale delle aree costiere del Brasile (Ceci et al., 2012; Safadi et al., 2002).

La motilità all'attivazione, valutata secondo la metodologia dell'analisi visuale, precedentemente messa a punto per il seme di orata *S. aurata* (Fabbrocini et al., 2012) si mantiene costante per i primi 20min dall'attivazione, per poi decadere leggermente; sebbene circa il 50% degli spermatozoi rimane motile anche dopo 60min dall'attivazione. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Levitan (2000), che riscontra per il *L. variegatus* un drastico calo di motilità e capacità fecondante solo oltre 60min dall'attivazione.

Contrariamente al seme di *P. lividus*, la cui motilità non subisce alcuna significativa variazione anche oltre i 60min dall'attivazione (Fabbrocini et al., 2011), nel caso del *L. variegatus* il primo significativo decremento della motilità si è registrato a 20min dall'attivazione. Per questo motivo, in vista del successivo utilizzo del seme nel MOT-test, che prevede un tempo di incubazione nelle matrici da testare pari a 60min, è stato necessario identificare un protocollo per l'inibizione temporanea della motilità spermatica. E' stato quindi valutato l'effetto combinato di temperatura/pressione osmotica, secondo il protocollo già messo a punto per l'orata (Fabbrocini et al., 2012). Contrariamente a quanto osservato per l'orata e per il *P. lividus*, per il *L. variegatus* la sola pressione osmotica è sufficiente ad inibire la motilità; non si è ottenuto però in nessuna delle due condizioni il totale ripristino della motilità, che è risultata in entrambi i casi leggermente, ma significativamente, inferiore rispetto al controllo (Fabbrocini et al., 2012 e 2014).

Come già riportato sia per il *P. lividus* che per altre specie di riccio di mare (Adams et al., 2004; Asahina e Takahashi, 1978; Fabbrocini et al., 2014) il DMSO è risultato essere il crioprotettivo meno tossico anche per il *L. variegatus*, ed è stato per questo utilizzato nelle successive prove di congelamento.

Gli spermatozoi di *L. variegatus* hanno mostrato una buona criopreservabilità. Così come per il *P. lividus*, anche per il *L. variegatus* una concentrazione di DMSO leggermente superiore al 5% (l'unica nelle prove di tossicità a non provocare nessun significativo effetto sulla motilità spermatica), ha fatto ottenere migliori risultati allo scongelamento, mentre l'equilibratura/adattamento a freddo (9°C) è risultata essere meno dannosa rispetto a quella a temperatura ambiente (22 °C). Utilizzando lo stesso extender (NaCl 1%, trealosio 0.04M, DMSO 7%), le stesse condizioni di equilibratura/adattamento al crioprotettivo e la stessa curva di congelamento (-20 °C/min) che già aveva dato buoni risultati per il *P. lividus* (Fabbrocini et al., 2014), si sono ottenute anche in questo caso % di spermatozoi PVM allo scongelamento sempre intorno al 50%.

Considerazioni conclusive

I risultati ottenuti durante l'attuazione del presente programma di ricerca, sebbene preliminari data la breve durata del periodo di visita, presentano aspetti particolarmente incoraggianti.

Il seme di *L. variegatus* ha mostrato un pattern di motilità tale da rendere di facile valutazione parametri quali la motilità all'attivazione, la durata della massima motilità e la durata totale della motilità, che possono essere utilizzati con successo quali end-points in un saggio ecotossicologico, come già dimostrato per l'orata *S. aurata*.

La buona criopreservabilità del seme di *L. variegatus* apre buone prospettive per la creazione di una criobanca anche per questa specie, in vista dell'utilizzo quale specie test sia in ricerche di laboratorio che soprattutto per test ecotossicologici.

L'attività di ricerca congiunta con i ricercatori ospitanti del Laboratório de Ecotoxicologia Marinha-LEcotox dell'IO-USP ha permesso l'instaurarsi di una sinergia che ha garantito l'interscambio sia delle competenze specifiche che di idee innovative, fondamentali per lo sviluppo futuro della comune tematica di ricerca.

Lo studio delle relazioni tra fisiologia spermatica e parametri ambientali sono infatti un tema di grande attualità dati le importanti implicazioni in campo ambientale che ne derivano (impatto antropico, cambiamenti climatici); d'altra parte, biotecnologie innovative come la criopreservazione possono essere di notevole supporto alla ricerca in questo settore. L'interazione tra più gruppi di ricerca, che presentano sia competenze simili che complementari può essere di notevole impulso per uno sviluppo sempre più produttivo di questa area tematica.

Visti i positivi risultati finora raggiunti nell'ambito della collaborazione tra i due gruppi di ricerca, è auspicabile la possibilità di continuare ed eventualmente implementare gli studi sulle tematiche comuni, sviluppando specifici progetti congiunti di ricerca.

Cited literature

- Au, D.W.T., Chiang, M.W.L., Wu, R.S.S., 2000. Effects of cadmium and phenol on motility and ultrastructure of sea urchin and mussel spermatozoa. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 38, 455-463.
- Beirão, J., Cabrita, E., Pérez-Cerezales, S., Martínez-Pánaramo, S., Herráez, M.P., 2011. Effects of cryopreservation on fish sperm subpopulations. *Cryobiology* 62, 22-31.
- Bellas, J., Paredes, E., 2011. Advances in the cryopreservation of sea urchin embryos: potential application in marine quality assessment. *Cryobiology* 62, 174-180.
- Ceci, P.M.D.S.E., Gasparro, M.R., Argentino-Santos, R. C., Zaroni, L. P., Bergman, F., Tullus U., Oliveira, L. F. J., Cesar, A., Pereira, C.D.S. 2008. Ecotoxicological studies as a line of evidence in the integrated ecological coastal zone management (Ecomanage) of Santos Estuarine System-Brazil. In: SETAC Europe 18th Annual Meeting, 2008, Warsaw - Polônia. Abstract Book - World under stress: scientific and applied issues in environmental and toxicology and chemistry, 2008. p. 01-232.
- Chapman, P.M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting e “eco” into ecotoxicology. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 7-15
- Dietrich, G.J., Dietrich, M., Kowalski, R.K., Dobosz, S., Karol, A., Demianowicz, W., Glogowski, J., 2010. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. *Aquatic Toxicol.* 97, 277-284.
- Fabbrocini, A., Di Stasio, M., D’Adamo, R., 2010. Computerized sperm motility analysis in toxicity bioassays: a new approach to pore water quality assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1588-1595.
- Fabbrocini, A., D’Adamo, R., 2011. Gamete and embryos of sea urchins (*Paracentrotus lividus* Lmk 1816) reared in confined conditions: their use in toxicity bioassays. *Chem. Ecol.* 27(2), 105-115.
- Fabbrocini, A., D’Adamo, R., Del Prete, F., Langellotti, A.L., Rinna, F., Silvestri, F., Sorrenti, G., Vitiello V., Sansone, G., 2012. Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: sensitivity and reliability of cryopreserved *Sparus aurata* spermatozoa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84, 293-298.
- Fabbrocini, A., D’Adamo, R., Del Prete, F., Langellotti, A.L., Barone, M.C.A., Rinna, F., Sessa, R., Silvestri, F., Villani, G., Vitiello, V., Sansone, G., 2013a. Motility of cryopreserved spermatozoa for the ecotoxicological evaluation of aquatic environments. *Chem. Ecol.* 29(7), 660-667.
- Fabbrocini A., D’Adamo R., Pelosi S., Oliveira L.F.J. Del Prete F. Langellotti A.L., Rinna F., Silvestri F., Vitiello V. , Sansone G. 2013b. Towards the standardization of an innovative tool for the marine quality evaluation: integrate assessment of motility in seabream cryopreserved semen. 48th European Marine Biology Symposium. Galway (Ireland) 18-23 Agosto 2013.
- Fabbrocini A., D’Adamo R., Pelosi S., Oliveira L.F.J., Del Prete F., Silvestri F., Vitiello, V., Sansone G. 2013c. Sperm motility evaluation on long-term storage (5 years) of sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved semen. 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. Albufeira, Portugal 17-20 Settembre 2013.
- Fabbrocini, A., D’Adamo, R., Pelosi, S., Oliveira, L.F.J., Silvestri, F., Sansone, G. 2014. Gamete cryobanks for laboratory research: developing a rapid and easy-to-perform protocol for the cryopreservation of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk, 1816) spermatozoa. *Cryobiology* 69: 149-156.
- Fauvel, C., Suquet, M., Cosson, J., 2010. Evaluation of fish sperm quality. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 636-643.
- Levitan, D.R. 2000. Sperm velocity and longevity trade off each other and influence fertilization in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 531-34.
- Li, Z.H., Li, P., Dzyuba, B., Randak, T., 2010. Influence of environmental related concentrations of heavy metals on motility parameters and antioxidant responses in sturgeon sperm. *Chem.-Biol. Interact.* 188, 473-477.
- Safadi, R. S., Prósperi, Weber, L. I., Domingues, D.F., Fontes, A.F.A., Costa, F.A., Oliveira, L.F.J. 2002. Testes de Toxicidade com *Lytechinus variegatus* e *Mysidopsis juniae* em água marinha natural e artificial. In: VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia e V Reunião do SETAC LatinAmericana, 2002, Espirito Santo. Livro de Resumos do VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. Espirito Santo: Setac Latino-Americana.
- Schipper, C.A., Dubbeldam, M., Feist, S.W., Rietjens, I.M.C.M., Tinka Murk, A., 2008. Cultivation of the heart urchin *Echinocardium cordatum* and validation of its use in marine toxicity testing for environmental risk assessment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 364, 11-18.