

## Risposta da stress in embrioni di *Paracentrotus lividus* esposti a cadmio.

Agnello Maria, Maenza Luigia, Filosto Simone & Roccheri Maria C..

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo "A. Monroy", Università degli Studi di Palermo.

Il cadmio è un metallo pesante estremamente tossico per gli organismi viventi anche a basse concentrazioni. L'elevata pericolosità del cadmio dipende dalla sua capacità di penetrare facilmente nelle cellule e dal suo lento smaltimento da parte dell'organismo; ciò ne determina l'accumulo nei tessuti (Jarup et al., 1998). Danni ossidativi (Stohs et al., 2001; Shimizu et al., 1997) ed effetti genotossici (Hossain & Huq, 2002; Schroder et al., 1999) sono stati riscontrati in organismi filogeneticamente differenti esposti a cadmio. I nostri studi, condotti utilizzando come modello gli embrioni di riccio di mare, hanno dimostrato che concentrazioni citotossiche di cadmio ( $10^{-3}$  M) esercitano marcati effetti sulla sintesi proteica generale che risulta inibita; parallelamente si verifica l'incremento della sintesi di una proteina di 25-kDa e di alcune specifiche proteine con funzione protettiva: le heat shock proteins di 56-, 70-, 72- e 90-kDa (Roccheri et al., 2004). Prolungati trattamenti (21 e 24 ore) impediscono agli embrioni di proseguire nello sviluppo con una corretta morfologia non consentendone il recupero dopo rimozione del cadmio dalla coltura. Questi dati, ottenuti per somministrazione del cadmio a differenti stadi di sviluppo (dopo la fecondazione, allo stadio di blastula alla schiusa e allo stadio di gastrula), hanno mostrato che la risposta a questo stress è dose-tempo dipendente. La possibilità che il trattamento con cadmio determini morte cellulare per apoptosi è stata saggiata mediante TUNEL fluorescente. Gli embrioni trattati (dopo la fecondazione) per tempi superiori a 24 ore, hanno mostrato un'elevata entità della frammentazione del DNA, evento peculiare dell'apoptosi (figura). Esperimenti di immunostochimica (in embrioni interi) hanno, inoltre, dimostrato il coinvolgimento della caspasi-3, una proteasi effettrice che porta irreversibilmente all'esecuzione del programma di morte. Per comprendere se esiste una relazione tra la durata del periodo di trattamento con cadmio e l'innescarsi di processi apoptotici, è stata saggiata l'espressione della caspasi-3 in embrioni trattati per 9, 15, 21 e 24 ore, rispettivamente. I risultati ottenuti hanno mostrato che il prolungamento del periodo di esposizione al cadmio determina un progressivo incremento dei fenomeni apoptotici. Questo dato è stato confermato dall'osservazione che l'espressione della pro-caspasi-3 (zimogeno inattivo) va diminuendo progressivamente all'aumentare del tempo di trattamento. Parallelamente, l'espressione di  $\alpha$ -Fodrina (proteina di ancoraggio del citoscheletro alla membrana cellulare) –cleaved, substrato della caspasi-3, è risultata crescente per i trattamenti più lunghi. L'insieme dei risultati ottenuti suggerisce che lo stress da cadmio, se prolungato, determina suicidio cellulare e non consente il recupero dello sviluppo embrionale, come provato dagli esperimenti di "recovery".

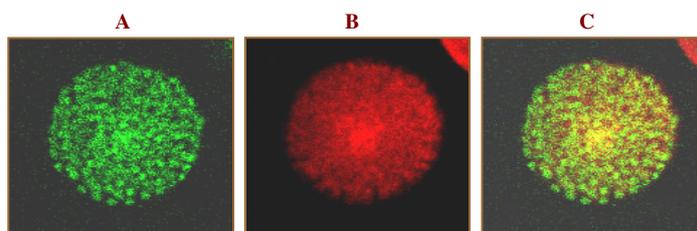
Hossain Z, Huq F. 2002. Studies on the interaction between  $Cd^{2+}$  ions and DNA. J Inorg Biochem. Jun 7; 90(3-4): 85-96.

Jarup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. 1998. Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. Scand J Work Environ Health. 1998;24 Suppl 1:1-51. Review. Roccheri M.C., Agnello M., Bonaventura R., Matranga V. 2004. Cadmium induces the expression of specific stress proteins in sea urchin embryos. Biochem Biophys Res Commun. 321, 80-87.

Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. 2001. Oxidative Mechanism in the Toxicity of Chromium and Cadmium Ions. J Environ Pathol Toxicol and Oncol. 20: 77-88.

Shimizu M, Hochadel JF, Waalkes MP. 1997. Effects of glutathione depletion on cadmium-induced metallothionein synthesis, cytotoxicity, and proto-oncogene expression in cultured rat myoblasts. J Toxicol Environ Health 51, 609-21.

Schroder HC, Hassanein HMA, Lauenroth S, Koziol C, Mohamed T AA, Lacorn M, Steinhart H, Batel R, Muller WEG. 1999. Induction of DNA Strand Breaks and Expression of HSP70 and GRP78 Homolog by Cadmium in the Marine Sponge *Suberites Domuncula*. Arch Environ Contam Toxicol 36: 47-55.



Saggio TUNEL fluorescente.

A) Embrioni trattati con  $CdCl_2$   $10^{-3}$  M (dopo la fecondazione) per tempi superiori a 24 ore: elevata entità della frammentazione del DNA (verde). B) Contro-colorazione dei nuclei con propidio-ioduro (rosso). C) Sovrapposizione delle immagini A e B.