

# RIGENERAZIONE E INTERFERENTI ENDOCRINI NEGLI ECHINODERMI

M. DANIELA CANDIA CARNEVALI (\*)

SUNTO. – I fenomeni rigenerativi attuati dagli animali in seguito a mutilazioni auto-indotte o traumatiche sono caratterizzati da complessi processi di sviluppo ben distinti da quelli embrionali e finemente regolati da meccanismi endocrini e neuroumorali. Gli Echinodermi rappresentano un *phylum* di invertebrati marini in cui il potenziale rigenerativo si esprime a tutti gli stadi del ciclo vitale consentendo di rigenerare tessuti, organi e perfino interi individui a partire da un frammento del corpo. Questa capacità di andare incontro con facilità a complessi fenomeni rigenerativi offre l'opportunità di studiare in modo controllato processi fisiologici di sviluppo in animali adulti e rende gli Echinodermi modelli ideali per lo studio degli effetti della contaminazione ambientale, con particolare riferimento a quelli causati dagli *interferenti endocrini* (*endocrine disrupters* – ED). Recenti ricerche nell'ambito di programmi europei e nazionali sono state indirizzate ad esplorare gli effetti dell'esposizione a differenti classi di composti ED (policlorodifenili, composti organostannici, pesticidi e altri) sullo sviluppo rigenerativo degli Echinodermi: la specie-modello utilizzata è stata il crinoide *Antedon mediterranea*. I risultati di questi studi hanno evidenziato come una prolungata esposizione a composti ED impatti notevolmente sui meccanismi rigenerativi inducendo 1) apprezzabili anomalie in termini di tempi di rigenerazione, di morfogenesi, istogenesi e differenziamento; 2) notevoli alterazioni dei livelli di ormoni steroidi nell'animale, mostrando una stretta correlazione concentrazione/effetti per tutte le sostanze testate.

ABSTRACT – Regeneration phenomena performed by animals following self-induced or traumatic mutilations are characterized by complex developmental processes distinct from the embryonic ones and finely regulated by endocrine and neuro-humoral mechanisms. Echinoderms are a *phylum* of marine invertebrates where the regenerative potential is expressed at all the the life cycle stages allowing regeneration of tissues and organs and even of whole individuals from body fragments. The capabilities to easily undergo complex regenerative phenomena provide occasion for a controlled study of physiological developmental processes in adult animals and make Echinoderms ideal models to monitor the effects of environmental contamination, with particular reference to those caused by *endocrine disrupters* (ED) compounds. In the context of dedicated European

---

(\*) Professore ordinario di Zoologia presso l'Università degli Studi di Milano, Italia. E-mail: daniela.candia@unimi.it.

and national projects, recent researches were addressed to study the effects of exposure to different classes of ED compounds (polychlorinated biphenyls, organotins, pesticides and others) on regenerative development of Echinoderms: the selected model species was the crinoid *Antedon mediterranea*. The obtained results showed that a prolonged exposure to ED compounds has a relevant impact on regeneration mechanisms inducing in the exposed individuals 1) anomalies in terms of regeneration times, morphogenesis, histogenesis and differentiation, 2) remarkable alterations of steroid hormones levels, showing a close concentration/effect correlation for all the tested compounds.

## 1. LA RIGENERAZIONE DEGLI ECHINODERMI: IL FENOMENO E LE SUE IMPLICAZIONI

La rigenerazione è un rilevante fenomeno biologico comune a tutti gli organismi e molto diffuso nel regno animale. Il processo rigenerativo, di qualunque entità esso sia (da semplice riparazione tissutale a ricrescita dell'intero individuo a partire da frammenti del corpo), va considerato un tipico processo di sviluppo che può interessare qualunque stadio del ciclo vitale e presentare aspetti in parte analoghi a quelli che caratterizzano lo sviluppo embrionale, rimanendo tuttavia intrinsecamente distinto dall'embriogenesi, essendo fondamentalmente un processo di natura asessuale e conservativo<sup>1</sup>. Il potenziale rigenerativo è espresso in modo particolarmente vistoso e rilevante negli animali che utilizzano la riproduzione asessuale (fissione, frammentazione, gemmazione), dove viene messo bene in luce come riproduzione asessuale e rigenerazione siano processi correlati e complementari, così come lo sono riproduzione sessuale ed embriogenesi. I fenomeni rigenerativi attuati dagli animali in seguito a mutilazioni autoindotte o traumatiche sono caratterizzati da complessi processi di sviluppo che differiscono in modo significativo da quelli embrionali *in primis* per l'ambiente cellulare/tissutale in cui si verificano, che, nella rigenerazione, è un contesto di tessuti già definito, in un individuo ben caratterizzato morfologicamente e funzionalmente<sup>2</sup>. Lo sviluppo rigenerativo può interessare: processi di *turnover* cellulare e/o di riparazione tissutale, processi di sostituzione e ricrescita di organi e intere parti del corpo, e perfino ricostruzione di interi individui da frammenti del corpo (*Whole Body Regeneration* – WBR) dando luogo a riproduzione asessuale e clonazione (anche seriale).

---

<sup>1</sup> Candia Carnevali *et al.* 2022.

<sup>2</sup> Candia Carnevali – Burighel 2010; Candia Carnevali *et al.* 2022.

Gli Echinodermi rappresentano un *phylum* di invertebrati marini ben noti per il potenziale rigenerativo che si esprime in modo spettacolare tanto nell'individuo adulto che nella larva e nell'embrione<sup>3</sup>. La rigenerazione è diffusa in tutte le classi ed è un fenomeno fisiologico che permette di rimpiazzare organi esterni ed interni perduti in seguito ad automutilazione o ad amputazione traumatica, ma allo stesso tempo fa anche parte del ciclo vitale, in quanto parte integrante del programma di riproduzione asessuale.

Negli Echinodermi i processi riproduttivi e dello sviluppo sono strettamente e finemente regolati da meccanismi endocrini e neuromorali. Ormoni steroidei analoghi a quelli dei vertebrati (Progesterone, Testosterone, Estrone, Estradiolo) sono stati più volte identificati nei diversi gruppi, così come sono state riscontrate vie biosintetiche degli steroidi simili a quelle dei vertebrati<sup>4</sup>. I fenomeni che risultano regolati da ormoni steroidei sono, in particolare, la produzione e il rilascio dei gameti, lo sviluppo embrionale e larvale, e lo sviluppo rigenerativo<sup>5</sup>. Problemi fondamentali e ancora largamente aperti nello studio della rigenerazione negli Echinodermi risultano essere quelli tipici, ma non solo, dei fenomeni di sviluppo, e cioè riguardano: gli aspetti fenologici; i meccanismi e i processi coinvolti; le cellule responsabili (staminali o riprogrammate) e la loro origine; i set di geni specifici attivati; la tipologia e il ruolo di fattori endogeni, morfogeni e/o mitogeni nella regolazione dei processi di crescita, morfogenesi, differenziazione; gli effetti dell'esposizione a fattori esogeni ambientali.

Un modello sperimentale molto valido e ben testato su cui il nostro gruppo di ricerca possiede una consolidata e riconosciuta esperienza è la rigenerazione del braccio del crinoide *Antedon mediterranea*. Si tratta di un tipico modello di rigenerazione epimorfica (blastemiale) che si attua secondo 3 fasi principali ben distinte: una fase riparativa (0-24 ore post-amputazione), una fase rigenerativa precoce (24-72 ore post-amputazione) e una fase rigenerativa avanzata (da 72 ore a 4 settimane post-amputazione). Gli aspetti-chiave finora esplorati e delucidati riguardano soprattutto le cellule responsabili (staminali e riprogrammate), i fattori regolativi endogeni implicati (neurali, neuro-endocrini), i geni coinvolti (geni tipici dello sviluppo e non)<sup>6</sup>.

<sup>3</sup> Candia Carnevali 2006; Candia Carnevali *et al.* 2022.

<sup>4</sup> Lavado *et al.* 2006a e 2006b; Shoemaker – Dieleman 1981; Wasson *et al.* 2000.

<sup>5</sup> Wasson *et al.* 2000; Roepke *et al.* 2005; Walsh *et al.* 1986.

<sup>6</sup> Candia Carnevali 2006; Candia Carnevali *et al.* 2022.

## 2. I FENOMENI RIGENERATIVI DEGLI ECHINODERMI COME MODELLI SPERIMENTALI IN ECOTOSSICOLOGIA

La capacità degli Echinodermi di andare incontro con relativa facilità a complessi fenomeni rigenerativi offre l'opportunità unica di studiare in modo controllato e con relativa facilità processi fisiologici di sviluppo in individui adulti e larvali e rende questi animali modelli ideali per lo studio degli effetti sub-letali della contaminazione ambientale, con particolare riferimento a quelli causati dagli *interferenti endocrini* (*Endocrine Disrupters* – ED)<sup>7</sup>. La contaminazione cronica da microinquinanti organici persistenti come gli ED rappresenta un problema di inquinamento di origine antropica di tipo globale, già ben noto per le rilevanti implicazioni in termini di effetti a medio e lungo termine<sup>8</sup> e oggi ritornato di grande attualità e priorità per la comunità scientifica sulla base di nuove evidenze sui subdoli effetti subletali in termini di drammatico impatto a catena sugli ecosistemi e di severe disfunzioni ormonali indotte nell'uomo e negli animali<sup>9</sup>. Gli Echinodermi sono organismi rappresentativi dell'ambiente marino, ubiquitari, sensibili e trattabili. In quanto bentonici e sedentari, vivono in costante e stretta relazione con i sedimenti in cui gli inquinanti ED tendono ad accumularsi e da cui vengono continuamente rilasciati<sup>10</sup>: per gli Echinodermi le vie principali di ingresso degli inquinanti disciolti sono sia dirette, attraverso gli epitelii esterni (*primary uptake*), sia indirette dagli alimenti (*secondary uptake*), dando luogo a progressivi processi di bioconcentrazione, bioaccumulo e biomagnificazione nell'organismo.

Recenti ricerche nell'ambito di programmi europei e nazionali sono state indirizzate ad esplorare gli effetti dell'esposizione a differenti classi di composti ED (policlirodifenili, composti organostannici, pesticidi e altri) sullo sviluppo rigenerativo degli Echinodermi, lanciando con successo un approccio applicativo relativamente inesplorato<sup>11</sup>. La specie utilizzata è stata il crinoide *Antedon mediterranea*, di fatto ad oggi uno dei modelli di rigenerazione più collaudati ed esplorati. Importante *background* di riferimento sono stati gli effetti già noti di comuni ED, come il TPT-Cl (trifenil-

<sup>7</sup> Candia Carnevali 2005.

<sup>8</sup> Colborn *et al.* 1996; Oehlman – Schulte-Oehlman 2003; Zou 2003.

<sup>9</sup> Darbre 2019, La Merrill *et al.* 2020.

<sup>10</sup> den Besten 1998; den Besten *et al.* 1989 e 1991; Depledge – Billingham 1999.

<sup>11</sup> Candia Carnevali 2005.

stagno cloruro), riscontrati in diversi organismi marini: per esempio l'insorgenza di fenomeni di *Imposex* e *Intersex* in Molluschi Gasteropodi<sup>12</sup>; l'evidenza di spermiotossicità, embriotossicità e tossicità larvale in Tunicati ed Echinodermi<sup>13</sup>; l'inibizione della rigenerazione del braccio in Echinodermi Ofiuroidei<sup>14</sup>. Lo studio intensivo da noi condotto ha avuto un duplice obiettivo: 1) proporre, sulla base della lunga esperienza sul modello sperimentale e della approfondita conoscenza pregressa dei fenomeni, modelli animali sensibili e trattabili che forniscano una prospettiva alternativa a quelli più comunemente usati e contribuiscano ad un'ampia visione complessiva del problema ecologico rappresentato dagli inquinanti ED; 2) mettere a fuoco gli effetti di alcune categorie di ED sui processi di sviluppo rigenerativo e comprenderne i possibili meccanismi di azione, indicando risposte comuni o specifiche in termini di disfunzione ormonale a livello di organismo *in toto*, di tessuti e di cellule<sup>15</sup>.

Una serie di esperimenti pilota sono stati effettuati su alcune classi di noti inquinanti persistenti ad azione ED come i policlorodifenili (PCBs). Gli esperimenti sono stati condotti in laboratorio in condizioni controllate su braccia rigeneranti di animali esposti a concentrazioni di PCBs comparabili a quelle di acque costiere moderatamente inquinate. Gli incoraggianti risultati ottenuti hanno mostrato interessanti effetti dell'esposizione a basse concentrazioni di inquinanti, con variazioni nei tempi e nei meccanismi rigenerativi, in particolare: crescita accelerata e abnorme, e processi di sviluppo anomalo a livello tissutale e cellulare chiaramente correlati ad un significativo bioaccumulo di PCBs misurato nell'organismo<sup>16</sup>.

Successivamente a questa fase *prodromica*, la partecipazione al progetto Europeo COMPRENDO<sup>17</sup> ha permesso di proporre il modello di rigenerazione di *A. mediterranea* (*regeneration test*) come nuovo modello per lo studio ecotossicologico degli ED sugli organismi marini e di trarre vantaggio da un approccio interdisciplinare integrato di vasta portata, in cui poter condurre esperimenti su larga scala e collaborare vantaggiosamente con gruppi internazionali con competenze

<sup>12</sup> Bryan *et al.* 1986; Horiguchi *et al.* 1997, 2000 e 2002.

<sup>13</sup> Cima *et al.* 1996; Moschino – Marin 2002; Novelli *et al.* 2002.

<sup>14</sup> Walsh *et al.* 1986.

<sup>15</sup> Candia Carnevali 2005.

<sup>16</sup> Candia Carnevali *et al.* 2001.

<sup>17</sup> < url: [www.comprendo-project.org](http://www.comprendo-project.org) >, 2002-2006.

complementari<sup>18</sup>. In termini di risposta biologica, sono stati valutati gli effetti dell'esposizione a basse concentrazioni di diversi tipi di ED ad azione androgenica ed antiandrogenica (composti organostannici, fenarimolo, metaboliti del DDT e altri) stabilite sulla base di dati in letteratura<sup>19</sup> e di dati ambientali, e segnalate dalla Comunità Europea come sostanze prioritarie da monitorare. Come *end-points* a livello macro e microscopico sono stati presi in esame parametri morfologici e fisiologici indicativi dello sviluppo rigenerativo, quali: crescita e sviluppo rigenerativo a stadi critici; malformazioni e anomalie; aspetti istopatologici relativi a pattern, morfogenesi e differenziamento di cellule/tessuti, proliferazione cellulare; livelli di ormoni steroidi negli organismi esposti. In parallelo, per tutto il protocollo sperimentale, sono state inoltre misurate le concentrazioni degli ED nei tessuti dei campioni e nell'acqua di esposizione<sup>20</sup>.

### 3. EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE A COMPOSTI ED SULLO SVILUPPO RIGENERATIVO

Viene qui presentata una breve rassegna di risultati rappresentativi ottenuti, nel corso del sopracitato progetto Europeo COMPRENDO, effettuando una lunga serie di esperimenti di esposizione controllata a diversi tipi di ED ad azione androgenica ed antiandrogenica attraverso l'approccio integrato sopra descritto: emerge chiaramente come l'utilizzo del così detto *regeneration test* e l'opportuna combinazione dell'analisi chimica con quella biologica possa fornire in *A. mediterranea* un quadro piuttosto completo e integrato degli effetti dell'esposizione agli inquinanti ED, sia a livello di intero organismo, sia di tessuti, di cellule e di livelli ormonali, sia di possibili siti di azione dell'inquinante. La *Fig. 1* presenta una tabella con le caratteristiche chimiche, i meccanismi di azione e le concentrazioni di esposizione delle principali sostanze testate: TPT-Cl (cloruro di trifenilstagno), FEN (Fenarimolo), e DDE (diclorodifenildicloroetilene). La *Fig. 2* illustra in forma riassuntiva lo schema del protocollo sperimentale seguito.

---

<sup>18</sup> Schulte-Oehlman *et al.* 2006.

<sup>19</sup> Kang *et al.* 2004; Tilmann *et al.* 2001.

<sup>20</sup> Schulte-Oehlman *et al.* 2006.



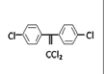
Nome comune	Formula di struttura	Classe/Categoria	Utilizzo	Presunto meccanismo di azione	Restrizioni	Range conc. testate
Trifenilstagno-Cl [TPT]		Organostannico	Fungicida, insetticida, antifouling	Inibitore aromatasi P450	Bandito l'utilizzo nelle vernici antifouling	50-500 ng/l
Fenarimol [FEN]		Pesticida alogenato (Pirimidine)	Fungicida	Inibitore aromatasi P450; agonista recettori estrogeni, antagonista recettori androgeni	Nessuna	24-2400 ng/l
p,p'-DDE [DDE]		Metabolita del DDT (pesticida alogenato)	--	Antagonista recettori androgeni	Dagli anni '70 banditi produzione e utilizzo del DDT (ancora in uso in paesi afflitti da malaria)	100-2500 ng/l

Fig. 1. Tabella riassuntiva delle tre principali sostanze ED scelte e testate per gli esperimenti di esposizione: TPT-cl (cloruro di trifenilstagno), FEN (Fenarimolo) e DDE (diclorodifenildicloroetilene). Vengono riassunte le loro caratteristiche chimiche, i meccanismi di azione e le concentrazioni di esposizione utilizzate.

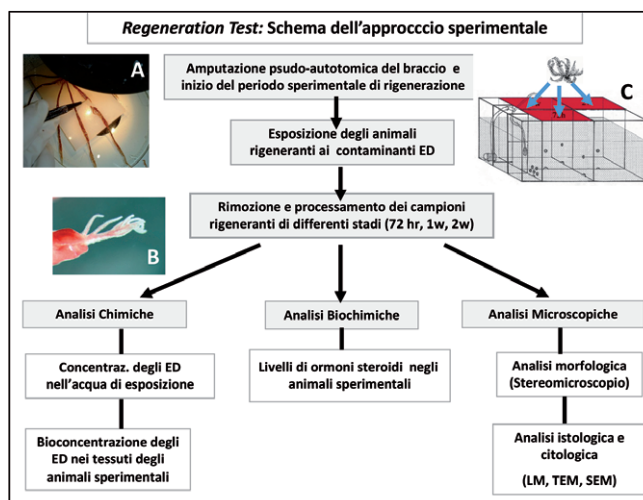


Fig. 2. Schema riassuntivo dell'approccio sperimentale seguito per tutti i composti ED testati e costituito da analisi chimiche, analisi biochimiche e microscopiche integrate. In A) è mostrato il momento della pseudo-autotomia del braccio (amputazione indotta da stimolazione meccanica), che immediatamente precede l'inizio degli esperimenti di esposizione; B) immagine allo stereomicroscopio di braccio rigenerante di 2 w pa; C) esempio di vasca a multicompartimenti usata per l'esposizione ai composti ED.

#### 4. CRESCITA E SVILUPPO RIGENERATIVO A STADI CRITICI

A tutti gli stadi (72 ore, 1 settimana, 2 settimane post-amputazione), i campioni rigeneranti, rispetto ai rispettivi controlli, presentano una crescita abnorme, con evidenze di malformazioni soprattutto a 1 e 2 settimane a tutte le concentrazioni testate (v. *Fig. 3 A, B, C, D*). L'incremento di crescita, vistoso per molti ED testati, risulta particolarmente significativo nel caso di concentrazioni intermedia (v. *Fig. 3 K*)<sup>21</sup>.

#### 5. APSETTI ISTOPATOLOGICI

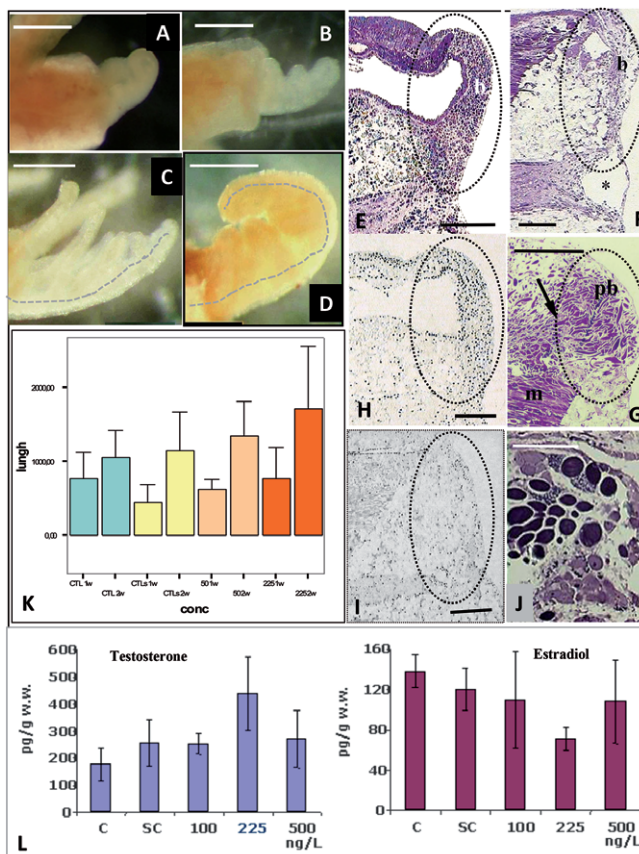
Con tutti i composti ED considerati, i campioni rigeneranti evidenziano alterazioni a livello istologico ed ultrastrutturale relative sia al rigenerato che al moncone amputato. Nel rigenerato, rispetto al rispettivo controllo, si segnala ritardato sviluppo del blastema con formazione di aree edematose e/o di ectopiche zone di crescita pseudoblastemali (v. *Fig. 3 E, F, G*). Nel moncone si riscontrano ipertrofia delle cavità celomatiche e riarrangiamento/riorganizzazione tissutale (*Fig. 3 J*): questi fenomeni morfologici sono particolarmente vistosi a livello dei fasci muscolari in prossimità della zona di amputazione (*Fig. 3 G, J*), con evidente sdifferenziamento dei singoli miociti e loro intensa e prolungata migrazione nelle attigue cavità celomatiche. La divisione cellulare nei campioni rigeneranti esposti non è intensa nei siti tipicamente proliferativi (blastema, epitelio celomatico) ed è significativamente ridotta rispetto ai controlli (*Fig. 3 H, I*). I processi di istogenesi e differenziamento presentano diverse anomalie, con particolare riferimento alla scheletogenesi (che rappresenta un noto target dei composti ED), dove le alterazioni sono molto evidenti a 1-2 settimane, in termini sia di sviluppo degli ossiculi del braccio (*Fig. 4 A, B, E, F*) che di deposizione e densità degli scleriti (*Fig. 4 C, D*)<sup>22</sup>.

---

<sup>21</sup> Barbaglio *et al.* 2006; Sugni *et al.* 2007, 2008a, 2008b e 2010a; Tremolada *et al.* 2009.

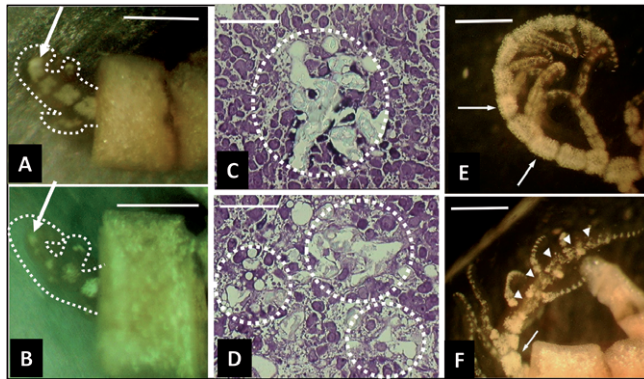
<sup>22</sup> Barbaglio *et al.* 2006; Sugni *et al.* 2007, 2008a, 2008b e 2010a; Tremolada *et al.* 2009.





*Fig. 3.* A), B), C), D): immagini allo stereomicroscopio di braccia rigeneranti di campioni di controllo e campioni esposti a TPT-cl (225 ng/l) allo stadio di 1 e 2 w pa. Il rigenerato è ben riconoscibile per il netto stacco rispetto al moncone (A, B). Nei campioni esposti a TPT-cl è evidente una crescita abnorme del braccio rigenerante. A) Controllo di 1 w pa. B) campione di 1 w pa esposto a TPT-cl. C) controllo di 2 w pa. D) campione di 2 w pa esposto a TPT-cl. A), B), C), D): barre = 0.5 mm. E), F), G), H), I), J): sezioni istologiche sagittali di braccia rigeneranti di controllo ed esposte ai diversi ED allo stadio di 72 h pa. E) Controllo: nel braccio rigenerante (area tratteggiata) è evidente il blastema (b) che consiste di un mesenchima di cellule morfologicamente indifferenziate. F) campione corrispondente esposto a Fenarimolo (240 ng/l): si notano anomalie nello sviluppo e nella consistenza del blastema (b) e nella solo parziale riparazione tissutale evidenziata da aree edematose sottocitriziali (\*). G) Campione corrispondente esposto a TPT-cl (225 ng/l): il rigenerato consiste di uno pseudo-blastema (pb, area tratteggiata) prevalentemente formato da una massa di miociti ectopici originati attraverso un flusso migratorio (freccia) proveniente dal muscolo del moncone amputato. H), I):

evidenziazione della proliferazione cellulare mediante BrdU e marcatura immunocitochimica. H): Controllo di 72 h pa: la marcatura è soprattutto localizzata nel blastema (area tratteggiata). I) Campione corrispondente esposto a DDE (2500 ng/l): il blastema, poco sviluppato (area tratteggiata), presenta una blanda marcatura per il BrdU. E), F), G), H), I): barre = 100  $\mu$ m. J) Campione esposto a DDE (2500 ng/l): dettaglio in sezione sagittale del fascio muscolare del moncone: sono evidenti processi di riarrangiamento (morfallassi) del fascio e numerosi miociti in via di sdifferenziamento e migrazione. Barra= 20  $\mu$ m. K) Crescita rigenerativa complessiva (espressa come lunghezza del braccio rigenerante) ad 1 e 2 w pa in campioni esposti a TPT-Cl di settimane e in campioni di controllo (CTLs: controllo- solvente). I dati sono presentati come medie  $\pm$  SEM. Alla concentrazione di 225 ng/l la crescita del rigenerato evidenzia un notevole incremento rispetto ai controlli. L) Livelli tissutali di testosterone ed estradiolo (espressi come pg/g di peso umido) in campioni rigeneranti esposti a TPT-Cl a diverse concentrazioni. I dati sono presentati come medie  $\pm$  SEM. I campioni esposti a 225 ng/l mostrano un incremento nei livelli di testosterone e un decremento nei livelli di estradiolo. In entrambi i casi le differenze sono significative rispetto ai controlli (SC: controllo-solvente).



*Fig. 4.* A), B): immagini allo stereomicroscopio di campioni rigeneranti allo stadio di 1 w pa: A) controllo e B) campione esposto a Fenarimolo (240 ng/l). Il rigenerato (area tratteggiata) è ben riconoscibile per il netto stacco rispetto al moncone ed è visibile per trasparenza la sequenza di ossiculi in formazione. Nel campione esposto è evidente uno sviluppo incompleto degli ossiculi rispetto al controllo. Barre = 1 mm. C), D): dettagli in sezioni istologiche dei processi di scheletogenesi in campioni rigeneranti allo stadio di 1 w pa. C) controllo e D) campione esposto a Fenarimolo (240 ng/l). L'ossiculo in sviluppo (area tratteggiata) ha una struttura più definita e compatta nel campione di controllo rispetto a quella dispersa e ipo-sviluppata del campione esposto. Barre = 20  $\mu$ m. E), F): immagini allo stereomicroscopio di campioni rigeneranti allo stadio di 2 w pa. Nei rigenerati è molto evidente la componente scheletrica. E) controllo e F) campione esposto a DDE (2400 ng/l). Nel campione esposto è evidente uno sviluppo irregolare e incompleto degli ossiculi rispetto al controllo. Barre = 1 mm.

## 6. LIVELLI DI ORMONI STEROIDI NEGLI ORGANISMI EPOSTI

In seguito all'esposizione sono state registrate con tutte le sostanze ED testate significative variazioni dei livelli endogeni di testosterone e di estradiolo nonché variazioni relative alle rispettive vie biosintetiche. È rilevante che, con le stesse concentrazioni intermedie di esposizione, e allo stesso stadio (2 settimane) a cui si rilevano valori abnormi della crescita rigenerativa e vistose alterazioni tissutali e cellulari, si registrino le variazioni più rilevanti nei livelli di testosterone e di estradiolo (*Fig. 3 L*): in particolare la diminuzione di livelli di estradiolo registrata risulta del tutto compatibile e correlabile al quadro istopatologico rilevato nei corrispondenti campioni relativamente ad una insufficiente scheletogenesi.

## 7. CONCLUSIONI

Nel complesso, sulla base dei risultati ottenuti nel corso degli anni relativamente all'ecotossicologia degli ED e all'utilizzo degli Echinodermi, si possono trarre le seguenti considerazioni.

I livelli di ED caratteristici delle zone costiere o portuali europee contaminate costituiscono una seria minaccia per l'ecosistema marino e si dimostrano modificare in modo subdolo la fisiologia di animali marini sensibili, alterandone significativamente i processi di sviluppo.

Una prolungata esposizione a composti ED risulta impattare notevolmente sui meccanismi rigenerativi degli Echinodermi, inducendo apprezzabili anomalie in termini sia di tempi e di modalità di rigenerazione che di squilibri ormonali con una correlazione concentrazione/effetti riscontrabile per tutte le sostanze testate. L'esposizione a basse-intermedie concentrazioni dei diversi tipi di ED induce sempre importanti variazioni nei tempi e nelle modalità della risposta rigenerativa, in termini di aspetti macro e microscopici, con particolare riferimento a crescita anomala, morfogenesi e istogenesi dei campioni trattati rispetto ai controlli; alterazioni istologiche e citologiche relative sia al rigenerato che al moncone amputato; anomalie relative a linee cellulari e siti specifici coinvolti nei fenomeni di proliferazione/migrazione.

L'esposizione a queste stesse concentrazioni sub-letali di ED porta a significative variazioni dei livelli ormonali nell'animale rigenerante contestualmente ad un rilevante bioaccumulo degli inquinanti nei tessuti.

Le anomalie riscontrate possono essere considerate un chiaro

indice dello stress ambientale a cui è sottoposto l'animale e rappresentano un dato evidente del grave *rischio* potenziale associato agli ED per qualunque tipo di ambiente.

Il crinoide *Antedon mediterranea* si rivela un bioindicatore ideale per lo stress indotto da inquinanti organici persistenti, che risponde in modo ottimale ai 5 requisiti di Hopkin (1993): *Relevant, Robust, Reliable, Responsive, Reproducible*.

Nello specifico, in termini di potenzialità applicative, la risposta rigenerativa (*regeneration test*) risulta offrire un originale modello sperimentale molto valido e sensibile per lo studio degli effetti ecotossicologici di inquinanti ED, sia a livello di intero organismo che a livello istologico, cellulare e biochimico-molecolare. L'utilizzo di questo test fornisce infatti informazioni rapide e significative a livello individuale sugli effetti dell'esposizione a sostanze esogene capaci di interferire con crescita, sviluppo, differenziamento, nonché sui meccanismi di azione delle stesse sostanze in termini di disfunzione endocrina relativamente a processi asessuali riproduttivi e di sviluppo, evidenziando risposte comuni o selettive in termini di specifico squilibrio ormonale. Inoltre l'estrapolazione dei moltissimi dati integrati ottenuti da queste ricerche può portare ad impostare e utilizzare vantaggiosamente originali modelli predittivi che, avvalendosi di simulazioni e modelli matematici, permettono di risparmiare su tempi, costi e sacrificio di animali<sup>23</sup>.

---

<sup>23</sup> Tremolada *et al.* 2009.

## BIBLIOGRAFIA

- Barbaglio, A. – Mozzi, D. – Sugni, M. – Tremolada, P. – Bonasoro, F. – Lavado, R. – Porte, C. – Candia Carnevali, M. D. 2006 *Effects of exposure to ED contaminants (TPT-Cl and Fenarimol) on crinoid echinoderms: comparative analysis of regenerative development and correlated steroid levels*, Mar Biol; 149 (1): 65-77.
- Bryan, G. W. – Gibbs, P. E. – Hummerstone, L. G. – Burt, G. R. 1986 *The decline of the gastropod Nocella papillus around south-west England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints*, J Mar Biol Ass UK; 66: 611-640.
- Candia Carnevali, M. D. 2005 *Regenerative response and endocrine disrupters in Crinoid Echinoderms: an old experimental model, a new ecotoxicological test*, in: V. Matranga (edited by), *Echinodermata, Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Subseries Marine Molecular Biotechnology, Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag, 167-199.
- Candia Carnevali, M. D. 2006 *Regeneration in Echinoderms: repair, regrowth, cloning*, Inv Surv J; 3: 64-76.
- Candia Carnevali, M. D. – Sugni, M. – Bonasoro, F. 2022 *Regeneration potential in Echinoderms: revisiting regeneration concept*, in S. Saleuddin (edited by), *Physiology of Invertebrates from Limited Taxa*, Apple Academic Press – Inc (in press).
- Candia Carnevali, M. D. – Bonasoro, F. – Patruno, M. – Thorndyke, M. C. – Galassi, S. 2001 *PCB exposure and regeneration in crinoids (Echinodermata)*, Mar Ecol Progr Ser; 215: 155-167.
- Candia Carnevali, M. D. – Burighel, P. 2010 *Regeneration in Echinoderms and Ascidiars*, in *Encyclopedia of Life Sciences*, Chichester, Wiley.
- Cima, F. – Ballarin, L. – Bressa, G. – Martinucci, G. – Burighel, P. 1996 *Toxicity of organotin compounds on embryos of a marine invertebrate (Styela plicata; Tunicata)*, Ecotoxicol Environ Saf; 35: 174-182.
- Colborn, T. – Petersen Myers, J. – Dumanoski, D. 1996 *Our Stolen Future, How we are threatening our fertility, intelligence and survival*, Boston Little, Brown and Co.
- Darbre, P. D. 2019 *The history of endocrine-disrupting chemicals. Current Opinion*, End Metab Res; 7: 26-33.
- den Besten, P. J. 1998 *Cytocrome P450 monooxygenase system in echinoderms*, Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol; 121: 139-146.
- den Besten, P. J. – Elembaas, J. M. L. – Maas, E. J. R. – Dielman, S. J. – Herwig, H. J. – Voogt, P. A. 1991 *Effects of cadmium and polychlorinated biphenyls (Clophen A50) on steroid metabolism and cytochrome P-450 monooxygenase system in the sea star Asterias rubens*, L Aquat Toxicol; 20: 95-110.

- den Besten, P. J. – Herwig, H. J. – Zandee, D. I. – Voogt, P. A. 1989 *Effects of cadmium and PCBs on reproduction of the sea star Asterias rubens: Aberrations in the early development*, *Ecotoxicol Environ Safety*; 18: 173-180.
- Depledge, M. – Billinghamurst, Z. 1999 *Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates*, *Mar Pollut Bull*; 39: 32-38.
- Hopkin, S. P. 1993 *In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems*, in *Handbook of ecotoxicology*, edited by P. Calow P, vol. I, Blackwell, Oxford, 397-427.
- Horiguchi, T. – Shiraishi, H. – Shimizu, M. – Morita, M. 1997 *Imposex in sea snails, caused by organotin (Tributyltin and Triphenyltin) pollution in Japan: a survey*, *Appl Organometal Chem*; 11: 451-455.
- Horiguchi, T – Takiguchi, N. – Cho, H. S. – Kojima, M. – Kaya, M. – Shiraishi, H. – Morita, M. – Hirose, H. – Shimizu, M. 2000 *Ovo-testis and disturbed reproductive cycle in the giant abalone, Haliotis madaka: possible linkage with organotin contamination in a site of population decline*, *Mar Environ Res*; 50: 223-229.
- Horiguchi, T. – Kojima, M. – Kaja, M. – Matsuo, T. – Shiraishi, H. – Morita, M. – Adachi, Y. 2002 *Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, Haliotis gigantea*, *Mar Environ Res*; 54: 679-684.
- Kang I. H. – Kim, H. S. – Shin, J. H. – Kim, T. S. – Moon, H. J. – Kim, I. Y. – Choi, K. S. *et al.* 2004 *Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and, p,p'DDE in rodent 10-day Hershberger assay*, *Toxicol*; 199: 145-159.
- La Merrill, M. A. – Vandenberg, L. N. – Smith, M.T. – Goodson, W. – Browne, P. – Patisaul, H. B. – Guyton, K. Z. *et al.* 2020 *Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification*, *Nature Rev Endocrinol*; 16: 45-57.
- Lavado, R. – Barbaglio, A. – Candia Carnevali, M. D. – Porte, C. 2006a *Steroid levels in crinoid echinoderms are altered by exposure to model endocrine disruptors*, *Steroids*; 71: 489-497.
- Lavado, R. – Sugni, M. – Candia Carnevali, M. D. – Porte, C. 2006b *Triphenyltin alters androgen metabolism in the sea urchin Paracentrotus lividus*, *Aquat Tox*; 79: 247-256.
- Moschino, V. – Marin, M. 2002 *Spermioxicity and embriotoxicity of triphenyltin in the sea urchin Paracentrotus lividus Lmk*, *Appl Organomet Chem*; 16: 175-181.
- Novelli, A. A. – Argese, E. – Tagliapietra, D. – Bettiol, C. – Volpi Ghirardini, A. 2002 *Toxicity of tributyltin and triphenyltin to early lifestages of Paracentrotus lividus (Echinodermata: Echinoidea)*, *Environ Toxicol Chem*; 21: 859-864.
- Oehlmann, J. – Schulte-Oehlmann, U. 2003 *Endocrine disruption in invertebrates*, *Pure Appl Chem* 75; 11-12: 2207-2218.

- Olmstead, A. W. – LeBlanc, G. A. 2007 *The Environmental-Endocrine Basis of Gynandromorphism (Intersex) in a Crustacean*, Int J Biol Sci; 3: 77-84.
- Roepke, T. A. – Snyder, M. J. – Cherr, G. N. 2005 *Estradiol and endocrine disrupting compounds adversely affect development of sea urchin embryos at environmentally relevant concentrations*, Aquat Toxicol; 71: 155-173.
- Schoenmakers, H. J. N. – Dieleman, S. J. 1981 *Progesterone and estrone levels in the ovaries, pyloric ceca and perivisceral fluid during the annual reproductive cycle of starfish Asterias rubens*, Gen Comp Endocrinol; 43: 63-70.
- Schulte-Oehlmann, U. – Watermann, B. – Tillmann, M. – Scherf, S. – Markert, B. – Oehlmann, J. 2000 *Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part II: Tripheniltin as a xenoandrogen*, Ecotoxicol; 9: 399-412.
- Schulte-Oehlmann, U. – Albanis, T. – Allera, A. – Bachmann, J. – Berntsson, P. – Beresford, N. – Candia Carnevali, M. D. *et al.* 2006 *Compendo: focus and approach*, Env Health Persp; 114: 98-100.
- Sugni, M. – Mozzi, D. – Barbaglio, A. – Bonasoro, F. – Candia Carnevali, M. D. 2007 *Endocrine Disrupting Compounds and echinoderms: new ecotoxicological sentinels for the marine ecosystem*, Ecotoxicol; 16: 95-108.
- Sugni, M. – Barbaglio, A. – Tremolada, P. – Candia Carnevali, M. D. 2008a *New tools and strategies for biomonitoring marine ecosystems: learning from echinoderms* in J. Chen – C. Guô (edited by), *Ecosystem Ecology Research Trends*, New York, Nova Science Publishers, 65-107.
- Sugni, M. – Manno, V. – Barbaglio, A. – Mozzi, D. – Bonasoro, F. – Tremolada, P. – Candia Carnevali, M. D. 2008 *Echinoderm regenerative response as a sensitive ecotoxicological test for the exposure to Endocrine disruptors: effects of p,p'DDE and CPA on crinoid arm regeneration*, Cell Bio & Toxicol; 24: 573-586.
- Sugni, M. – Tremolada, P. – Porte, C. – Barbaglio, A. – Bonasoro, F. – Candia Carnevali, M. D. 2010 *Chemical fate and biological effects of several endocrine disrupters compounds in two echinoderm species*, Ecotoxicol; 19: 538-554.
- Tillmann, M. – Schulte-Oehlmann, U. – Duft, M. – Markert, B. – Oehlmann, J. 2001 *Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone Acetate and Vinclozolin as antiandrogens*, Ecotoxicol; 10: 373-388.
- Tremolada, P. – Sugni, M. – Gilioli, G. – Barbaglio, A. – Bonasoro, F. – Candia Carnevali, M. D. 2009 *A dynamic model for predicting chemical concentrations in water and biota during the planning phase of aquatic ecotoxicological tests*, Chemos; 7: 915-923.

- Walsh, G. E. – McLaughlin, L. L. – *Inhibition of arm regeneration by Ophioderma brevispina (Echinodermata, Ofiuroida) by tributyltin oxide and triphenyltin oxide*, Ecotoxicol Environ Saf; 12: 95-100.
- Louie, M. K. – Deans, C. H. –  
Lores, E. M. 1986
- Wasson, K. M. – Gower, B. A. –  
Hines, G. A. – Watts, S. A. 2000 *Levels of progesterone, testosterone and estradiol and androstenedione metabolism in the gonads of Lytechinus variegatus (Echinodermata: Echinoidea)*, Comp Biochem Physiol; 126C: 153-165.
- Zou, E. 2003 *Current status of environmental endocrine disruption in selected aquatic invertebrates*, Acta Zoolog Sinica; 49: 551-565.