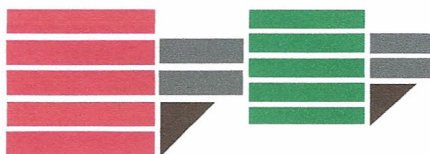


**UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA**



**Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra**

---

*Scuola di dottorato: "Scienze della vita"*

**Settore disciplinare BIO/05**

**CICLO XXIX**

**Alterazioni morfo-funzionali del fegato e  
dell'apparato branchiale di zebrafish (*Danio  
rerio*) dopo esposizione a cloruro di mercurio**

*Dottoranda*

**Dott.ssa Rachele MACIRELLA**

*Coordinatore*

**Prof. Marcello CANONACO**

*Docente Tutor*

**Prof.ssa Elvira BRUNELLI**

---

*Anno accademico 2016/2017*

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	pag. I-IV
<b>CAPITOLO I: METALLI PESANTI E MERCURIO</b>	
I.1. Metalli pesanti	» 1
I.2 Mercurio	» 5
I.3 Ciclo geo-biochimico del mercurio	» 7
I.4 Cloruro di mercurio	» 9
<b>CAPITOLO II: LA SPECIE STUDIATA</b>	
II.1 Inquadramento sistemico	» 11
II.2 Distribuzione geografica e habitat	» 12
II.3 Morfologia	» 13
II.4 Riproduzione e sviluppo	» 14
II.5 Zebrafish come organismo modello	» 16
II.6 Uso di zebrafish in ecotossicologia	» 17
<b>CAPITOLO III: STRUTTURA, ULTRASTRUTTURA E FUNZIONALITÀ DELL'APPARATO BRANCHIALE DEI PESCI</b>	
III.1 Le branchie nei pesci	» 20
<i>III.1a Condroitti</i>	» 20
<i>III.1b Osteitti</i>	» 21
III.2 Anatomia generale dell'apparato branchiale dei teleostei	» 23
III.3 Vascolarizzazione dell'apparato branchiale	» 26
III.4 L'innervazione dell'apparato branchiale	» 28
<i>III.4a L'omologia dei chemocettori dell'O<sub>2</sub> nei vertebrati</i>	» 29
<i>III.4b Le cellule neuroendocrine nelle branchie dei pesci: morfologia e localizzazione nei teleostei</i>	» 32
<i>III.4c Le cellule neuroepiteliali come chemocettori dell'O<sub>2</sub>: distribuzione e innervazione</i>	» 34
III.5 Gli epiteli branchiali dei teleostei	» 35

<i>III.5a Epitelio del filamento principale</i>	»	37
<i>III.5b Organizzazione dell'epitelio lamellare</i>	»	39
<b>CAPITOLO IV: IL FEGATO NEGLI</b>		
<b>ORGANISMI ACQUATICI</b>		
Premessa	»	42
IV.1 Caratteristiche del fegato dei teleostei	»	43
IV.2 Il parenchima epatico	»	45
<i>IV.2a Gli epatociti</i>	»	45
<i>IV.2b Le cellule di Ito</i>	»	45
<i>IV.2c Le cellule di Kupffer ed i macrofagi</i>	»	46
<i>IV.2d Lo spazio di Disse</i>	»	46
<i>IV.2e I sinusoidi</i>	»	46
<i>IV.2f Le cellule endoteliali</i>	»	47
IV.3 Non-parenchima	»	47
<i>IV.3a I dotti biliari</i>	»	47
<i>IV.3b Le arterie e le vene</i>	»	48
<b>CAPITOLO V: MATERIALI E METODI</b>		
V.1 Provenienza del materiale e mantenimento in laboratorio	»	49
V.2 Disegno sperimentale	»	50
V.3 Allestimento dei preparati per MO, TEM e SEM	»	51
<i>V.3a Prelievo</i>	»	51
<i>V.3b Fissazione</i>	»	51
<i>V.3c Disidratazione</i>	»	52
<i>V.3d Infiltrazione ed inclusione (MO e TEM)</i>	»	53
<i>V.3e Sezionamento e colorazione (MO e TEM)</i>	»	53
<i>V.3f Essiccamento (solo per SEM)</i>	»	54
<i>V.3g Montaggio (solo per SEM)</i>	»	55
<i>V.3h Ricopertura (solo per SEM)</i>	»	55
V.4 Allestimento dei preparati per immunoistochimica	»	55
<i>V.4a Fissazione</i>	»	56
<i>V.4b Disidratazione</i>	»	56
<i>V.4c Infiltrazione ed inclusione</i>	»	57
<i>V.4d Sezionamento</i>	»	58
<i>V.4e Sparaffinatura</i>	»	59
V.5 Metodo dell'immunofluorescenza	»	59
V.6 Real time PCR	»	61
<i>V.6a Estrazione e purificazione RNA totale da tessuto</i>	»	61
<i>V.6b Produzione del cDNA</i>	»	63
<i>V.6c RT-PCR</i>	»	63
V.6 Ibridazione <i>in situ</i>	»	64
<i>V.6a Consultazione database e costruzione primer</i>	»	64
<i>V.6b Amplificazione MT</i>	»	65
<i>V.6c Elettroforesi orizzontale</i>	»	66

<i>V.6d Estrazione del DNA dal gel di agarosio</i>	»	67
<i>V.6d Preparazione del vettore di clonaggio</i>	»	67
<i>V.6e Trasformazione dei batteri competenti</i>	»	68
<i>V.6f Estrazione e purificazione del DNA plasmidico dai batteri (miniprep).</i>	»	69
<i>V.6g Quantificazione miniprep e restrizione dei vettori</i>	»	70
<i>V.6h Costruzione delle sonde antisense</i>	»	71
<i>V.6i Ibridazione in situ</i>	»	72

## **CAPITOLO VI: RISULTATI**

VI.1 Struttura ed ultrastruttura delle branchie di <i>D. rerio</i>	»	74
VI.2 Struttura ed ultrastruttura delle branchie di <i>D. rerio</i> dopo esposizione a cloruro di mercurio	»	76
<i>VI.2a Esposizione a 7.7 µg/L di HgCl<sub>2</sub></i>	»	76
<i>VI.2b Esposizione a 38.5 µg/L di HgCl<sub>2</sub></i>	»	80
VI.3 Immunolocalizzazione di proteine target nelle branchie di <i>D. rerio</i>	»	83
<i>VI.3a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi</i>	»	83
<i>VI.3b Metallothioneina</i>	»	84
VI.4 Analisi molecolare: REAL-TIME PCR	»	85
<i>VI.4a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi</i>	»	85
<i>VI.4b Metallothioneina</i>	»	86
VI.6 Struttura ed ultrastruttura del fegato di <i>D. rerio</i>	»	87
VI.7 Struttura ed ultrastruttura del fegato di <i>D. rerio</i> dopo esposizione a cloruro di mercurio	»	90
<i>VI.7a Esposizione a 7.7 µg/L di HgCl<sub>2</sub></i>	»	90
<i>VI.7b esposizione a 38.5 µg/L di HgCl<sub>2</sub></i>	»	91
VI.8 Immunolocalizzazione della Metallothioneina nel fegato di <i>D. rerio</i>	»	95
VI.9 Analisi molecolare Metallothioneina nel fegato di <i>D. rerio</i>	»	96
<i>VI.9a Ibridazione in situ</i>	»	96
<i>VI.9b Real-Time PCR</i>	»	97

## **CAPITOLO VI: DISCUSSIONI E CONCLUSIONI**

	»	98
VII.1 Analisi morfologica ed ultrastrutturale dell'apparato branchiale di <i>D. rerio</i>		
<i>VII.1a Chloride cells</i>	»	103
VII.2 Analisi funzionale e molecolare degli effetti del mercurio sull'apparato branchiale di <i>D. rerio</i>	»	104
<i>VII.2a Espressione della pompa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi</i>	»	104
<i>VII.2b Espressione della Metallothioneina</i>	»	106
VII.3 Analisi morfologica ed ultrastrutturale del fegato di <i>D. rerio</i>	»	107
VII.4 Analisi funzionale e molecolare degli effetti del mercurio nel fegato di <i>D. rerio</i>	»	110
<i>VII.4a Espressione della Metallothioneina</i>	»	110

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	»	113
---------------------	---	-----

# INTRODUZIONE

L'inquinamento da metalli pesanti (mercurio, piombo, cadmio) rappresenta una seria minaccia per l'ambiente e la gravità di questo problema, su scala globale, è stata ampiamente dimostrata (Järup, 2003; Brunelli *et al.*, 2008; Brunelli *et al.*, 2011; Jaishankar *et al.*, 2014). La tossicità di queste sostanze è legata al fatto che riescono facilmente ad attraversare le membrane biologiche, accumulandosi rapidamente negli organismi (Velma *et al.*, 2009). Nonostante la ben documentata pericolosità dei metalli pesanti, l'esposizione a tali sostanze continua ad essere in costante aumento in molte parti del mondo (Järup, 2003; Jaishankar *et al.*, 2014). I metalli pesanti raggiungono i diversi compartimenti ambientali attraverso svariate fonti naturali e la loro presenza è aggravata anche dall'impiego in numerose attività umane collegate all'estrazione mineraria, alle attività industriali ed agli scarichi delle acque reflue (Rajeswari and Sailaja 2014).

Il mercurio (Hg) è un componente naturale della crosta terrestre, ma le attività antropiche dovute alle estrazioni minerarie, all'industria ed all'agricoltura, hanno alterato i suoi cicli geochimici e la sua distribuzione ambientale. Il mercurio è ampiamente distribuito sia negli ecosistemi acquatici che in quelli terrestri in tre forme chimiche: elementare, organica ed inorganica. Di queste tre forme quella inorganica, come il cloruro di mercurio, tende ad accumularsi prevalentemente negli ambienti acquatici (Giari *et al.*, 2008).

Qualunque sia la fonte di mercurio (naturale o antropica), la pericolosità di questo metallo pesante è legata alla sua elevata tendenza a bioaccumulare ed il rischio rappresentato dalla contaminazione da Hg, per i pesci e la fauna selvatica, è stato sottovalutato per molto tempo. Il Hg ha attirato l'attenzione internazionale dal 1950, quando è stato accertato che l'avvelenamento ed in alcuni casi la morte di molte persone in Giappone, erano provocati dal consumo di pesce e di frutti di mare provenienti dalla baia di Minamata contaminati da

mercurio (Wiener, 2013). Più tardi, il forte impatto di questo metallo pesante, sia sull'ambiente sia sulla salute umana, ha sottolineato il rischio globale legato alla contaminazione da Hg e, nel 2005, questo metallo è stato classificato terzo nell'elenco delle sostanze pericolose di maggiore priorità (CERCLA) (Giari *et al.*, 2008).

Il mercurio è un metallo pesante molto tossico che non ha alcuna funzione vitale negli organismi viventi (Bebianno *et al.*, 2007). È risaputo che, nei pesci, tale metallo è in grado di compromettere la normale funzionalità del cervello (Senger *et al.*, 2006; Senger *et al.*, 2010; Cambier *et al.*, 2012), del muscolo scheletrico (de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2008; Cambier *et al.*, 2009), del sistema immunitario (Aboud, 2010) e del sistema riproduttivo (Crump and Trudeau 2009; Penglase *et al.*, 2014). Inoltre è stato dimostrato che il Hg induce degenerazione cellulare, stress ossidativo, nonché l'alterazione del metabolismo energetico e dell'omeostasi del calcio (Berntssen *et al.*, 2003; Berg *et al.*, 2010). Ad oggi, gli studi scientifici, hanno prevalentemente rivolto il loro interesse nell'investigare gli effetti del metilmercurio (MeHg) (Gonzalez *et al.*, 2005; Mela *et al.*, 2007; Cambier *et al.*, 2012; Gentès *et al.*, 2015), poiché il consumo di pesce contaminato da MeHg rappresenta, per la salute umana, una minaccia su scala globale (Trasande *et al.*, 2005; Driscoll *et al.*, 2013) e gli effetti indotti dal mercurio inorganico sono stati sostanzialmente sottovalutati.

Alcuni studi hanno dimostrato che nei pesci, le branchie, sono la principale via d'ingresso del mercurio inorganico (IHg) (Clarkson *et al.*, 2003; Gentès *et al.*, 2015) e che tale forma, rispetto a quella organica, tende ad accumularsi prevalentemente in organi come il fegato ed il rene (Wagemann *et al.*, 2000). L'apparato branchiale gioca nei pesci un ruolo fondamentale nel controllo degli scambi di gas, nell'osmoregolazione, nella regolazione acido-base, nella detossificazione e nell'escrezione (Evans *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2012) mentre, il fegato, è l'organo principalmente coinvolto nel controllo delle vie metaboliche, nell'omeostasi e nella

detossificazione (Ung *et al.*, 2010; Brandão *et al.*, 2015). La potente azione tossica esercitata dal mercurio può influenzare la normale morfologia di questi organi, compromettendone non solo il loro importante ruolo funzionale, ma interferendo inoltre con i principali processi fisiologici e metabolici.

Gli studi istopatologici sono frequentemente utilizzati per analizzare gli effetti tossici dei metalli pesanti, compreso il mercurio e rappresentano un valido strumento per valutare rapidamente lo stato di salute degli organismi (Au, 2004). Oltre alle alterazioni istopatologiche, anche gli enzimi sono impiegati come sensibili marker biochimici, utili per investigare gli effetti legati alla contaminazione da metalli. In particolare, nei pesci d'acqua dolce, l'esposizione acuta a concentrazioni sub-letali di iHg può alterare le normali funzioni dell'apparato branchiale inducendo alterazioni morfologiche (Canli *et al.*, 1996; Jagoe *et al.*, 1996; de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2000; de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002) e/o la soppressione della regolazione del Na (spesso come conseguenza di un'alterazione nell'attività della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi) (Niyogi, and Wood 2003; Klinck *et al.*, 2005).

La pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi è una proteina trans membrana che regola il trasporto di ioni sodio e di ioni potassio rispettivamente all'esterno ed all'interno della cellula (Kim *et al.*, 2016). Poiché la modulazione della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi precede la comparsa di una disfunzione osmoregolatoria, questo enzima rappresenta un campanello d'allarme di inquinamento ambientale (Stagg *et al.*, 1992; Poopal *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016) e proprio per questo motivo, è spesso impiegato come biomarker di stress osmotico in conseguenza all'esposizione a iHg.

Le metallotioneine (MT) sono proteine a basso peso molecolare con una forte affinità per diversi metalli, generalmente coinvolte nella regolazione di metalli essenziali come il rame e lo zinco e nella detossificazione cellulare di metalli non essenziali come il Hg, il cadmio e

l'argento (De Boeck *et al.*, 2003). Inoltre, queste proteine conferiscono resistenza agli organismi che vivono in ambienti contaminati (Roesijadi, 1994; Hamza-Chaffai *et al.*, 2000) e, grazie a queste caratteristiche, sono tipicamente utilizzate per valutare l'impatto dei metalli pesanti negli organismi acquatici (De Boeck *et al.*, 2003; Alvarado *et al.*, 2006; Montaser *et al.*, 2010; Brunelli *et al.*, 2011).

Nel presente lavoro abbiamo utilizzato come organismo modello zebrafish (*Danio rerio*), una specie che è stata recentemente adoperata in un numero sempre crescente di studi tossicologici. Infatti, le ridotte dimensioni corporee, il facile mantenimento, la riproduzione e lo sviluppo morfologico, rendono zebrafish un modello ideale per la ricerca ecotossicologica, utile a chiarire gli effetti dell'esposizione a diverse sostanze chimiche (Hill *et al.*, 2005).

Sulla base di queste informazioni, la nostra ricerca, è stata progettata per stimare e comprendere gli effetti morfo-funzionali indotti dal mercurio sull'apparato branchiale e sul tessuto epatico di *D. rerio*. In particolare, abbiamo valutato i cambiamenti morfologici ed ultrastrutturali, associati ad un'esposizione acuta a due concentrazioni sub-letali di HgCl<sub>2</sub>. Inoltre, avvalendoci dell'analisi molecolare di real-time PCR abbiamo valutato la quantificazione genetica della Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi e della metallotioneina correlandola alla localizzazione proteica attraverso l'analisi funzionale (sia per l'apparato branchiale che per il tessuto epatico) e d'ibridazione *in situ* (per il tessuto epatico), in condizioni basali ed in condizioni sperimentali.



# CAPITOLO I

## METALLI PESANTI E MERCURIO

### I.1 METALLI PESANTI

Il termine metalli pesanti è stato suggerito nel 1980 da Nieboer e Richardson per descrivere la presenza nell'ambiente di alcune sostanze potenzialmente tossiche per gli esseri viventi.

I metalli pesanti (Tab I.1) fanno parte dei metalli di transizione e nella tavola periodica si ritrovano nei gruppi VI B, VII B, VIII B, I B, II B, ma anche nei gruppi III A e IV A. Essi hanno numero atomico maggiore di 20, una densità superiore ai 5 g/cm<sup>-3</sup>, una spiccata attitudine a formare complessi, una bassa solubilità dei loro idrati e stati di ossidazione diversi a seconda delle condizioni di pH ed Eh.

METALLO	NUMERO ATOMICO	DENSITÀ (g/cm <sup>-3</sup> )
Argento (Ag)	47	10,5
Bario (Ba)	56	3,62
Cadmio (Cd)	48	8,65
Cobalto (Co)	27	8,9
Cromo (Cr)	24	7,18
Manganese (Mn)	25	7,43

Mercurio (Hg)	80	13,546
Molibdeno (Mo)	42	10,22
Nichel (Ni)	28	8,908
Piombo (Pb)	82	11,35
Rame (Cu)	29	7,133
Stagno (Sn)	50	7,256
Titanio (Ti)	22	4,54
Vanadio (V)	23	6,11
Zinco (Zn)	30	7,133
Tallio (Tl)	81	11,85
Arsenico (As)	33	5,778
Antimonio (Sb)	51	6,691
Selenio (Se)	34	4,82
Bismuto (Bi)	83	9,747

**Tab I.1:** proprietà chimico-fisiche dei metalli pesanti.

I metalli si possono classificare in tre gruppi (Marchetti, 1998):

- metalli in traccia;
- metalli chimicamente simili ad un elemento indispensabile;
- metalli che non hanno alcuna azione fisiologica conosciuta.

I metalli in traccia (o elementi in traccia), sono elementi chimici presenti nei fluidi biologici degli organismi viventi in concentrazioni inferiori a 1 µg per grammo di peso ed a loro volta, in base agli effetti fisiopatologici, possono essere suddivisi in due gruppi (Duffus, 2002):

- essenziali;
- non essenziali.

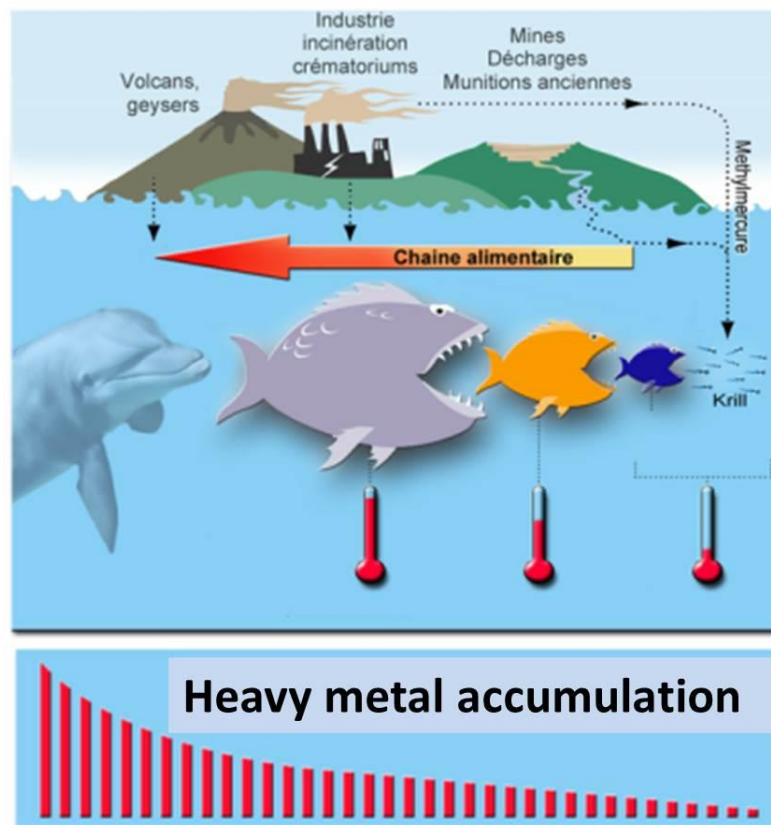
I **metalli essenziali** comprendono: ferro, rame, zinco, cromo, nichel, cobalto, molibdeno e manganese. Sono richiesti dall'organismo a concentrazioni minime e sono coinvolti in molteplici funzioni biologiche essendo costituenti essenziali di molti enzimi.

Fanno invece parte dei **metalli non essenziali** il mercurio, il cadmio, il piombo e lo stagno, che non sembrano avere alcun ruolo nei cicli vitali (Cognetti *et al.*, 2004).

Nei sistemi acquatici i metalli pesanti sono introdotti prevalentemente in conseguenza all'erosione di terreni e di rocce, alle eruzioni vulcaniche ed alle diverse attività umane (estrazioni minerarie, emissioni dovute all'attività industriale e agricola, produzione di rifiuti solidi) (Baatrup, 1991; Perugini *et al.*, 2014). Tra i metalli pesanti il piombo, il cadmio, il mercurio e l'arsenico sono quelli maggiormente dispersi nell'ambiente. Essi non hanno alcun effetto benefico sull'uomo, non esiste alcun meccanismo noto di omeostasi (Draghici *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2011) e generalmente sono considerati più tossici, non solo per l'uomo ma anche per gli animali (Jomova and Valko, 2011; Tokar *et al.*, 2011).

L'inquinamento da metalli pesanti è da considerarsi preoccupante anche in considerazione del fatto che tali sostanze sono in grado di bioaccumulare. Il **bioaccumulo** (o accumulo

biologico) è il processo attraverso il quale sostanze tossiche, persistenti nell'ecosistema, si accumulano all'interno di un organismo in concentrazioni superiori a quelle riscontrate nell'ambiente circostante. Pertanto, quando si parla della pericolosità dei metalli pesanti, non si può tralasciare il fenomeno della *biomagnificazione*, ossia il processo attraverso il quale l'accumulo di sostanze tossiche negli esseri viventi aumenta di concentrazione man mano che si sale al livello trofico successivo, ovvero procedendo dal basso verso l'alto della piramide alimentare all'interno della rete trofica (Fig. I.1).



**Fig.I.1:** la biomagnificazione.

## I.2 MERCURIO

Il mercurio, il cui nome deriva dal greco *hydràrgyros* e significa “argento liquido”, è un elemento noto fin dall’antichità e costituisce circa il  $5 \times 10^{-5}\%$  della crosta terrestre. Questo metallo occupa il gruppo IIB dei metalli di transizione nella tavola periodica degli elementi. È un metallo bianco argenteo, notevolmente volatile ed è l’unico che a temperatura ambiente si presenta allo stato liquido. Mostra elevata viscosità, densità e tensione superficiale mentre la conducibilità termica ed elettrica, per quanto elevate, risultano notevolmente inferiori rispetto a quelle degli altri elementi (Tab. I.2).

<b>NOME</b>	Mercurio
<b>SIMBOLO ELEMENTO</b>	Hg
<b>NUMERO ATOMICO</b>	80
<b>NUMERO CAS</b>	7439-97-6
<b>PESO ATOMICO</b>	200,59 u
<b>DENSITÀ</b>	liquido: 13 579 kg/m <sup>3</sup> solido: 15 600 kg/m <sup>3</sup>
<b>PUNTO DI FUSIONE</b>	234,32 K (-38,83 °C)
<b>PUNTO DI EBOLLIZIONE</b>	629,88 K (356,73 °C)

**Tab. I.2:** Proprietà del mercurio.

L’emissione globale di mercurio dalle fonti naturali va dalle 1.800 alle 5.800 tonnellate l’anno mentre, le emissioni di origine antropica, vanno dalle 2.190 alle 2.320 tonnellate annue (Sharma *et al.*, 2007), con un conseguente rilascio di mercurio nell’ambiente che spesso supera i livelli consentiti. Le principali fonti naturali di mercurio sono il degassamento della crosta terrestre, le emissioni vulcaniche e l’evaporazione da corpi naturali di acqua; mentre per quanto riguarda le attività antropiche, il mercurio è diffuso in

diversi processi industriali ed è presente in svariati prodotti (apparecchiature elettriche ed elettroniche, batterie, lampade e termometri) (Oehlenschläger, 2002).

Questo metallo pesante ha attirato l'attenzione della comunità scientifica sin dal 1950, quando sono state riportate le prime evidenze dei suoi dannosi effetti ambientali, inducendo quindi la messa a punto di nuove normative che ne limitassero l'uso (Senger, 2010). Recentemente l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha classificato il mercurio come una delle 10 sostanze chimiche di maggiore preoccupazione per la salute pubblica in tutto il mondo (Hassan *et al.*, 2012).

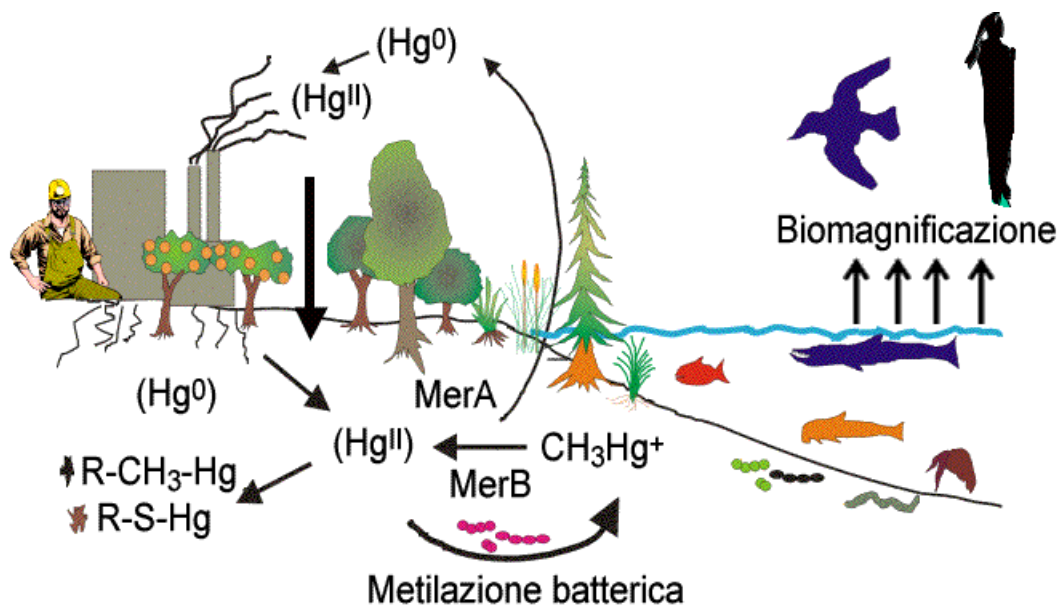
Il mercurio si trova comunemente nell'ambiente in tre forme: mercurio elementare, mercurio inorganico e mercurio organico. È importante sottolineare che tutte le forme chimiche del mercurio possono essere potenzialmente tossiche (Ho *et al.*, 2013) e che le principali emissioni antropogeniche e naturali di questo metallo pesante esistono come forme inorganiche (Senger *et al.*, 2010).

- Il **mercurio elementare** ( $\text{Hg}^0$ ) si presenta liquido e altamente volatile a temperatura ambiente. In passato il mercurio elementare è stato spesso impiegato per la realizzazione di alcuni strumenti (barometri e termometri), come materiale catodico durante l'elettrolisi cloro-alcalina per la produzione del cloro e come amalgama nelle leghe dentarie (Fitzgerald, 1993). È emesso in atmosfera sotto forma di vapore da numerose fonti, sia antropiche che naturali.
- Le forme di **mercurio inorganico** sono quelle principalmente presenti nei sistemi acquatici in quanto utilizzati in numerosi processi industriali e come fungicidi. Tali forme possono avere stato di ossidazione +1 (composti mercuriosi) e +2 (composti mercurici) e derivano dall'unione del Hg con elementi non metallici come il cloro (Cl), lo zolfo (S) e l'ossigeno (O).
- Tra i **composti organici**, il più noto è il metilmercurio (MeHg) che non trova applicazioni industriali, ma proviene quasi esclusivamente dalla metilazione dei cationi

$\text{Hg}^{2+}$  per opera di alcuni batteri anaerobi zolfo-riducenti che vivono nel suolo e nei sedimenti marini, lacustri e fluviali. Di recente da studi condotti in laboratorio, tuttavia, è emerso come numerosi altri tipi di batteri sono in grado di compiere il processo di metilazione (Compeau and Bartha, 1985).

### **I.3 CICLO GEO-BIOCHIMICO DEL MERCURIO**

Nell'atmosfera il mercurio è principalmente presente sotto forma di elemento gassoso e quindi, in forma relativamente non reattiva. I vapori di mercurio elementare possono rimanere tali per un periodo compreso tra 6 mesi e 2 anni circa e i rischi relativi alla loro emissione, trasporto e deposito sono d'interesse globale. Il mercurio, sia come metallo sia sotto forma di composto organico, precipitando sul suolo è veicolato dalle acque al mare, dove finisce per depositare e sedimentare; sedimentando nei fondali è convertito, per opera di batteri anaerobi zolfo riducenti nelle forme metilate, che bioaccumulando si concentrano negli organismi viventi ed in particolare nei pesci (Fig. I.2). A causa della sua tendenza a bioaccumulare e biomagnificare, attraverso la catena alimentare, il mercurio rappresenta dunque un serio rischio per la salute umana.



**Fig. I.1:** ciclo geobiochimico del mercurio.

Dato l'elevatissimo potenziale tossico del mercurio sia per i pesci sia per la fauna selvatica, quando si parla d'inquinamento da mercurio, particolare attenzione deve essere rivolta verso l'ambiente acquatico. In particolare, per quanto riguarda l'ambiente marino, circa il 60% dei depositi di Hg di tutto il mondo è localizzato nel bacino del Mediterraneo (Ferrara *et al.*, 1997) dove sono presenti diverse fonti naturali di  $Hg^0$  quali vulcani attivi e numerose sorgenti di energia geotermica. Gli scarichi antropici e le acque dei fiumi provenienti da aree industrializzate costituiscono una fonte importante di contaminazione da Hg a livello delle zone costiere del Mediterraneo, così come le deposizioni secche e umide di  $Hg^{2+}$ .

È importante sottolineare che le caratteristiche geologiche del mar Mediterraneo, sommate allo scarso ricambio idrico ed alle condizioni oligotrofiche, sono particolarmente favorevoli alla produzione di MeHg che è prontamente assimilato dagli organismi acquatici (Ghidini *et al.*, 2000; Cossa *et al.*, 2009).

Il mercurio pur essendo un contaminante tipico degli ambienti marini, è tuttavia più tossico nelle acque dolci in quanto, in tali ambienti, diminuendo il pH la sua solubilità aumenta e



così le particelle del metallo muovendosi più velocemente si accumulano più facilmente nei tessuti.

#### **I.4 CLORURO DI MERCURIO**

Rientra nelle forme inorganiche del mercurio il cloruro mercurico (Tab. I.3) che rappresenta la principale fonte d'inquinamento da mercurio per i sistemi acquatici. A temperatura ambiente, il cloruro di mercurio, si presenta come un solido cristallino, bianco, inodore e scarsamente volatile. È un composto corrosivo che trova oggi ampio uso nei processi di conservazione del legno, nell'intensificazione della fotografia, nella formulazione di disinfettanti, di fungicidi e di medicinali. La sua preparazione avviene attraverso la reazione del mercurio con cloro gassoso, oppure sublimando una miscela di solfato mercurico e cloruro di sodio (il sale comune).

<b>FORMULA</b>	HgCl <sub>2</sub>
<b>NOMENCLATURA IUPAC</b>	cloruro mercurico
<b>NUMERO CAS</b>	7487-94-7
<b>MASSA MOLECOLARE</b>	271,50 g/mol
<b>DENSITÀ (G/CM<sup>3</sup>)</b>	5,44 (20 °C)
<b>SOLUBILITÀ IN ACQUA</b>	74 g/l (20 °C)
<b>COSTANTE DI SOLUBILITÀ</b>	1,45 × 10 <sup>-18</sup>
<b>TEMPERATURA DI FUSIONE</b>	280 °C (553 K)
<b>TEMPERATURA DI EBOLLIZIONE</b>	302 °C (575 K) (sublima)

**Tab. I.3:** proprietà del cloruro di mercurio.

Il cloruro di mercurio è una delle forme più tossiche di mercurio perché forma facilmente complessi mercurio-organici con proteine (Boujbiha *et al.*, 2009) ed inoltre è in grado di

intaccare negativamente il sistema riproduttivo, il fegato e l'espressione genica in diversi animali (Rao and Gangadharan, 2008; Boujbiha *et al.*, 2011). Numerosi studi dimostrano come il cloruro mercurico sia in grado di causare stress ossidativo correlato alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che, a loro volta, provocano danni cellulari in diversi organi e alterano le attività enzimatiche antiossidanti in svariati tessuti animali (Bando *et al.*, 2005; Boujbiha *et al.*, 2009).

## CAPITOLO II

### LA SPECIE STUDIATA

#### II.1 INQUADRAMENTO SISTEMICO

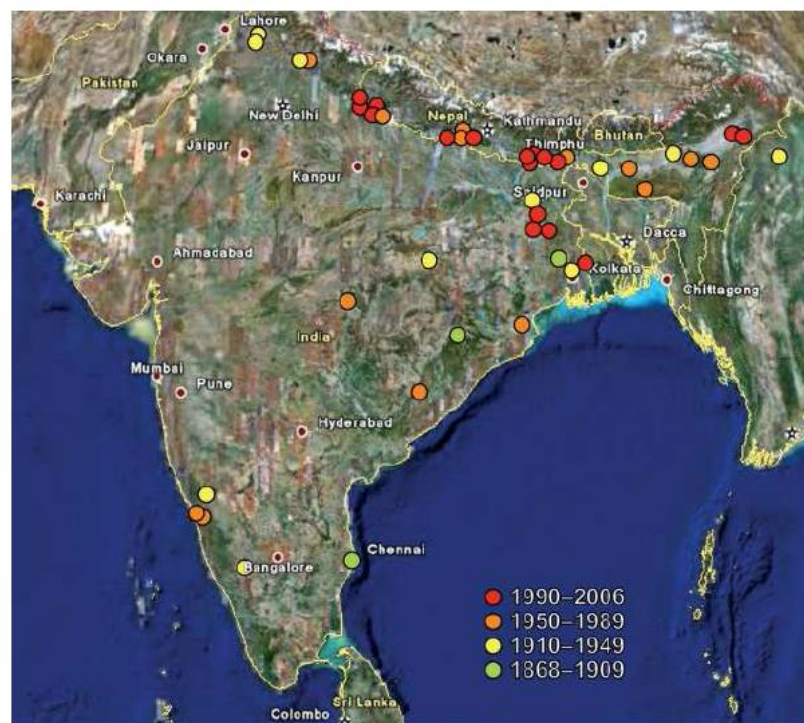
Zebrafish è un teleosteo tropicale d'acqua dolce membro della famiglia dei Ciprinidi (Tab. II.1), descritto per la prima volta da Francis Hamilton Buchanan nel 1822 nel suo libro “*Una relazione sui pesci scoperti nel fiume Gange e nei suoi affluenti*” insieme ad altre dieci specie del genere *Danio*.

<b>DOMINIO</b>	Eukaryota
<b>REGNO</b>	Animalia
<b>PHYLUM</b>	Chordata
<b>CLASSE</b>	Actinopterygii
<b>ORDINE</b>	Cypriniformes
<b>FAMIGLIA</b>	Cyprinidae
<b>SOTTOFAMIGLIA</b>	Danioninae
<b>GENERE</b>	<i>Danio</i>
<b>SPECIE</b>	<i>Danio rerio</i>

**Tab. II.1:** sistemica di *Danio rerio*- zebrafish

## II.2 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA E HABITAT

*Danio rerio* è distribuito geograficamente in tutto il sud e sud-est asiatico specialmente in India, Pakistan, Burma e Nepal, anche se la presenza naturale della specie è prevalentemente legata al bacino del fiume Gange e del Brahmaputra (Spence *et al.*, 2008) (Fig. II.1). Tali regioni geografiche sono caratterizzate da un clima monsonico in cui si alternano stagioni secche a stagioni con piogge frequenti, pertanto queste condizioni ambientali altamente variabili, confermano con grande evidenza che gli esemplari di zebrafish si adattano perfettamente ad oscillazioni climatiche abbastanza frequenti.



**Fig. II.1:** distribuzione geografica di zebrafish registrata dal 1868 al 2006.

Gli habitat naturali di *D. rerio*, sono stati spesso descritti come bacini idrici di piccole dimensioni con substrato fangoso e vegetazione acquatica e con un range di temperatura compresa tra 24-38°C (Lawrence, 2007). Questo pesce tropicale è comunemente ritrovato

in stagni poco profondi, in acque stagnanti ed in risaie. L'associazione a questi ambienti è probabilmente legata alla disponibilità di cibo ed all'assenza di predatori (Spence *et al.*, 2008).

Il pesce zebra è una specie onnivora e la sua dieta naturale è composta fondamentalmente da zooplancton, insetti e fitoplancton (McClure *et al.*, 2006).

### **II.3 MORFOLOGIA**

*D. rerio* è un piccolo pesce, lungo dai 4 ai 6 cm, che presenta un corpo affusolato più arrotondato e grande nelle femmine. Generalmente vive in branchi composti di 5 a 20 individui che si muovono in modo sincrono in superficie. Alla bocca presenta un paio di barbigli; la livrea prevede una base argentea e dorata, un dorso verde-olivastro ed un ventre bianco argenteo. I fianchi sono un'alternanza tra linee orizzontali chiare (bianche o giallo-oro) e linee scure blu cobalto a volte tendenti al viola; queste linee percorrono orizzontalmente tutta la lunghezza del corpo dalla testa alla pinna caudale. La coda e la pinna caudale sono striate di bianco e di blu, la pinna dorsale è blu orlata di bianco mentre le altre pinne sono olivastre. La bocca è rivolta in alto, le pinne pelviche non presentano disegni, mentre la pinna anale e quella caudale presentano un disegno a righe continue. La pinna caudale è molto arretrata.

Sulla base di due caratteristiche morfologiche, quali la presenza di pinne dorsali corte con solo sette raggi ramificati e la linea laterale incompleta o assente, Weber e Beaufort nel 1916, assegnarono *D. rerio* al sottogenere *Brachydanio*. Tuttavia, nel 1991, altri studiosi hanno proposto l'unione dei generi *Danio* e *Brachydanio* per la mancanza di caratteri distintivi che contraddistinguono in modo affidabile i due gruppi (Barmann, 1991).

## II.4 RIPRODUZIONE E SVILUPPO

Il dimorfismo sessuale in questa specie non è molto evidente: solo osservando degli esemplari adulti possiamo notare delle differenze fra maschio e femmina. Queste differenze sono più evidenti nel periodo di riproduzione quando le femmine sono gonfie d'uova e quindi caratterizzate da un ventre molto più tondo, mentre i maschi hanno una colorazione più intensa (Fig. II.2).



**Fig. II.2:** Esemplari adulti di *Danio rerio*. F= femmina; M= maschio

Studi di campo descrivono zebrafish come una specie annuale, il cui periodo riproduttivo è indotto dalla temperatura ed ha inizio con la comparsa della stagione dei monsoni (Talwar and Jhingran, 1991).

Stimoli olfattivi giocano un ruolo importante nella riproduzione di questo pesce. Il rilascio di ormoni maschili, infatti, induce l'ovulazione nelle femmine, ma la riproduzione è influenzata anche dal fotoperiodo. L'ovulazione avviene tipicamente appena prima dell'alba (Selman *et al.*, 2005) e la deposizione delle uova inizia entro le prime ore di luce, ma non è strettamente limitata a questo periodo (Spence *et al.*, 2008; Engeszer *et al.*, 2007). Il rito di corteggiamento da parte dei maschi avviene prima e durante la deposizione

delle uova. Nella fase di corteggiamento, i maschi nuotano affiancati alle femmine in un ambiente ristretto e con le pinne sollevate. Quando avviene la deposizione delle uova, il maschio nuota parallelamente alla femmina quasi ad avvolgerla e rilascia lo sperma (Spence *et al.*, 2008). Il rituale di accoppiamento ed il fatto che i maschi stabiliscano e difendano il territorio, indicano che le femmine sono particolarmente selettive nella scelta del partner, infatti, esse depongono più frequentemente quando accoppiate a specifici maschi.

Le femmine sono esigenti per quanto riguarda i siti di deposizione delle uova, preferiscono un substrato con ciottoli localizzati in zone poco profonde e ricche di vegetazione, per offrire protezione sia alle uova che alle larve. Le uova si sviluppano entro 48-72h a 28.5°C. Dopo la schiusa le larve aderiscono alle superfici immerse mediante cellule specializzate localizzate sulla testa e dalle 24-48h dopo la schiusa, iniziano a nutrirsi del piccolo zooplancton (Eaton and Farley, 1974).

La maturità sessuale è raggiunta tra i 3 ed i 6 mesi dopo la nascita, ma può variare notevolmente in relazione alle condizioni ambientali ed alla disponibilità di cibo (Spence *et al.*, 2008), di conseguenza è preferibile considerare la maturità sessuale in base alla grandezza del pesce piuttosto che all'età. Numerosi studi riportano che la lunghezza considerata come riferimento per indicare la raggiunta maturità sessuale è di 23 mm (Eaton and Farley, 1974; Spence *et al.*, 2008).

Nonostante il vasto utilizzo come pesce d'acquario, zebrafish oggi rappresenta uno dei modelli di vertebrato più importante per la genetica, le scienze dello sviluppo, la medicina, la farmacologia e l'ecotossicologia (Scholz *et al.*, 2008; Spitsbergen and Kent, 2008). Tuttavia le poche conoscenze sulla sua ecologia e storia naturale, rendono di difficile interpretazione il suo comportamento, la fisiologia, la variazione genetica e fenotipica e la storia dell'evoluzione embrionale, larvale ed adulta (Engeszer *et al.*, 2007).

## II.5 ZEBRAFISH COME ORGANISMO MODELLO

Con la biologia molecolare si è evoluto il concetto di organismo modello come specie studiata ed utilizzata per comprendere particolari fenomeni biologici. Perché un organismo possa essere considerato modello, è necessario che risponda ad una serie di caratteristiche, le più comuni sono: le dimensioni, il tempo di generazione, l'accessibilità, la manipolazione, la genetica, la conservazione dei meccanismi ed un potenziale beneficio economico. A differenza di alcuni modelli classici della genetica, come *Drosophila* e il verme *Caenorhabditis*, che presentano evidenti limiti legati alla distanza evolutiva dall'uomo, *D. rerio* essendo un vertebrato, rappresenta un sistema modello molto più informativo della condizione umana. Le principali caratteristiche che rendono zebrafish un organismo modello per scopi di ricerca sono:

- le **ridotte dimensioni** dell'animale adulto (circa 3 cm di lunghezza), che rendono semplice ed economico l'allevamento di un gran numero di individui;
- **ciclo di vita breve**, la maturità sessuale è raggiunta in poco tempo (2-3 mesi);
- **rapido sviluppo embrionale**, si possono ottenere uova fecondate in tutte le stagioni mantenendo costante foto-periodo e termo-periodo (14 h di luce e 10 h di buio, a 28,5 °C);
- **buona riproduzione in condizioni di cattività**;
- **fecondazione esterna**, che permette di seguire agevolmente tutti gli stadi dello sviluppo embrionale mediante l'utilizzo di opportuni marcatori, o di monitorare ad ogni stadio l'espressione di specifici geni.;
- **uova otticamente trasparenti**, che permettono di monitorare le diverse fasi dello sviluppo embrionale;
- programma di **sviluppo conservato** con varie specie;
- **sequenziamento genomico** molto avanzato (ad oggi sono disponibili le sequenze di circa 32.000 trascritti).



Tutte queste caratteristiche, permettono di applicare numerose tecniche sperimentali durante tutte le fasi di sviluppo di *D. rerio*, rendendo interessante l'uso di questo pesce in diversi ambiti della biologia, dalla biochimica alla biologia comportamentale. In particolare molti geni dello sviluppo, responsabili di malattie congenite nell'uomo, possiedono una controparte in zebrafish. Il suo genoma è, infatti, sorprendentemente simile a quello umano nonostante i 450 milioni di anni di evoluzione che separano le due specie. Inoltre gli organi di questo pesce sono funzionalmente e morfologicamente simili a quelli dell'uomo e la crescente disponibilità di mutanti, favorisce l'identificazione dei geni responsabili di sindromi ereditarie e di predisposizioni genetiche di vario tipo (neuro degenerazioni e tumori). Zebrafish possiede inoltre delle similarità nelle vie di segnalazione cellulare e nei meccanismi fisiologici con i vertebrati di ordine superiore; in particolare condivide con l'uomo analogie sia nei pathways sensoriali (visione, tatto, olfatto, gusto, udito ed equilibrio) che nei geni (Barbazuk *et al.*, 2000). Inoltre *D. rerio* si sta affermando come un ottimo modello anche per studi comportamentali, volti a comprendere la relazione tra funzione dei geni e comportamento. Non ultime le applicazioni in ambito farmacologico, dove i limiti di modelli animali mammiferi sono superati dall'uso di altri sistemi modello, tra cui il pesce zebra, ormai largamente utilizzato per lo sviluppo di nuovi farmaci (Kari *et al.*, 2007).

## **II.6 USO DI ZEBRAFISH IN ECOTOSSICOLOGIA**

*D. rerio* è sempre più utilizzato come organismo modello per i test ecotossicologici, in particolare per determinare gli effetti di prodotti chimici sulla sopravvivenza della fauna marina, sulla crescita e sulla riproduzione (Dave *et al.*, 1981; Bresch *et al.*, 1990).

Il crescente utilizzo di composti bio-attivi quali farmaci, pesticidi, rifiuti industriali a cui sono correlati fenomeni di low-dose effects, giustifica la richiesta di test e l'utilizzo di

biomarkers con un alto potere predittivo. Poiché le prime fasi dello sviluppo embrionale sono particolarmente sensibili agli effetti negativi delle sostanze chimiche ed i tradizionali modelli animali in uso negli studi di tossicologia non ne consentono il loro studio, nuovi approcci sperimentali basati sull'analisi dell'espressione genica e di proteine sono stati sviluppati per valutare la tossicità delle sostanze chimiche (Heijne *et al.* 2005). Sebbene gli studi *in vitro* rappresentino un'alternativa molto importante per comprendere i meccanismi molecolari alla base della tossicità di tali composti, essi presentano dei limiti causati sia dalla scarsa disponibilità di linee cellulari adeguate o di colture primarie, che dalle condizioni di coltura che non mimano totalmente l'ambiente *in vivo*. Al contrario gli approcci sperimentali *in vivo*, che consentono anche la manipolazione genica, rappresentano il mezzo più sensibile per descrivere i meccanismi cellulari e molecolari alla base della tossicità di sostanze chimiche.

I pesci sono da tempo considerati ottimi bio-indicatori ambientali ed i cambiamenti morfologici, comportamentali e biochimici indotti dall'esposizione a diversi contaminanti, li rendono ottimi organismi per studiare le risposte che si possono innescare nell'organismo dopo l'input dello xenobionte (Au, 2004).

Tra gli organismi modelli indicati nelle linee guida degli studi eco-tossicologici, *D. rerio* è la specie più utilizzata in tutto il mondo. In particolare, sia gli embrioni sia le larve di zebrafish, rappresentano un'alternativa economica ed efficace per ridurre i problemi etici legati all'uso di altri animali da laboratorio e per determinare gli effetti di prodotti chimici sulla sopravvivenza, sulla crescita e sulla riproduzione della fauna marina (Dave *et al.*, 1981; Bresch *et al.*, 1990).

Nel corso degli ultimi anni, organizzazioni internazionali come l'OECD (organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico) e l'ISO (organizzazione internazionale per la normazione), hanno sviluppato diversi protocolli per la valutazione dell'ecotossicità, scegliendo zebrafish come organismo modello. Inizialmente, sono stati stabiliti protocolli

per la valutazione della tossicità acuta (OECD, 203 e l'OECD, 210), la crescita (OECD, 215) e gli effetti a breve termine sulle prime fasi di sviluppo embrionale e larvale (OECD, 212). Attualmente sono state apportate molte modifiche alle vecchie linee guida e sono stati proposti nuovi protocolli che includono endpoint più sofisticati per la valutazione dell'ecotossicità, rendendo il pesce zebra un consolidato modello per lo studio dell'ecotossicità di solventi, metalli pesanti, prodotti farmaceutici e pesticidi.

## **CAPITOLO III**

# **STRUTTURA, ULTRASTRUTTURA E FUNZIONALITÀ DELL'APPARATO BRANCHIALE DEI PESCI**

### **III.1 LE BRANCHE NEI PESCI**

Nelle diverse classi di Vertebrati a respirazione acquatica (Ciclostomi, Pesci e Anfibi allo stadio larvale), l'apparato branchiale è l'organo principale deputato agli scambi gassosi. Le branchie non svolgono però solo una funzione respiratoria ed in alcuni casi si assiste ad un'ulteriore specializzazione di tale struttura che può essere coinvolta nella regolazione osmotica e acido-base e/o nell'alimentazione.

All'interno della superclasse *Pisces*, la struttura e l'organizzazione dell'apparato branchiale risultano estremamente variabili. Differenze caratterizzano i taxa di rango inferiore, ma possiamo generalizzare descrivendo l'organizzazione nei Condroitti e negli Osteitti.

#### ***III.1a CONDROITTI***

Nella sottoclasse degli Elasmobranchi, il cranio viscerale è costituito da porzioni cartilaginee. La prima arcata cartilaginea è detta arcata mandibolare, la seconda ioidea, mentre quelle successive sono le arcate branchiali e possono essere 5 oppure 6. Il condotto spiracolare si colloca tra l'arcata mandibolare e l'arcata ioidea, le camere branchiali sono collocate tra l'arcata ioidea e la prima arcata branchiale e tra le arcate branchiali successive. Il condotto spiracolare non contiene strutture respiratorie, mentre ciascun'arcata branchiale è costituita da setti branchiali che raggiungono la superficie. I

setti branchiali sono rivestiti dalla lamina branchiale che rappresenta la struttura respiratoria e sono caratterizzati dai raggi branchiali, strutture bastoncellari cartilaginee che si inseriscono perpendicolarmente all'arcata branchiale. La lamina respiratoria è suddivisa in tante lamelle branchiali primarie quanti sono i raggi branchiali e da ciascuna lamella dipartono numerose lamelle secondarie. Le camere respiratorie sono protette da brevi processi scheletrici detti branchiostegi, che rappresentano un filtro che impedisce alle particelle alimentari di entrare nelle camere respiratorie. Nel caso degli Olocefali gli spiracoli non sono presenti, e le branchie risultano costituite da un'unica e ampia piega cutanea che, come un opercolo, riveste le 4 fenditure branchiali molto ravvicinate tra loro. Il meccanismo respiratorio nei pesci cartilaginei è determinato dal flusso di acqua che entra dalla bocca. Una volta che l'acqua è entrata nella bocca quest'ultima si chiude ed il pavimento della cavità orale si solleva per spingere l'acqua verso le branchie e farla poi uscire dalle fenditure branchiali (Kent, 1997).

### ***III.1b OSTEITTI***

Gli Osteitti sono caratterizzati da uno splancnocranio più complesso rispetto a quello dei Condroitti formato da nuovi elementi scheletrici di natura ossea. L'arcata mandibolare e quella ioidea sono costituite da un numero di diversi elementi spesso articolati mobilmente tra loro. Ciascun'arcata branchiale (5 per ciascun lato), è formata da più ossa denominate faringobranchiale, epibranchiale, ceratobranchiale, ipobranchiale e basibranchiale. L'osso basibranchiale connette tra loro le due arcate eterolaterali.

Lo spiracolo e la piega, sono sostituiti da una struttura analoga che risulta sostenuta da lamine ossee dette ossee opercolari. La comparsa degli opercoli è associata anche ad una diversa organizzazione della branchia. Le lamelle branchiali sono direttamente inserite nell'arcata branchiale, dando una caratteristica conformazione "a pettine". Da ogni arco

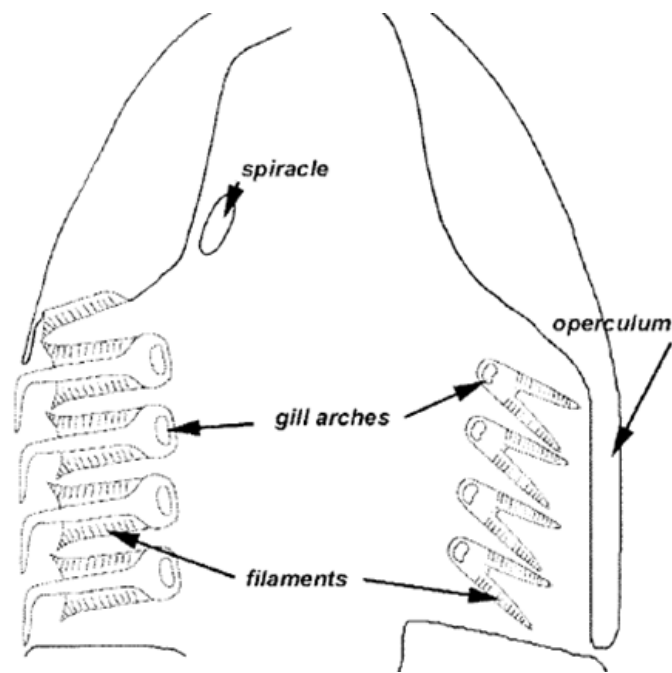
dipartono due serie di filamenti o lamelle che, a loro volta, sono caratterizzate da una doppia fila di lamelle secondarie. Internamente all'arco, il margine è invece dotato di una serie di branchiospine provviste di numerosi dentelli che costituiscono una sorta di filtro atto a bloccare le particelle di cibo o i corpi estranei che potrebbero danneggiare la branchia (Padoa, 1986). La diversa conformazione delle branchie nei pesci ossei è associata anche ad un diverso meccanismo respiratorio. Nei Pesci ossei, infatti, la respirazione si realizza in due tempi: una fase inalante, in cui gli opercoli si chiudono e la cavità boccale si dilata creando una pressione negativa che fa scorrere l'acqua sulle branchie ed una fase esalante, durante la quale la cavità boccale si contrae, la bocca rimane chiusa per impedire il reflusso dell'acqua che a sua volta viene con forza spinta alle branchie e fuoriesce attraverso le aperture opercolari.

Per quanto riguarda i meccanismi osmotici è doveroso fare una digressione sulle differenze tra i pesci ossei di acqua dolce e quelli marini. Gli Osteitti di acqua dolce sono iperosmotici rispetto all'ambiente esterno; la loro osmolarità è compresa tra 200 e 300 mOsm/L, mentre quella dell'acqua dolce è molto inferiore ai 50 mOsm/L. Per cui, questo tipo di pesci, si trovano nella condizione di dover fronteggiare il continuo ingresso di acqua dall'esterno e il relativo rigonfiamento, nonché la continua perdita di sali. L'accumulo di acqua è evitato rimuovendone l'eccesso attraverso la produzione di urina molto diluita, grazie anche ad un sistema renale ben sviluppato; il sistema renale, infatti, permette il riassorbimento di sali importanti come KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub> che altrimenti andrebbero persi. Tuttavia una minima parte è comunque persa attraverso le urine e quindi i sali sono integrati attraverso l'alimentazione. Mediante le branchie possono essere assorbiti, dall'esterno, ioni sodio e cloro anche quando nell'acqua la concentrazione di NaCl è molto bassa. Tale meccanismo di trasporto attivo richiede molta energia in quanto opera contro un gradiente di concentrazione elevatissimo (Liem *et al.*, 2012).

I pesci ossei marini invece sono iposmotici rispetto all'acqua di mare (gli elasmobranchi hanno fluidi leggermente iperosmotici rispetto all'ambiente esterno) e devono quindi fronteggiare una continua perdita di acqua ed un continuo ingresso di sali da smaltire. Per evitare tutto ciò, questi pesci, bevono acqua continuamente assumendo quindi grandi quantità di sali. I sali vengono eliminati in due fasi: inizialmente circa l'80% dell'acqua ingerita è assorbita a livello intestinale insieme a NaCl ed a KCl, ma si tratta già di acqua diluita in precedenza a livello dell'esofago (dove per diffusione vengono eliminati circa il 50% dei Sali). A livello del piccolo intestino si ha invece un assorbimento attivo di ioni monovalenti mediante un co-trasportatore  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ , mentre gli ioni bivalenti  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  sono escreti insieme all'acqua attraverso l'ano. Infine l'eccesso di  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e parte del  $\text{K}^+$ , sono eliminati dal sangue attraverso un altro meccanismo di trasporto attivo a livello delle branchie. Il sistema renale produce in questo caso un'urina isotonica rispetto al sangue ma ricca di ioni bivalenti che non vengono secreti attraverso le branchie (Randall *et al.*, 1999).

### **III.2 ANATOMIA GENERALE DELL'APPARATO BRANCHIALE DEI TELEOSTEI**

Nei pesci, le branchie sono bilateralmente situate su entrambi i lati della faringe e sono composte di una serie di strutture sacchetto-simili o arco-simili, che forniscono il supporto fisico per i delicati filamenti branchiali definiti anche lamelle primarie. Nello specifico, le branchie dei teleostei, sono composte di quattro archi branchiali completi portanti olobranchie ed uno, il primo, portante un'emibranchia (Fig. III.1). Gli archi branchiali sono distanziati da cinque fessure branchiali dette camere (Wilson and Laurent, 2002).

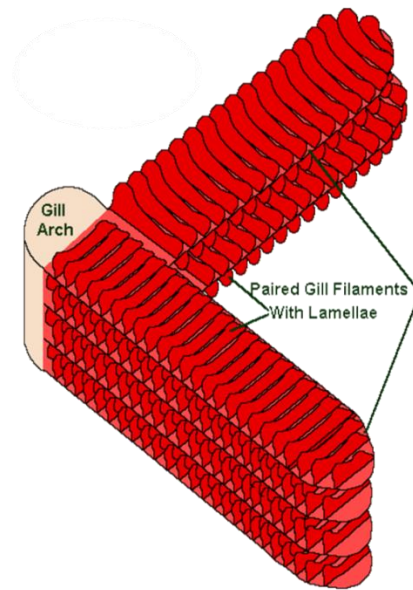


**Fig. III.1:** schematizzazione generale dell'apparato branchiale dei Teleostei.

Sopra l'emibranchia vi è la pseudobranchia, che è un'emibranchia ridotta presente nella maggior parte dei teleostei in associazione con gli spiracoli. Nei teleostei gli spiracoli si perdono ma la pseudobranchia rimane; essa non funziona durante gli scambi gassosi, ma riceve il sangue ossigenato dall'emibranchia (Wilson and Laurent, 2002).

Si inserisce sull'arco branchiale il filamento branchiale (o filamento principale), che è considerato l'unità funzionale della branchia poiché è dotato di un proprio sistema motore ed è sede dei principali siti di controllo vascolare. Il suo epitelio contiene cellule iono regolatrici ed inoltre dà da supporto alle lamelle secondarie. Le lamelle secondarie rappresentano l'unità respiratoria della branchia e si estendono da entrambi i lati del filamento principale, perpendicolarmente all'asse longitudinale del filamento principale (Fig. III.2).



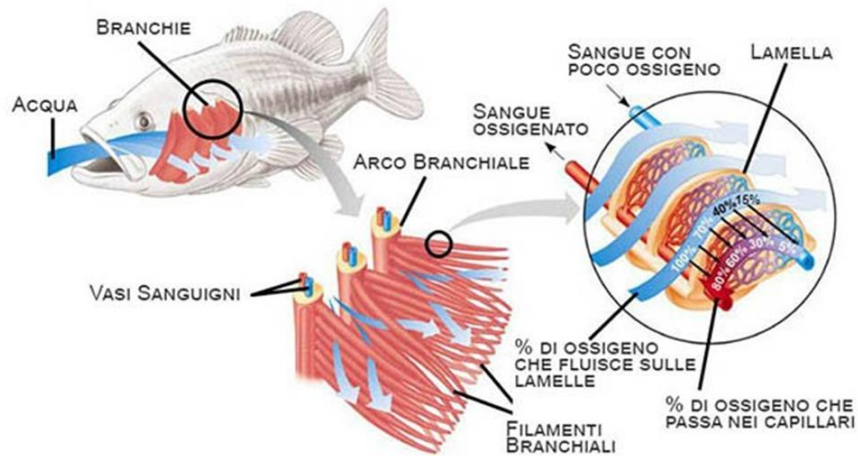


**Fig. III.2:** schematizzazione anatomica della branchia.

La frequenza delle lamelle secondarie, su ciascun lato del filamento principale, varia da 10 a 40 mm su ciascun lato e tende ad aumentare nelle specie più attive. L'acqua scorre attraverso fenditure che formano dei canali tra lamelle adiacenti. Questi canali sono larghi da 0,02 a 0,05 mm e lunghi da 0,2 a 1,6 mm mentre, le lamelle, sono alte da 0,1 a 0,5 mm circa. Ciò che ne consegue è che l'acqua fluisce in strati sottili tra le lamelle, che rappresentano la porzione respiratoria delle branchie (Eckert and Randall, 1991). Le lamelle respiratorie sono formate da due strati epiteliali separati da spazi attraverso i quali circola il sangue. La separazione tra i due strati è possibile grazie alla presenza di una serie di strutture portanti dette pillar cell o cellule a pilastro.

### III.3 VASCOLARIZZAZIONE DELL'APPARATO BRANCHIALE

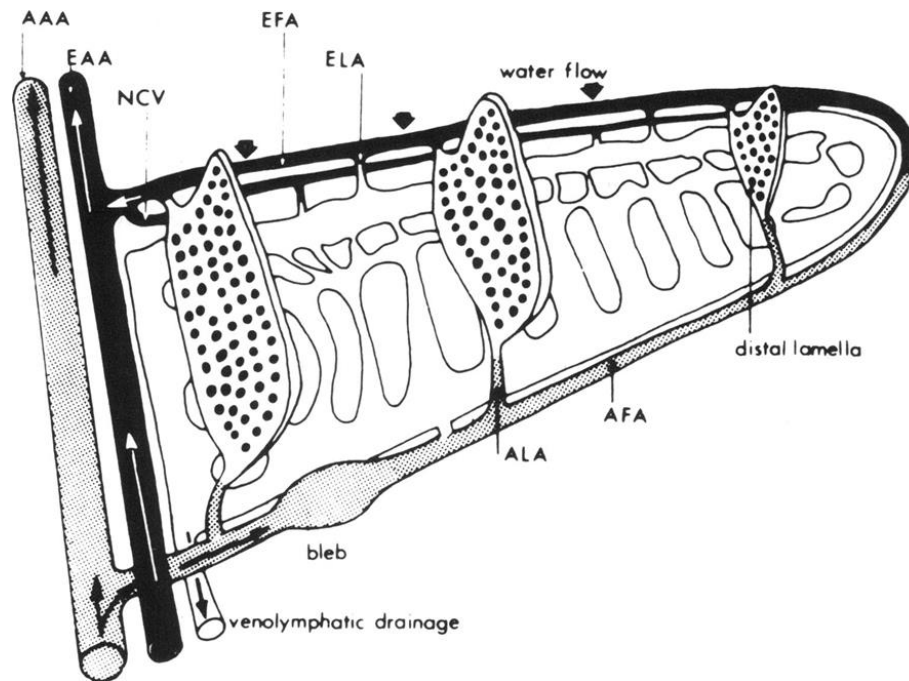
Le branchie dei pesci sono composte essenzialmente da un sistema vascolare molto articolato circondata da una zona di epitelio superficiale, che fornisce una barriera sottile tra il sangue del pesce e l'ambiente acquatico (Fig. III.3) (Evans *et al.*, 2005).



**Fig III.3:** schematizzazione vascolare dell'apparato branchiale dei Teleostei.

Nelle branchie, la rete di vasi sanguigni, è estremamente ricca e complessa. Il sangue pompato dal cuore e non ossigenato, viene energicamente spinto nel bulbo elastico e nell'aorta ventrale per poi passare velocemente nell'arteria branchiale, che ha il compito di distribuire il sangue a tutti gli archi branchiali. L'arteria branchiale si suddivide in arterie afferenti degli archi (o primarie) che irrorano i singoli filamenti. Dalle arterie afferenti dei filamenti, si dipartono piccole arterie secondarie afferenti (o arteriole) che alimentano la rete capillare delle lamelle secondarie. Lo spazio occupato dal sangue nei capillari delle lamelle secondarie, è mantenuto aperto dalle pillar cell, che sono cellule distribuite regolarmente e che occupano il 20% del volume interno della lamella. Dopo aver attraversato le lamelle, il sangue viene raccolto da un sistema identico di arterie efferenti:

si riversa nelle arteriole efferenti dei filamenti, passa in arterie efferenti degli archi e fluisce infine nell'aorta dorsale che consente al sangue ossigenato di rientrare in circolo (Fig. III.4).



**Fig. III.4:** schematizzazione della vascolarizzazione dell'arco branchiale nel filamento principale e nelle lamelle dei teleostei. (AAA) arteria afferente arco; (AFA) arteria afferente filamento; (ALA) arteria afferente lamellare; (EAA) arteria efferente arco; (EFA) arteria efferente filamento; (ELA) arteria efferente lamellare; (NCV) vaso nutritivo; (CVS) seno venoso centrale.

Le pareti delle arterie sono generalmente più spesse sul lato afferente a causa dell'alta pressione sanguigna che prevale in quest'area. In ciascun arco branchiale è presente la vena branchiale, connessa con la vena giugulare, che raccoglie il sangue delle piccole vene delle lamelle primarie. Il sistema vascolare delle lamelle primarie è caratterizzato dalla presenza di circuiti vascolari intercomunicanti, che costituiscono i sistemi artero-arteriosi e artero-venosi. Il sangue è trasportato nel sistema vascolare artero-arterioso dall'arteria branchiale all'arteria efferente, permettendo al sangue arterioso di passare nelle vie sistemiche. La funzione del sistema artero-arterioso è prettamente respiratoria. Il flusso

sanguigno nel filamento principale, è regolato da uno sfintere collocato attorno all'arteria efferente primaria che rappresenta il punto di giunzione con l'arteria branchiale (Evans *et al.*, 2005).

Il sistema artero-venoso è formato da un complesso intreccio di vene, che riportano il sangue direttamente al cuore, evitando così la circolazione sistemica (Evans *et al.*, 2005).

Le componenti del sistema artero-venoso formano due sistemi:

- il primo consiste di piccole arterie che prendono origine dalle arterie branchiali efferenti e da quelle primarie e sembra destinato ad esplicare funzioni nutritive;
- il secondo sembra apparentemente non avere funzione nutritiva ed è formato dal seno venoso centrale delle lamelle primarie, numerosi anastomosi artero-venose e dalle vie venose collettrici.

Il più importante è il seno venoso centrale (CVS), compartimento cavo di complessità variabile, collocato nel cuore e che si estende per tutta la lunghezza delle lamelle primarie (Evans *et al.*, 2005). Il CVS è rivestito da un epitelio sottile, minore di 0,1  $\mu\text{m}$ , povero di fibre muscolari ed elastina e con giunzioni cellulari libere. Tra questo epitelio e la membrana basale dell'epitelio, è presente uno strato di materiale collagene, circondato da una sottile lamina basale fibrosa. In tutti i pesci, il CVS e i suoi processi, sono connessi all'epitelio primario.

#### **III.4 L'INNERVAZIONE DELL'APPARATO BRANCHIALE**

I paraneuroni sono cellule sensoriali ed endocrine che in genere non vengono considerate neuroni ma condividono con essi struttura funzione e caratteristiche metaboliche con i neuroni sulla base della produzione di neuromodulatori o neurormoni.

Nel 1949 Fröhlic ha descritto per la prima volta queste cellule nell'epitelio respiratorio definendole "helle Zellen". La loro presenza è stata in seguito confermata da Feyrter nel

1954 il quale le definì come componenti del “sistema endocrino epiteliale diffuso” e attribuì a queste cellule una funzione paracrina. Le caratteristiche citologiche e funzionali delle cellule neuroendocrine nelle vie aeree sono state studiate principalmente con tecniche istologiche nei 40 anni successivi alla loro scoperta.

All'epoca le cellule endocrine che producevano amine/peptidi nel polmone erano definite come “paraneuroni broncopulmonari” e comprendevano sia cellule isolate che aggregati di cellule del tratto aereo (Fujita *et al.*, 1988). Le cellule isolate erano disperse tra le cellule epiteliali mentre aggregati di cellule fra i corpuscoli innervati chiamati corpi neuroepiteliali (NEBs). (Lauweryns and Peuskens, 1969, 1972; Lauweryns and Peuskens 1972).

Un gruppo distinto di cellule neuroendocrine (NEC) con funzione chemocettrice e/o paracrina è stato ritrovato nelle branchie e negli organi respiratori dei pesci e nelle branchie degli antichi pesci ossei tra i quali *Amia calva* (Goniakowska-Witalinska *et al.*, 1995).

Le cellule neuroendocrine si ritrovano nell'epitelio respiratorio sia come elementi singoli che in gruppo ma non formano cluster cellulari organoidi simili alle NEBs.

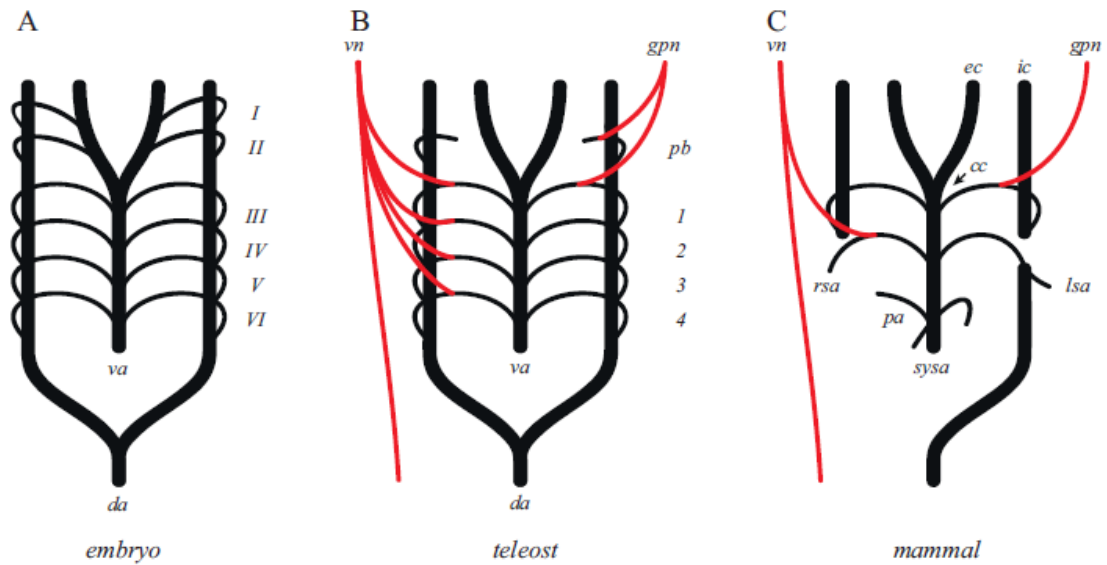
### ***III.4a L'OMOLOGIA DEI CHEMOCETTORI DELL'O<sub>2</sub> NEI VERTEBRATI***

L'ossigeno è fondamentale per la sopravvivenza di tutti gli organismi. Esso agisce come accettore finale di elettroni nella catena di trasporto degli elettroni mitocondriale, consentendo la sintesi di adenosina trifosfato (ATP), il quale a sua volta svolge un ruolo chiave nel mantenimento della omeostasi cellulare e in numerose vie metaboliche. Pertanto molti organismi superiori, come i vertebrati, hanno evoluto meccanismi altamente sensibili per monitorare i livelli interni ed esterni di ossigeno (O<sub>2</sub>). I vertebrati acquatici per soddisfare le loro esigenze metaboliche O<sub>2</sub> devono affrontare problemi maggiori rispetto ai vertebrati terrestri infatti mentre per questi ultimi una ridotta disponibilità di O<sub>2</sub> è associata a condizioni particolari come elevata altitudine, esercizio fisico, o condizioni patologiche, i

vertebrati acquatici vivono in un mezzo relativamente meno ricco di ossigeno. Pertanto, nei pesci l'ipossia rappresenta il principale fattore di stress ambientale e determina le risposte cardioventilatorie di compensazione (Milsom *et al.*, 2002).

Nel corso dell'evoluzione, nei vertebrati sono comparse una varietà di strategie per il rilevamento della concentrazione di ossigeno, sia sistemico che ambientale (Milsom and Burtleson, 2007). Nei mammiferi, il corpo carotideo (CB) è un organo ricco di cellule chemocentriche di tipo I (glomero) che rilevano variazioni della concentrazione di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> nel sangue. Nei pesci, le cellule neuroepiteliali (NEC) delle branchie rappresentano i chemocettori per tali molecole - O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> - e sono distribuiti all'interno di questo tessuto dove possono monitorarne sia i cambiamenti sistemici che ambientali. Le cellule neuroepiteliali (NEC) presentano analogie morfologiche, biochimiche e fisiologiche con le celle di tipo I e sono considerate i loro omologhi e precursori evolutivi.

I siti per il rilevamento della concentrazione di ossigeno nei vertebrati, dai pesci agli anfibi ai mammiferi, riflettono un'origine filogenetica comune. Nell'embrionale dei vertebrati, vi sono sei coppie di archi aortici che ricevono sangue dall'aorta ventrale, e ritornano alla circolazione sistemica attraverso l'aorta dorsale. I sei archi aortici si sono modificati nel corso dello sviluppo embrionale per formare modelli distinti allo stadio adulto, come illustrato nella Fig. III.5.



**Fig. III.5:** filogenesi degli archi aortici vertebrati, con innervazione associata dal glossofaringeo (*gpn*) e nervo vago (*vn*). (A) condizione embrionale, con sei archi aortici (I-VI) che collegano l'aorta ventrale (*va*) all'aorta dorsale (*da*). (B) nei Teleostei, il primo arco aortico è assente, il secondo viene modificato nella pseudobranchia non respiratoria (*pb*), e gli archi aortici III-VI diventano archi branchiali 1-4, rispettivamente. La *pb* ed il primo arco branchiale ricevono l'innervazione dal *gpn*, mentre tutti i quattro archi ricevono l'innervazione dal *vn*. (C) Nei mammiferi, l'aorta ventrale è modificata nella carotide comune (*cc*), che si biforca alla carotide esterna ed interna (*ec*, *ic*, rispettivamente). La *va* viene modificata per diventare sistema aortico (*sysa*). Il sito del corpo carotideo, il *cc*, riceve innervazione dal *gpn*.

Nei teleostei, la prima coppia di archi (I) degenera ed è assente, la seconda (II) viene modificata in una struttura non respiratoria nota come pseudobranchia, e le restanti quattro (III-VI) coppie di archi sono modificati per perfusione delle branchie (Jonz and Nurse, 2009). Gli archi branchiali sono quindi progettati per massimizzare la superficie di scambio respiratorio in ambiente acquoso. Essi danno luogo ad un sistema di filamenti primari e lamelle secondarie, dove le NEC sono sparse in tutto il sottile epitelio. Le branchie generalmente ricevono l'innervazione dai nervi cranici VII (facciale), IX (glossofaringeo), e X (vago) (Sundin and Nilsson, 2002).

Gli anuri Premetamorfici sviluppano branchie interne associate con gli stessi quattro archi aortici e nervi cranici dei pesci. Nonostante le significative differenze nella morfologia, anche le branchie degli anfibi allo stadio larvale, contengono le NEC (Saltys *et al.*, 2006).

Il sito primario di rilevamento dell'O<sub>2</sub> periferico nei mammiferi è il corpo carotideo (CB), situato alla biforcazione delle arterie carotidi (Lopez-Barneo *et al.*, 2008). Il CB è quindi omologo con il primo arco branchiale dei pesci. È ampiamente perfuso da una rete capillare ed innervato principalmente da fibre glossofaringee afferenti del nervo seno carotideo (Gonzalez *et al.*, 1994). Inoltre, il CB riceve innervazione da fibre efferenti che sono importanti nel mediare risposte inibitorie durante l'ipossia.

Il CB è composto da cellule chemocentriche di tipo I che derivano dalla cresta neurale (Pardal *et al.*, 2007). Questo concentrarsi delle cellule chemocentriche nel glomo carotideo nei mammiferi si differenzia dalla distribuzione diffusa delle NEC nelle branchie.

Probabilmente questa diversa disposizione è indicativa di una tendenza evolutiva verso il raggruppamento delle cellule O<sub>2</sub>-sensibili che passano da una distribuzione diffusa nelle branchie ad un singolo organo periferico e questo è verosimilmente associato al passaggio alla respirazione aerea propria dei vertebrati terrestri (Milsom and Burslem, 2007).

### ***III.4b LE CELLULE NEUROENDOCRINE NELLE BRANCIE DEI PESCI: MORFOLOGIA E LOCALIZZAZIONE NEI TELEOSTEI***

Nei Teleostei moderni le branchie rappresentano il principale organo respiratorio e numerose cellule neuroendocrine sono state ritrovate nell'epitelio branchiale. Cellule con caratteristiche ultrastrutturali ed immunocitochimiche simili a quelle ritrovate nelle vie aeree dei mammiferi sono state osservate per la prima volta nell'epitelio branchiale dei pesci da Dunel-Erb *et al.* (1982). Secondo questi autori le cellule neuroendocrine sono presenti esclusivamente nell'epitelio del filamento lungo il margine rivolto verso il flusso in ingresso dell'acqua.



Queste cellule vengono osservate sia singolarmente che organizzate in cluster in questa regione e probabilmente rappresentano un sistema disperso di recettori sensibili all'ipossia (Dunel-Erb, 1994).

Le cellule neuroendocrine descritte nelle branche di diverse specie di pesci, presentano una forma ovoidale o piramidale e sono state localizzate lungo i margini dei filamenti branchiali e alla base delle lamelle sebbene i cluster di cellule sono più frequenti nella porzione terminale del filamento (Zaccone *et al.*, 1992 a, b).

Questo tipo di cellula è stato descritto per la prima volta da Dunel-Erb *et al.* (1982) and Bailly *et al.* (1992) in diverse specie di Teleostei (*Oncorhynchus mykiss*, *Perca fluviatilis*, *Micropterus dolomieu*, *Ictalurus melas*, *Oreochromis mossambica*, *Dicentrarchus labrax*) e di alcuni condrostei (*Acipenser baeri* e *Scyliorhinus canicula*).

In alcune specie di pesci attraverso studi di microscopia elettronica e immunocitochimica le cellule neuroendocrine appaiono caratterizzate dalla presenza di numerosi piccoli corpi vescicolari elettrondensi di circa 80-100 nm e da un'innervazione intra epiteliale (Zaccone *et al.*, 1997). In queste specie inoltre, le NEC sono a contatto con la lamina basale mentre le vescicole elettrondense sono spesso concentrate nel citoplasma basale. Le cellule che non raggiungono la superficie epiteliale vengono definite come NEC closed-type (NE di tipo chiuso).

In molte specie di Teleostei le cellule neuroendocrine sia del filamento che delle lamelle, sono state identificate usando anticorpi contro la serotonina, la met-5-encefalina, la leu-5-encefalina (Zaccone *et al.*, 1992a), la calbindina DK28 (Zaccone *et al.*, 1992b), la calmodulina, la proteina S-100 (Fasulo *et al.*, 1997; Zaccone *et al.*, 1994, Zaccone *et al.*, 1995) così come l'endotelina (Zaccone *et al.*, 1996).

Cellule immunoreattive per neuropeptidi e per alcune proteine che legano il calcio sono prevalentemente di tipo aperto. Esse sboccano in superficie e sono a contatto con l'acqua

mentre la loro parte basale è a contatto con la componente vascolare. Inoltre si presume che questi due tipi di cellule (aperte e chiuse) possano avere funzioni diverse.

### ***III.4c LE CELLULE NEUROEPITELIALI COME CHEMOCETTORI DELL'O<sub>2</sub>: DISTRIBUZIONE E INNERVAZIONE***

Le cellule neuroepiteliali si trovano nella branchie all'interno di un sottile strato epiteliale che copre la porzione efferente dei filamenti e delle lamelle (cioè la parte rivolta verso il flusso in ingresso dell'acqua) e sono state osservate in tutte le specie di pesci studiate (Perry *et al.*, 2009). La loro collocazione nell'epitelio efferente pone le NEC in una posizione ottimale per rilevare i cambiamenti della pressione parziale di O<sub>2</sub> nell'acqua che passa sopra le branchie; tuttavia, data la loro vicinanza all'arteria efferente del filamento, tali cellule possono svolgere anche un ruolo come sensori interni della pO<sub>2</sub> arteriosa (Jonz and Nurse, 2006; Perry *et al.*, 2009).

Le cellule neuroepiteliali tipicamente contengono neurotrasmettitori, come la serotonina (5-idrossitriptamina o 5-HT) e vescicole sinaptiche (dense-core) in cui questi vengono immagazzinati (Fig. 2) (Dunel-Erb *et al.*, 1982; Perry *et al.*, 2009). Studi condotti su teleostei, come la trota, zebrafish e il pesce rosso, hanno dimostrato che le NEC sono strettamente accostate alle fibre nervose provenienti da diverse regioni (Dunel-Erb *et al.*, 1982; Bailly *et al.*, 1992; Jonz and Nurse, 2003; Bailly 2009). Il pattern di innervazione indica che le NEC formano sinapsi con fibre nervose catecolaminergiche con caratteristiche ultrastrutturali di nervi terminali afferenti o efferenti (Dunel-Erb *et al.*, 1982; Bailly *et al.*, 1992, Bailly 2009).

Questi nervi hanno i corpi cellulari localizzati all'interno dei gangli nervo-cranici. Un'ulteriore fonte di innervazione NEC comprende neuroni indolaminergici presenti all'interno dei filamenti branchiali che possono presentare anche terminali afferenti (Bailly

*et al*, 1992;. Jonz e Nurse, 2003; Bailly, 2009). Questi neuroni, a loro volta, formano sinapsi con un segmento contrattile dell'arteria del filamento suggerendo così l'esistenza di un meccanismo di controllo vascolare (Bailly *et al*, 1989;. Sundin, 1995; Jonz and Nurse, 2003). Inoltre, in zebrafish, esperimenti di denervazione su branchie espianate hanno dimostrato che le NEC dei filamenti sono innervate da neuroni serotoninergici intrinseci e da fibre nervose estrinseche, mentre le NEC lamellari ricevono solo le seconde (Jonz and Nurse, 2003).

Nel complesso, il significato funzionale di questi diversi modelli di innervazione NEC nelle branchie non è chiaro, ma probabilmente le NEC di entrambi, filamenti e lamelle, partecipano alla risposta riflessa all'ipossia, come l'iperventilazione. Le NEC del filamento possono inoltre controllare le risposte vascolari locali, come la vasocostrizione (Bailly, 2009; Jonz and Nurse, 2009).

### **III.5 GLI EPITELI BRANCHIALI DEI TELEOSTEI**

Secondo quanto riportato da Karlsson (1983), i filamenti principali e le lamelle secondarie dell'apparato branchiale dei Teleostei, sono ricoperti da uno strato epiteliale che risulta suddiviso in due regioni:

- un *epitelio primario* che ricopre l'arco branchiale ed il filamento principale;
- un *epitelio secondario* che ricopre le lamelle secondarie.

La distinzione tra i due epiteli non è basata esclusivamente sulla diversa collocazione, ma anche sulla differente composizione cellulare, di pattern di vascolarizzazione e di funzionalità. L'epitelio primario contiene i siti di controllo della perfusione vascolare, mentre l'epitelio secondario rappresenta la superficie deputata agli scambi gassosi.

### ***III.5a EPITELIO DEL FILAMENTO PRINCIPALE***

L'epitelio primario del filamento è pluristratificato e riveste oltre che i filamenti branchiali, le superfici anteriori e laterali (margini afferenti ed efferenti) degli archi branchiali e si prolunga tra le lamelle secondarie e per questo motivo viene spesso definito epitelio interlamellare. Esso è costituito da diversi tipi cellulari: *cellule pavimentose* (PVC), *cellule mucose* o *goblet cell* (MC), *cellule a cloruro* o *chloride cell* (CC) e *cellule basali* indifferenziate (BC) (Karlsson, 1983).

**-Cellula pavimentosa:** è una cellula superficiale e rappresenta il tipo di cellula più abbondante nell'epitelio del filamento principale poiché ne ricopre circa il 90% della superficie. Generalmente è una cellula squamosa a forma di parallelepipedo la cui superficie apicale è larga, poligonale e dotata di microcreste approssimativamente concentriche (Crespo *et al.*, 1981; Laurent, 1984; Olson, 1996; Wilson and Laurent, 2002). Le microcreste possono variare leggermente in forma e dimensione nelle diverse specie, ma solitamente hanno una lunghezza che varia da 5 a 15  $\mu\text{m}$  e una larghezza compresa tra 0,5 e 0,20  $\mu\text{m}$ .

Nella porzione superficiale il confine tra cellule pavimentose adiacenti non è sempre chiaramente definito ma, in molti casi, le microcreste che decorrono parallelamente al limite cellulare rendono il confine cellulare piuttosto marcato ed evidente (Wilson and Laurent, 2002). Le PVC hanno una bassa densità mitocondriale e sono dotate di membrana basolaterale non elaborata. Sono provviste dei tipici organelli citoplasmatici con un reticolo endoplasmatico rugoso ed un apparato del Golgi ben sviluppato (caratteristiche proprie di una cellula interessata da un'intensa attività metabolica). Le PVC sono solitamente unite tra loro mediante la presenza di desmosomi ed il citoplasma periferico contiene microfilamenti (Wilson and Laurent, 2002). Da un punto di vista funzionale possiamo dire che le PVC non sono il principale sito di trasferimento dei gas, ma giocano un ruolo importante e fondamentale nella regolazione acido base (Evans *et al.*, 2005).

**-Cellula mucosa o Goblet cell:** le cellule mucose sono grandi cellule ovoidali e devono il nome alla loro tipica forma tondeggianti, con un nucleo ed un citoplasma generalmente appiattiti localizzati in posizione basale. La visione del nucleo non è spesso possibile in quanto il citoplasma è ricco di granuli di secrezione che impediscono l'osservazione non solo del nucleo ma anche degli altri organuli citoplasmatici (Wilson and Laurent, 2002).

Questo tipo cellulare si ritrova prevalentemente lungo i margini afferenti ed efferenti del filamento primario, ma il numero ed il pattern di distribuzione varia in base alla specie; nella maggior parte dei casi sono disposte una di fianco l'altra nell'area non lamellare del filamento primario. Solo poche di queste cellule vengono rinvenute nell'area interlamellare dove prendono contatto con le CC. Diversi studi hanno dimostrato che il numero e la collocazione di questa popolazione cellulare sono estremamente variabili ed influenzati dalla salinità del mezzo acquatico fino a scomparire completamente nei Teleostei di acqua dolce come *Gambusia* e *Catla* (Ahuja, 1970).

Le Goblet cell non sono mai collocate nella superficie epiteliale in quanto sono sempre ricoperte dai lembi delle PVC, ma comunicano con le cellule pavimentose mediante un piccolo canale che permette il trasporto di sostanze mucose secrete verso l'esterno. Il ruolo delle cellule mucose non è ancora del tutto chiaro, ma si ritiene che possano essere attivamente coinvolte nell'osmoregolazione. Inoltre il fatto che esse siano più abbondanti nei pesci d'acqua dolce, fa pensare ad un presumibile ruolo di controllo nella perdita di ioni e nell'influsso di acqua.

**-Cellula a cloruro o chloride cell:** una delle caratteristiche principali dell'epitelio branchiale dei pesci è rappresentata dalla presenza delle CC, chiamate anche mitochondria-rich cell per il loro abbondante contenuto in mitocondri (Munshi and Dutta, 1996). Le cellule a cloruro tendono ad essere concentrati nella regione afferente dell'epitelio del filamento ed hanno un'intima associazione con la circolazione arteriosa, in particolare con

il seno venoso centrale, ma si ritrovano anche nell'epitelio di supporto dell'arco branchiale e nella regione interlamellare (Laurent, 1984; Munshi and Dutta, 1996; Olson, 1996).

Oltre ad essere state ritrovate nell'epitelio branchiale, le cellule a cloruro sono state rinvenute anche nella pelle dei pesci (Nonnotte and Kirsch 1978), nelle pseudobranchie (Laurent and Dunel-Erb, 1984); in aree extraranchiali (Wilson and Laurent, 2002) e nell'epitelio opercolare (Karnaky *et al.*, 1984). Le CC presentano solitamente dimensioni maggiori rispetto agli altri tipi cellulari dell'epitelio del filamento e possiedono un sistema estremamente complesso di tubuli che si aprono verso la membrana baso-laterale. Il sistema tubulare si estende attraverso l'intero citoplasma eccetto che nell'area del Golgi ed in una porzione ristretta situata al di sotto della superficie apicale delle CC (Pisam and Rambourg, 1991). Questo complesso sistema di membrane plasmatiche baso-laterali è ricco in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi in intensa attività (Jurss and Bastrop, 1995), al contrario la membrana plasmatica apicale e quella vescicolare di secrezione, mostrano una reazione istochimica debole per lo stesso enzima (Hootman and Philpott, 1979).

È importante sottolineare che il termine 'cellula a cloruro' si riferisce all'importante funzione di questo tipo cellulare nell'eliminazione del cloro ( $\text{Cl}^-$ ), mentre la presenza dei numerosi mitocondri nel citoplasma cellulare si pensa possa servire per fornire energia (ATP) per le proteine di trasporto ionico, nonché per guidare il trasporto vettoriale di ioni come parte della regolazione acido base (Wilson and Laurent, 2002).

**-Cellula basale:** gli strati basali e intermedi dell'epitelio contengono cellule che sono caratterizzate da un elevato rapporto di nucleo rispetto al citoplasma. Queste cellule appaiono indifferenziate e servono da cellule progenitrici per le altre cellule epiteliali differenziate (PVCs e CCs) (Wilson and Laurent, 2002). Infatti, essendo i filamenti principali a contatto con un flusso continuo e spesso energetico di acqua, le cellule degli strati epiteliali più superficiali sono spesso soggette a stress particolarmente intensi che possono causare il danneggiamento, oppure il distacco, degli strati cellulari sottostanti.

Tuttavia, il numero totale delle cellule dell'epitelio branchiale rimane costante a dimostrazione del fatto che, le perdite cellulari, sono compensate dalla produzione di nuove cellule. È avanzata pertanto l'ipotesi dell'esistenza di un turnover cellulare, alimentato dallo strato di cellule basali non differenziate dell'epitelio. Nei Teleostei, in particolare, la mitosi delle cellule indifferenziate è più comune nell'epitelio del filamento rispetto all'epitelio lamellare (Wilson and Laurent, 2002).

Le cellule non differenziate, condividono alcune caratteristiche comuni con le PVCs come: la presenza di reticolo plasmatico rugoso, di lisosomi, di vescicole e di vacuoli, ma rispetto alle PVCs sono più abbondanti in ribosomi liberi. Spesso si ritrovano i desmosomi tra cellule non differenziate e le cellule pavimentose, mentre gli emidesmosomi, collegano le cellule basali indifferenziate alla lamina basale di ancoraggio dell'epitelio (Wilson and Laurent, 2002).

### ***III.5b ORGANIZZAZIONE DELL'EPITELIO LAMELLARE***

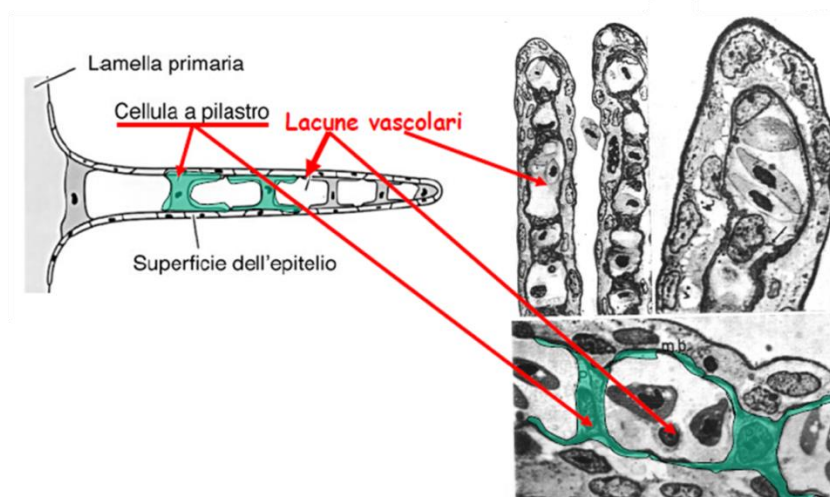
Le lamelle secondarie dell'apparato branchiale di zebrafish, hanno uno spessore di 7  $\mu\text{m}$  e un'altezza massima di 90  $\mu\text{m}$  e consistono essenzialmente di due strati epiteliali che poggiano su una lamina basale ben sviluppata (Bietrix, 1894). Ogni strato epiteliale, è costituito da cellule appiattite con uno spessore di 0,5-2,5  $\mu\text{m}$  e collegate tra loro da giunzioni strette e da desmosomi (Karlsson, 1983).

Lo *strato epiteliale più esterno* delle lamelle è detto mucosale o apicale ed è costituito prevalentemente da cellule pavimentose dotate di un apparato del Golgi ben sviluppato, un abbondante reticolo endoplasmatico rugoso e numerose vescicole di secrezione di differenti dimensioni. Probabilmente la funzione di questo strato epiteliale, è quella di costituire una barriera impermeabile all'acqua ed agli ioni (Hughes, 1979). La membrana plasmatica delle cellule che compongono lo strato apicale forma un sistema di microcreste

spesso ricoperto da muco, che può conferire alla superficie un aspetto sfocato (Karlsson, 1983).

Lo *strato epiteliale più interno* dell'epitelio lamellare, è detto strato basale o sierosale ed è costituito da cellule poco o niente affatto differenziate che sono a diretto contatto con la lamina basale. Presumibilmente, la funzione di questo strato cellulare, è quello di sostituire le cellule superficiali così come accade con le cellule basali dell'epitelio del filamento. Solo occasionalmente questo tipo cellulare si differenzia nelle CCs (Laurent and Perry, 1991).

L'*epitelio secondario* delle lamelle è essenzialmente limitato alla lamina basale che è di circa 50 nm di spessore. La lamina basale a sua volta è addensata sopra i corpi cellulari delle *cellule a pilastro*. La cellula a pilastro (o pillar cell) è un tipo modificato di cellula endoteliale dotata di una spiccata attività contrattile che delimita le lacune vascolari delle lamelle secondarie e rappresenta, di fatto, la cellula respiratoria (Fig. III.6).



**Fig. III.5:** localizzazione delle cellule a pilastro.

La pillar cell è un tipo di cellula unica dell'apparato branchiale dei pesci e conferisce alle lamelle un aspetto a stringa di perle se visto in sezione trasversale (Karlsson, 1983). La



contrazione delle pillar cells determina una riduzione del lume del capillare e quindi l'entità del flusso ematico a livello lamellare, può essere regolato secondo le richieste metaboliche.

# CAPITOLO IV

## IL FEGATO NEGLI ORGANISMI ACQUATICI

### PREMESSA

La struttura del fegato dei vertebrati è stata ampiamente studiata nel corso dei secoli ed al momento sono riconosciuti due modelli di struttura per tale organo.

Il primo modello, caratteristico del fegato dei mammiferi, è chiamato 'modello a lobulo'. Ogni lobulo rappresenta l'unità funzionale del fegato ed è descritto come una struttura esagonale con un tratto portale agli angoli dell'esagono e con le venule centrali epatiche poste al centro. Gli epatociti sono cellule poligonali di forma irregolare che si dispongono su uno oppure due strati cellulari, che anastomizzano tutto il fegato (Elias and Bengelsdorf, 1952). Ogni tratto portale è composto di una vena, da un'arteria epatica radiale e da uno o due dotti biliari inter-lobulari. Il sistema biliare sorge all'interno del lobulo epatico; la bile entra nell'albero biliare attraverso i canalicoli che sono contigui ai canali di Hering. I canali di Hering si uniscono ai dotti biliari interlobulari che a loro volta si uniscono ai condotti più grandi all'interno del fegato e che trasportano la bile al dotto biliare comune, alla cistifellea ed in ultima analisi all'intestino.

Il secondo modello, che descrive il fegato dei vertebrati inferiori, è indicato come un 'modello a tubulo'. In questo caso in sezione longitudinale, due file di epatociti formano il lume del tubulo o passaggio biliare a livello della membrana apicale degli epatociti, mentre la membrana basale confina con lo spazio sinusoidale. La bile secreta dagli epatociti entra nei condotti centrali attraverso i canalicoli che poi si uniscono ai grandi dotti che trasportano la bile al sistema biliare extraepatico ed alla cistifellea. In questo modello, i

rami della vena porta e della vena epatica sono indistinguibili l'uno dall'altro (Hinton and Couch, 1998).

E' ampiamente ritenuto che quest'ultimo modello sia presente in tutti i vertebrati embrionali e che l'unica differenza tra i vertebrati superiori e quelli inferiori è che il fegato dei primi cambia la sua architettura, da una struttura tubolare ad una a muraglia, che negli uomini tende a completarsi all'età di 5 anni (Arias, 1988).

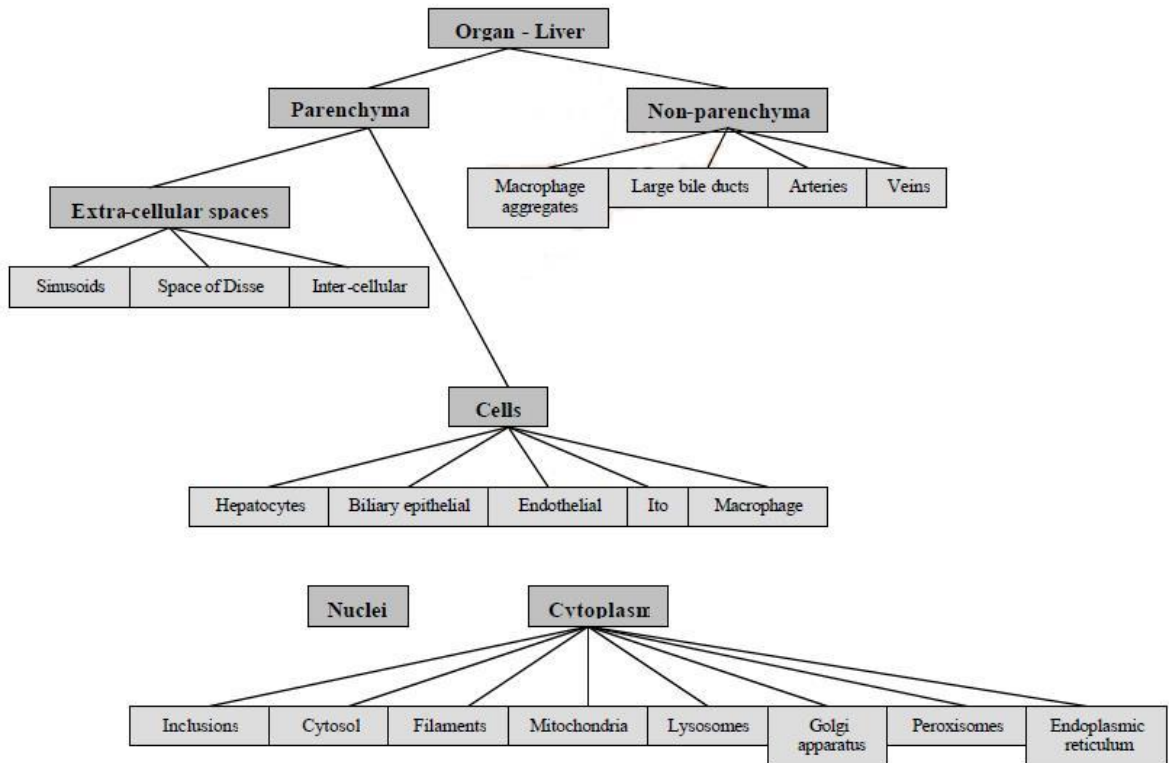
Il fegato di varie specie di pesci è stato studiato ampiamente, dando luogo ad una serie di discrepanze nella descrizione della struttura epatobiliare di diverse specie (Tanuma, 1980; Hampton *et al.*, 1985; Robertson and Bradley, 1992; Rocha *et al.*, 1994). Hardman *et al.* (2007) utilizzando una ricostruzione tridimensionale, studiarono l'architettura del fegato di *Oryzias latipes* e scoprirono che il sistema biliare intraepatico del fegato del pesce del riso era costituito da una rete interconnessa di canalicoli e pre-dotti biliari, molto più complessa di quella osservata in altri vertebrati inferiori.

Per quanto riguarda gli studi sul fegato di zebrafish, la maggior parte, sono concentrati sullo studio dello sviluppo del fegato durante l'embriogenesi (Field *et al.*, 2003; Wallace and Pack, 2003; Kikuchi *et al.*, 2004; Lorent *et al.*, 2004; Chu and Sadler, 2009) mentre pochi studi si interessano della morfologia (Peute *et al.*, 1978). Lorent *et al.* (2004) hanno sostenuto che la struttura del fegato di *Danio rerio* è analoga a quelli del fegato dei vertebrati inferiori e perciò in contrasto con le osservazioni fatte in *Oryzias latipes*.

#### **IV.1 CARATTERISTICHE DEL FEGATO DEI TELEOSTEI**

Secondo Hinton e Lauren (1990), il fegato è composto di due compartimenti: il parenchima e lo stroma. Il parenchima comprende le cellule situate all'interno del fegato e i sinusoidi,

mentre lo stroma comprende i dotti biliari, le vene, le arterie epatiche ed il tessuto connettivo (Fig. IV.1).



**Fig. IV.1:** stratificazione strutturale del fegato dei Teleostei.

Nei pesci, il fegato, è un organo denso collocato ventralmente nella regione cranica della cavità generale. La dimensione, la forma ed il volume di questo organo sono adattati allo spazio disponibile tra gli altri organi viscerali (Brusle and González I Anadon, 1996). Come in altri vertebrati, l'organizzazione vascolare di questo organo consiste in due vasi sanguigni afferenti (arteria epatica e vena porta) e un solo vaso efferente (vena epatica), che si trova nei pressi dell'ilo (Munshi and Dutta, 1996).

Il fegato riceve un doppio apporto di sangue attraverso la vena porta (sangue venoso) e l'arteria epatica (sangue arterioso); l'arteria epatica e la vena porta arrivano al fegato tramite la fessura epatica e poi si diramano in ramificazioni più piccole (Damjanov, 1996).

Dai piccoli rami della vena porta, il sangue venoso e quello arterioso, entrano nei sinusoidi in cui avvengono gli scambi tra il sangue e gli epatociti. Dai sinusoidi, il sangue drena in una sottile parete terminale o nella vena centrale, che a sua volta entra nella vena sottolobulare e che infine convoglia il sangue nella vena epatica (Ross *et al.*, 1989).

## ***IV.2 IL PARENCHIMA EPATICO***

### ***IV.2a GLI EPATOCITI***

Gli epatociti rappresentano circa l'80% della popolazione cellulare del fegato e svolgono la maggior parte delle funzioni attribuite a quest'organo. Gli epatociti, nel fegato dei pesci, sono disposti come tubuli o cordoni (Hampton *et al.*, 1988; Shore and Jones, 1989) ed al loro interno è possibile distinguere due facce: la faccia basale rivolta verso i sinusoidi deputata all'assorbimento (Hampton *et al.*, 1985; Schär *et al.*, 1985; Robertson and Bradley, 1991) e la faccia apicale, rivolta verso i canalicoli biliari, deputata all'escrezione (Hampton *et al.*, 1985; Schär *et al.*, 1985; Robertson and Bradley, 1991). Gli epatociti sono cellule poligonali, che appaiono esagonali (Geyer, 1989), spesso debolmente basofili nei vertebrati rispetto a quelli presenti nei mammiferi.

### ***IV.2b LE CELLULE DI ITO***

Le cellule di Ito, conosciute anche come cellule stellate epatiche o cellule immagazzinatrici di grasso, sono di forma variabile per lo più allungata e ricche di ribosomi liberi. Secondo Munshi e Dutta (1996), queste cellule di solito contengono una grande quantità di gocce lipidiche che rappresentano depositi di vitamina A (Sakano and Fujita, 1982; Fujita *et al.*, 1986).

#### ***IV.2c LE CELLULE DI KUPFFER ED I MACROFAGI***

Le cellule di Kupffer sono caratterizzate da attività fagocitaria (Munshi and Dutta, 1996), hanno un nucleo a forma di fagiolo e citoplasma abbondante con estensioni a forma di stella (Wisse and Knook, 1977). Il loro citoplasma contiene organelli tipici dei fagociti e spesso frammenti di globuli rossi e ferro in forma di ferritina, indicativi del ruolo delle cellule nella ripartizione dei globuli rossi (Ross *et al.*, 1989). Nei pesci è molto comune una categoria speciale di macrofagi, i melano-macrofagi (MM) (Munshi and Dutta, 1996), le cui dimensioni, numero e contenuto, possono essere estremamente variabili e correlate alla specie, all'età ed allo stato di salute dell'organismo (Agius, 1980). Solitamente si trovano nelle vicinanze delle arterie epatiche, della vena porta o dei dotti biliari e sono concentrati come centri melano-macrofagi (MMC–melano macrophage centers). Essi contengono materiali eterogenei quali lipofuscina, melanina o emosiderina (Munshi and Dutta, 1996).

#### ***IV.2d LO SPAZIO DI DISSE***

Lo spazio perisinusoidale o spazio di Disse, è una zona di rapido scambio intercellulare e si trova tra l'endotelio sinusoidale e gli epatociti. Nei pesci, lo spazio di Disse, è di grandi dimensioni e ben sviluppato; i microvilli dell'epatocita si proiettano in esso e amplificano di molto l'area di scambio sanguigno dell'epatocita. Lo spazio di Disse contiene plasma, poco tessuto connettivo, cellule perisinusoidali e cellule di Ito (Sternberg, 1997).

#### ***IV.2e I SINUSOIDI***

Tra i cordoni degli epatociti si estende una rete tridimensionale di sinusoidi sanguigni dalla forma cilindrica (Elias and Bengelsdorf, 1952). Il sinusoidale è un vaso dilatato e irregolare, il cui spessore è maggiore del diametro dei capillari. Il lume sinusoidale nei pesci è limitato

da un endotelio fenestrato e continuo in cui non è presente la lamina basale. Si compone di cellule appiattite che presentano un nucleo ovoidale e piatto ed un citoplasma molto povero di organelli, ma ricco di microfilamenti (Brusle and González I Anadon, 1996). Grazie alla presenza di fenestrazioni nell'endotelio ed alla mancanza di lamina basale, i metaboliti plasmatici riescono ad attraversare facilmente la barriera emato-encefalica degli epatociti (Ferri and Sesso, 1981).

#### ***IV.2f LE CELLULE ENDOTELIALI***

Le cellule che rivestono i sinusoidi includono cellule endoteliali, le quali hanno un citoplasma sottile ed indistinto e nuclei piccoli dalla forma allungata di colorazione scura e senza nucleolo.

#### ***IV.3 NON-PARENCHIMA***

##### ***IV.3a I DOTTI BILIARI***

I dotti biliari accompagnano l'arteria epatica e la vena porta, mentre queste ultime attraversano il fegato (Sternberg, 1997). I dotti biliari, l'arteria epatica e la vena porta formano quella che è denominata "triade portale".

In quasi tutti i Teleostei la triade non ha confini netti e precisi, di conseguenza quando si fa riferimento al fegato dei pesci, è più corretto utilizzare il termine "regione portale" (Munshi and Dutta, 1996). I dotti biliari sono alimentati dalle arterie epatiche attraverso un complesso peri-biliare costituito da un plesso di capillari che riforniscono tutte le strutture all'interno degli spazi portalì. La bile che si forma negli epatociti, è costantemente secreta nei canalicoli biliari per giungere infine ai dotti biliari intra ed extra-epatici (Sternberg, 1997).

#### ***IV.3b LE ARTERIE E LE VENE***

Nei pesci le vene centrali si trovano distribuite in tutto il parenchima epatico (Munshi and Dutta, 1996). Le arterie epatiche differiscono dalle vene per lo stretto lume, per la parete più spessa e più ricca di fibre elastiche e per le cellule endoteliali che sono generalmente più voluminose rispetto a quelle presenti nelle vene (Munshi and Dutta, 1996).



# CAPITOLO V

## MATERIALI E METODI

### V.1 PROVENIENZA DEL MATERIALE E MANTENIMENTO IN LABORATORIO

Gli esemplari di *D. rerio* utilizzati per l'esperimento (lunghezza  $3.63 \pm 0.05$  cm; peso  $0.43 \pm 0.06$  g;  $n=12$ ), sono stati acquistati presso un rivenditore locale di pesci ornamentali. Prima dell'esperimento i pesci sono stati posti in due acquari da 80 litri, muniti di sistema di filtraggio e di aeratori, contenenti acqua di rubinetto precedentemente dechlorata, al fine di garantire una giusta procedura di acclimatazione (15 giorni). Per evitare l'insorgere di eventuali squilibri o alterazioni dovuti a fluttuazioni dei parametri chimico fisici dell'acqua, questi ultimi sono stati mantenuti costanti e sono stati misurati quotidianamente, per tutta la durata degli esperimenti (Tab. V.1). Durante il periodo di acclimatazione i pesci sono stati alimentati ogni 2 giorni con mangime commerciale per pesci.

PARAMETRO	VALORE
Temperatura	$25 \pm 0.5$ °C
Ossigeno disciolto	5,0 – 6,5 mg/L
pH	$7,3 \pm 0,2$
Conduttività	407 $\mu$ S/cm

**Tab. V.1:** caratteristiche chimico fisiche delle acque di mantenimento di Zebrafish.

## V.2 DISEGNO SPERIMENTALE

Al fine di valutare gli effetti morfo-funzionali dell'esposizione a cloruro di mercurio sul fegato di zebrafish, gli esemplari sono stati esposti per 96 ore, in un sistema statico, a due concentrazioni di cloruro di mercurio (HgCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA):

- 7.7 µg/L
- 38.5 µg/L

Le concentrazioni testate corrispondono rispettivamente al 10% e al 50% della concentrazione letale media a 96 h (LC50<sub>96</sub>) (Vutukuru and Basani 2013).

Per ogni unità sperimentale, 14 animali di dimensioni del corpo simili, sono stati scelti in modo casuale e posti in acquari di vetro (30 L) costantemente aerati; gli animali del gruppo di controllo sono stati tenuti in acqua di rubinetto invecchiata. Durante tutta la durata dell'esperimento, gli esemplari non sono stati alimentati e la temperatura, il fotoperiodo (12/12-h luce-buio) e l'aerazione, sono stati mantenuti nelle stesse condizioni utilizzate durante la fase di acclimatazione. Ogni trattamento è stato condotto in duplicato.

Il prelievo delle branchie e del fegato è stato eseguito dopo 96 h di trattamento e parallelamente sono stati prelevati gli stessi organi degli animali di controllo per l'indispensabile confronto tra le condizioni basali e le condizioni sperimentali. I pesci sono stati anestetizzati con MS 222 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). I campioni di tessuto sono stati successivamente processati per l'osservazione al microscopio ottico (MO) microscopio elettronico a scansione (SEM), microscopio elettronico a trasmissione (TEM), microscopio confocale e per le analisi molecolari di real time PCR (RT-PCR) ed ibridazione *in situ*.

## **V.3 ALLESTIMENTO DEI PREPARATI PER MO, TEM E SEM**

### ***V.3a PRELIEVO***

Il prelievo delle branchie e del fegato è stato eseguito prestando la massima attenzione per evitare traumi meccanici ai tessuti utilizzando forbici e bisturi perfettamente puliti. Per allontanare dalla superficie del campione eventuali tracce di materiale extracellulare, questo è stato pulito con una soluzione tampone utilizzata anche durante la successiva fase di fissazione. Le dimensioni finali dei campioni sono state, come di norma, quelle compatibili con una buona penetrazione degli agenti chimici.

### ***V.3b FISSAZIONE***

La fase di fissazione del campione rappresenta la prima fase di modificazione artificiale dell'ambiente cellulare: evita che le strutture cellulari possano andare incontro a processi degenerativi, arresta le attività metaboliche della cellula ed immobilizza tutti i componenti molecolari e macromolecolari. I campioni sono stati sottoposti ad una fissazione primaria aldeidica seguita da una post-fissazione in tetrossido di osmio. Nel nostro protocollo la prima fissazione è stata eseguita per immersione diretta, utilizzando la glutaraldeide al 4% (Electron Microscopy Scienze, Hatfield, PA, USA veicolata da tampone fosfato monobasico e bibasico di sodio (PBS 0,1 M, pH 7.2) per 48 ore a 4°C. Il vantaggio nell'utilizzare come fissativo la glutaraldeide, è che essa garantisce una stabilizzazione sufficientemente rapida da evitare un'estrazione delle componenti cellulari da parte del veicolo. Per la post-fissazione è stato utilizzato il tetrossido di osmio all'1%, veicolato sempre da un tampone fosfato. Come soluzione di lavaggio (tra le due fissazioni e al termine della seconda fissazione) è stato utilizzato nuovamente il tampone fosfato, in quanto ha il vantaggio di avere una composizione chimica simile a quella dei fluidi extracellulari.

### ***V.3c DISIDRATAZIONE***

Lo scopo della disidratazione è quello di allontanare dal campione tutti i liquidi presenti. Gli agenti disidratanti sono solventi organici ad elevata forza e, per questa ragione, è inevitabile un certo grado di coartazione ed estrazione dei costituenti cellulari.

Al fine di evitare il fenomeno dell'estrazione di componenti cellulari, la disidratazione deve essere effettuata in modo graduale e nel minor tempo possibile, in relazione al tipo di tessuto ed alle sue dimensioni. L'agente disidratante da noi utilizzato è l'etanolo (Tab. V.2).

<b>SCHEMA DI DISIDRATAZIONE</b>	
Etanolo 30%	1 passaggio da 10 min
Etanolo 50%	1 passaggio da 10 min
Etanolo 70%	1 passaggio da 10 min
Etanolo 90%	1 passaggio da 10 min
Etanolo 100%	2 passaggi da 10 min

**Tab. V.2:** schema di disidratazione.

Le fasi di allestimento del campione descritte fino a questo punto sono comuni sia al protocollo per la microscopia ottica, microscopia elettronica a trasmissione e microscopia elettronica a scansione. Le fasi successive sono invece specifiche per ciascuna tecnica.

### ***V.3d INFILTRAZIONE ED INCLUSIONE (MO E TEM)***

Nella fase di infiltrazione, i liquidi devono essere sostituiti con un solvente organico compatibile con la resina utilizzata nella fase di inclusione. Dopo aver concluso la disidratazione del campione, infatti, si sostituisce l'alcool con l'ossido di propilene. A sua volta tale sostanza deve essere sostituita dal mezzo di inclusione che consiste in monomeri di resine sintetiche, di ridotte dimensioni, capaci di impregnare completamente il tessuto. Nel nostro studio è stata utilizzata una resina epossidica (Araldite 502 / Embed 812, Electron Microscopy Sciences), che viene fatta polimerizzare ottenendo il blocchetto di inclusione. Le operazioni di inclusione sono state eseguite tramite l'utilizzo del processatore, mentre la polimerizzazione è stata condotta in stufa a 60°C per due giorni (Tab. V.3).

<b>SCHEMA DI INFILTRAZIONE ED INCLUSIONE</b>	
Ossido di propilene	2 passaggi da 15 min
Misto ossido di propilene-resina (1:1)	2 h
Resina	1 passaggio da 6-12 h
	1 passaggio da 3 h
Inclusione	24-48h a 60°C

**Tab. V.3:** schema di infiltrazione ed inclusione.

### ***V.3e SEZIONAMENTO E COLORAZIONE (MO E TEM)***

Prima di procedere con il sezionamento è stata effettuata l'operazione di "trimming", che consiste nella rimozione della resina superflua finché non si ottiene un blocco avente la

forma di un tronco di piramide, con la faccia superiore a forma di trapezio/rettangolo orientato in modo che la superficie di taglio risulti parallela alla lama. Il blocco così ottenuto viene montato sul braccio dell'ultramicrotomo che oscillando determina il taglio delle sezioni. I campioni inclusi in resina sono stati sezionati utilizzando l'ultramicrotomo modello Leica Ultracut UCT; lo spessore delle sezioni semifini destinate alla microscopia ottica è di 1  $\mu\text{m}$  mentre quello per le sezioni ultrasottili destinati alla microscopia elettronica a trasmissione è di 800 Å.

Le sezioni semifini ottenute, sono state colorate utilizzando il blu di toluidina (toluidina 1% in borato 2%) e successivamente osservate e fotografate mediante LM LEITZ Dialux EB 20 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania), mentre le sezioni ultrasottili sono state adagiate su apposite griglie (o retini) e sottoposte a contrastazione. Durante la fase di contrastazione, le sezioni ultrasottili vengono trattate con l'uso di metalli pesanti in grado di fissarsi selettivamente alle differenti strutture sub-cellulari, con conseguente aumento dello scattering con il fascio elettronico del microscopio elettronico. Nello specifico, le sezioni subiscono un doppio trattamento con acetato di uranile e citrato di piombo in soluzione al 2%: i sali di uranio si fissano agli acidi nucleici evidenziando la cromatina nucleare ed i ribosomi mentre, i sali di piombo, potenziano l'azione dell'osmio e dell'uranio delineando l'ultrastruttura cellulare. I retini sono stati osservati e fotografati mediante l'uso di un microscopio elettronico a trasmissione JEOL 1011 (JEOL, Inc., Peabody, MA, USA).

### ***V.3f ESSICCAMENTO (SOLO PER SEM)***

La fase di essiccamento consiste nell'allontanamento dei fluidi residui presenti nel campione (acqua e solventi utilizzati durante la disidratazione), per preparare il campione alle successive fasi di ricopertura e di osservazione.

### ***V.3g MONTAGGIO (SOLO PER SEM)***

I campioni essiccati vengono montati su appositi supporti detti stub, in modo da garantire la formazione di un unico sistema capace di realizzare le richieste condizioni di conducibilità elettrica e di stabilità chimico fisica. Il campione viene fissato allo stub mediante nastro adesivo oppure colla d'argento; l'adesivo deve resistere all'azione termica dei processi di metallizzazione e di osservazione sotto vuoto, senza modificare la propria composizione e deve possedere capacità interferenziali minime.

### ***V.3h RICOPERTURA (SOLO PER SEM)***

La ricopertura è una tappa molto delicata e consiste nella deposizione di un sottile strato di oro sulla superficie del campione, al fine di aumentare l'emissione di elettroni secondari favorendo così la formazione dell'immagine. Questa operazione viene effettuata per mezzo di appositi strumenti che operano sotto vuoto (detti metallizzatori). L'osservazione dei campioni è stata realizzata mediante l'utilizzo del microscopio elettronico a scansione FEI Quanta 200F (FEI company, Hillsboro, Oregon, USA).

## **V.4 ALLESTIMENTO DEI PREPARATI PER IMMUNOISTOCHEMICA**

L'analisi morfologica ed ultrastrutturale è stata integrata con uno studio funzionale volto a testare le alterazioni indotte dal cloruro di mercurio sul pattern di immunomarcatura di alcuni anticorpi. I campioni prelevati secondo le metodiche già descritte nel paragrafo V.3, sono stati processati secondo un protocollo adatto a preservare al massimo l'integrità dei siti antigenici.

#### ***V.4a FISSAZIONE***

Il fissativo utilizzato è il liquido di Bouin (Tab. V.4). Questo è un ottimo fissativo in quanto coarta poco i tessuti ed ha un potere penetrante abbastanza elevato che permette di fissare agevolmente grossi frammenti. La presenza di acido picrico impone il lavaggio in alcool per togliere il colore giallo che dà quest'acido, ma che permette l'individuazione dell'organo nel blocchetto di paraffina consentendo un miglior orientamento del campione durante la fase di taglio.

<b>FISSATIVO DI BOUIN</b>	
Acido picrico	15 ml
Formalina tamponata	5 ml
Acido acetico glaciale	1 ml

**Tab. V.4:** composizione del fissativo di Bouin.

#### ***V.4b DISIDRATAZIONE***

I primi passaggi servono ad eliminare l'eccesso di acido picrico, si procede, poi, all'allontanamento dei liquidi mediante alcool a concentrazione crescente (Tab. V.5).



<b>SCHEMA DI DISIDRATAZIONE</b>	
Etanolo al 50%	4-5 passaggi da 5'  1 passaggio da 1h
Etanolo al 70%	1 passaggio da 1h
Etanolo al 80%	1 passaggio da 1h
Etanolo al 90%	1 passaggio da 1h
Etanolo al 95%	1 passaggio da 12h
Etanolo al 100%	3 passaggio da 30-60'

**Tab. V.5:** schema di disidratazione per microscopia confocale.

#### ***V.4c INFILTRAZIONE ED INCLUSIONE***

La fase di infiltrazione (Tab. V.6) prevede l'utilizzo dello xilolo, il solvente organico della paraffina. Durante questo passaggio, conosciuto come chiarificazione, il solvente viene gradualmente sostituito all'etanolo. L'infiltrazione prosegue poi con una serie di passaggi graduali dallo xilolo alla paraffina e termina con l'inclusione dei campioni in blocchetti destinati al taglio. La paraffina è una miscela di idrocarburi con una densità molto vicina a quella dei tessuti biologici, presente in forma solida a temperatura ambiente e in forma liquida ad una temperatura di 56°C. Le branchie ed il fegato, orientati ad occhio nudo, sono

stati inclusi in appositi contenitori di acciaio riempiti di paraffina fusa e lasciati solidificare a temperatura ambiente.

<b>SCHEMA DI INFILTRAZIONE</b>	
Miscela etanolo-xilolo (1:1)	1 passaggio da 15'
Xilolo	2 passaggi da 20'
Miscela xilolo-paraffina (1:1)	1 passaggio da 30' in stufa 56°C  1 passaggio over night
Etanolo al 90%	1 passaggio da 1h
Paraffina	3-4 passaggi da 1h in stufa 56°C  1 passaggio over night
<b>INCLUSIONE IN PARAFFINA</b>	

**Tab. V.6:** schema di infiltrazione per microscopia confocale.

#### ***V.4d SEZIONAMENTO***

I campioni inclusi in blocchetti di paraffina vengono tagliati mediante il microtomo. Il blocchetto di paraffina contenente il campione da analizzare è stato montato sul braccio del microtomo Leica modello RM2125RT ed orientato in modo che la superficie di taglio risulti parallela alla lama.

Le sezioni dello spessore di 8-10  $\mu\text{m}$  vengono poi raccolte e trasferite su un vetrino portaoggetti su cui è stata posta una goccia d'acqua distillata precedentemente riscaldata. A

questo punto il vetrino viene poggiato su una piastra riscaldata a 20°C per permettere la distensione delle sezioni e l'adesione delle stesse al vetrino.

#### **V.4e SPARAFFINATURA**

Prima di essere osservati al microscopio, i vetrini devono essere sottoposti al processo di "sparaffinatura" ossia all'eliminazione della paraffina dal campione, avvenuta secondo il seguente schema Tab. V.7:

<b>SCHEMA DI SPARAFFINATURA</b>	
Xilolo	1 passaggio da 10'
Etanolo 100%	2 passaggi da 4'
Etanolo 95%	1 passaggio 4'
Acqua distillata	1 passaggio da 4'

**Tab. V.7:** schema di sparaffinatura delle sezioni.

#### **V.5 METODO DELL'IMMUNOFLUORESCENZA**

Le sezioni in paraffina destinate alla microscopia confocale sono state sottoposte alla tecnica dell'immunomarcatura indiretta (o immunofluorescenza indiretta), una tecnica che utilizza anticorpi legati a traccianti fluorescenti in grado di legarsi a strutture cellulari in modo molto specifico, consentendo la valutazione qualitativa e quantitativa delle strutture bersaglio (Coons *et al.*, 1955). Prima di applicare il protocollo dell' immunofluorescenza indiretta (Tab. V.8), i campioni sono stati sparaffinati e portati all'acqua utilizzando il protocollo riportato in Tab. V.7.

<b>PROTOCOLLO DI IMMUNOMARCATURA INDIRETTA</b>	
Lavaggi in Tampone PBS	3 passaggi da 5'
Coprire le sezioni con Normal goat Serum 1:50	10' in camera umida
Incubazione con Anticorpo Primario	Overnight a 4°C in camera umida
Lavaggi in Tampone PBS	3 passaggi da 5'
Anticorpo secondario	30' in camera umida
Lavaggi in tampone PBS	3 lavaggi da 5'
Lavaggi in tampone PBS	3 lavaggi da 5'
Ioduro di propidio	1 lavaggio da 30''
Lavaggi in Tampone PBS	3-4 lavaggi veloci
<b>Chiusura vetrini</b>	

**Tab. V.8:** protocollo immunofluorescenza indiretta.

Nella tabella di seguito invece (Tab. V.9 ) sono riportate le informazioni relative agli anticorpi utilizzati:

<b>Anticorpo primario</b>	<b>Specie host</b>	<b>Diluizione</b>	<b>Casa produttrice</b>	<b>Anticorpo secondario</b>
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasi	Mouse	1:100	Sigma-Aldrich Chemical Co., UK	FITC Anti-Mouse in Goat
MT	Mouse	1:100	Stressgen Biotechnologies Corporation, Victoria, BC, Canada	FITC Anti-Mouse in Goat

**Tab. V.9:** anticorpi testati.

## **V.6 REAL TIME PCR**

La RT-PCR è un utilizzo della PCR che permette di studiare l'espressione di determinati geni in quanto non amplifica sequenze di DNA genomico ma solo quelle degli RNA trascritti. L'RNA viene dapprima estratto e poi retrotrascritto in vivo a cDNA, che farà da template per la reazione a catena della polimerasi.

### ***V.6a ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE RNA TOTALE DA TESSUTO***

L'isolamento dell'RNA totale dai nostri campioni è stata effettuata utilizzando il reagente TRIzol (Invitrogen). Le fasi del protocollo seguito sono riassunte di seguito (Tab. V.10):

Omogeneizzazione	1 mL di TRIzol (Sigma-Aldrich Chemical Co., UK) per ogni 50-100 mg di tessuto
Fase di separazione	Incubare i campioni omogeneizzati per 5 min a 15-30°C. Aggiungere 0.2 mL di Cloroformio (Sigma-Aldrich Chemical Co., UK) per ogni mL di TRIzol. Centrifugare 11500 rpm per 15 min a 2-8°C
Precipitazione dell'RNA	0.5 mL di Isopropanolo (Sigma-Aldrich Chemical Co., UK) per ogni mL di TRIzol. Incubare 10 min a 15-30°C e centrifugare a 11500 rpm per 10 min a 2-8°C
Lavaggi dell'RNA	Aggiungere al pellet 1 mL di 75% Etanolo per ogni mL di TRIzol. Centrifugare a 8000 rpm per 5 min a 2-8°C
Risospensione dell'RNA	Lasciare asciugare il pellet per qualche minuto
Misurazione della concentrazione dell'RNA	Diluire in 3 ripetizioni l'RNA 1:100 (1 $\mu$ L di RNA + 99 $\mu$ L di acqua)

**Tab. V.10:** protocollo di estrazione e purificazione dell'RNA totale da tessuto.

### **V.6b PRODUZIONE DEL CDNA**

Per la produzione dei cDNA abbiamo utilizzato il kit SuperScript III Reverse transcriptase (Invitrogen). Di solito per questa procedura vengono utilizzati 2 µg di input iniziale di RNA in 20 µL di volume totale di reazione:

Preparazione MASTER MIX 1 (in eppendorf)	1 µL di oligo dT (Invitrogen), 1 µL 10 nM di dNTP Mix (Invitrogen), x µL di RNA totale, portare a volume (20 µL) con acqua distillata sterile.
Avviare ciclo di PCR impostando i seguenti parametri: 5 minuti a 65 °C ed 1 minuto a 4 °C	

Al termine della PCR aggiungere nello stesso mix di reazione i componenti della MASTER MIX 2 (4 µL 5X di First Strand Buffer, 1 µL 0.1 di DTT, 1 µL di RNase OUT, 1 µL di SuperScript III RT). Avviare nuovo ciclo di PCR (60 minuti a 50 °C e 15 minuti a 70 °C). Al termine delle reazioni il prodotto ottenuto (cDNA) viene conservato in aliquote a -20°C ed utilizzato per applicazioni successive.

### **V.6c RT-PCR**

I geni utilizzati nel nostro studio sono il fattore di trascrizione metallo-reattivo 1 (mtf1, accession number NM\_152981.1), la pompa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasi (atp1a1a.1, accession number NM\_131686.1) e due geni di riferimento, deidrogenasi gliceraldeide-3-fosfato (GAPDH, accession number NM\_001115114.1) e la beta actina 1 (actb1, accession number NM\_131031.1). L'amplificazione del cDNA è stata verificata mediante i saggi di

espressione TaqMan Gene. Le reazioni di PCR sono state eseguite attraverso l'uso di un Light Cycler (Applied Biosystems StepOn, Real-Time PCR System, Foster City, CA, USA) seguendo le istruzioni del produttore (un ciclo a 50 °C per 2 minuti, 95 °C per 10 minuti e 40 cicli di amplificazione a 95 °C per 15 secondi, 60 °C per 1 minuto). Ogni reazione (20 µL) conteneva 2 µL di cDNA, 10 µL di master mix (TaqMan universale Master Mix II, Applied Biosystems), 1 µL assay mix (TaqMan Gene Expression Assay, che include una coppia di primer specifici per la PCR ed una sonda TaqMan) e 7 µL di acqua RNase-free.

La specificità della reazione è stata determinata per ciascuna reazione dalla curva di dissociazione del prodotto della reazione a catena della polimerasi. La quantificazione relativa dei livelli di espressione dei geni presi in esame è stata normalizzata in base alla media dei due livelli di espressione dei geni di riferimento (GAPDH e actb1). L'espressione dell'mRNA relativo ai geni per la NKA e la MT è stata generata utilizzando il metodo  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001).

## **V.6 IBRIDAZIONE IN SITU**

### **V.6a CONSULTAZIONE DATABASE E COSTRUZIONE PRIMER**

Per poter amplificare la sequenza codificante del gene di interesse (*mt*) è necessario partire dal cDNA retro trascritto (V.6b).

Basandosi sui dati presenti su database disponibili in rete (Genbank dell'NCBI), tramite il programma PRIMER3 sono stati disegnati dei primer adatti ad amplificare, mediante PCR, il gene d'interesse dal cDNA totale. I primers scelti (forward e reverse) devono possedere alcuni requisiti fondamentali: una lunghezza intorno alle 20-30pb, una percentuale in GC ed una temperatura di fusione ( $T_m$ : melting temperature) simili; non devono formare strutture secondarie complesse, non devono contenere unità ripetute o ripetute in tandem



(per evitare l'appaiamento aspecifico) e non devono avere le estremità 3' complementari per evitare che si amplifichino solo loro. Primers scelti:

MT\_forward: 5'-GAAATTTCCCACCCCTAATCA-3'

MT\_reverse: 5'-CGACAAAAATACTGGGTCACG-3'

### ***V.6b AMPLIFICAZIONE MT***

I primers sono stati utilizzati per avviare una reazione a catena della polimerasi in modo da poter isolare il gene d'interesse dal cDNA totale. I reagenti utilizzati per la PCR (volume totale 50 µL) sono i seguenti:

- 1 µL di MgCl 50 mM
- 5 µL di buffer 10 X
- 5 µL di d NTP 1,5 mM
- 1 µL primer forward 10 mM
- 1 µL primer reverse 10 mM
- 5 µL di cDNA
- 0,4 µL di Taq polimerasi
- x µL di acqua nuclease free

Condizioni per la polimerizzazione (Tab. V.11):

STEP	CICLI	TEMOERATURA	DURATA	DESCRIZIONE
<i>PRIMO</i>	1	94 °C	60''	Prima denaturazione
<i>SECONDO</i>	38	94 °C	30''	Denaturazione per ogni ciclo
		58 °C	30''	Appaiamento primers
		72 °C	60''	Polimerizzazione
<i>TERZO</i>	1	72 °C	7'	Polimerizzazione finale

Tab. V.11: condizioni per la PCR.

### ***V.6c ELETTROFORESI ORIZZONTALE***

L'elettroforesi orizzontale permette di separare in presenza di un campo elettrico gli acidi nucleici in base alle loro dimensioni. Questo perché gli acidi nucleici, carichi negativamente, vengono attratti verso l'anodo (carico positivamente) con una velocità che sarà direttamente proporzionale alle loro dimensioni. Il gel di agarosio è infatti formato da polimeri ramificati che creano un reticolo con pori di diversa dimensione a seconda della concentrazione di agarosio (più concentrato sarà e minore sarà il diametro dei pori). Nei nostri esperimenti è stato usato un gel di agarosio all'1% (peso/volume) composto da:

- 60 mL di TAE 1x (Sigma)
- 0,60 g di AGAROSE (Lonza)
- 6 µL di Gel Red (BIOTIUM)

Nei pozzetti del gel sono stati caricati:

- 20 µL di cDNA + 5 µL di Loading dye orange 5X (Promega®)
- 10 µL di 1Kb DNA ladder (Promega®) + 10 µL di acqua ultrapura

Si lascia correre il gel a 90 V e successivamente il risultato della corsa viene osservato al transilluminatore.

#### ***V.6d ESTRAZIONE DEL DNA DAL GEL DI AGAROSIO***

Questa procedura permette di recuperare il cDNA, dal gel di agarosio. Si utilizza il QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Quiagen).

- 1.- Pesare il gel e aggiungere per 100 g di gel 30  $\mu$ l di buffer QG.
- 2.- Mettere le eppendorf in una piastra riscaldante a 50 °C per 10 minuti.
- 3.- Trasferire il tutto nelle spin cartridge (fornita dal kit) e centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm.
- 4.- Svuotare l'eluito della collection tube (fornita dal kit) e aggiungere nella spin cartridge 500  $\mu$ l di buffer QG e centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm.
- 5.- Svuotare l'eluito della collection tube e aggiungere 750  $\mu$ l di PE nella spin cartridge. Lasciare a temperatura ambiente per 2 minuti, dopo centrifugare 1 minuto a 13.000 rpm.
- 6.- Svuotare la collection tube e centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm.
- 7.- Trasferire la spin cartridge in una nuova eppendorf
- 8.- Eluire il DNA aggiungendo 50  $\mu$ l di Buffer EB nella spin cartridge e centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm. Nel percolato è contenuto il cDNA diluito che può essere conservato a -20°C.

#### ***V.6d PREPARAZIONE DEL VETTORE DI CLONAGGIO***

Il gene *mt* è stato inserito nel vettore commerciale Invitrogen pCR TOPO. Il vantaggio nell'utilizzare questo vettore consiste nel fatto che permette l'inserimento diretto del prodotto di PCR ottenuto. Il vettore viene fornito linearizzato, con estremità 3' sporgenti di una singola timidina e con una Topoisomerasi I legata covalentemente alle sue estremità. La strategia di clonaggio sfrutta l'attività di ligasi della Topoisomerasi I, perciò la

ligazione del vettore con il prodotto di PCR avviene spontaneamente e con grande efficienza a temperatura ambiente ed in pochi minuti.

Per la realizzazione, bisogna aggiungere in una eppendorf:

- 2  $\mu\text{L}$  del prodotto della PCR precedentemente purificato
- 1  $\mu\text{L}$  di soluzione salina
- 1  $\mu\text{L}$  di TOPO Vector
- 2  $\mu\text{L}$  di acqua RNA free

Incubare la reazione per 5 minuti a temperatura ambiente e al termine trasferire la reazione in ghiaccio. Procedere con la trasformazione dei batteri.

### ***V.6e TRASFORMAZIONE DEI BATTERI COMPETENTI***

Il processo di trasformazione comporta l'introduzione di DNA esogeno in una cellula procariote. Questa può essere ottenuta trattando le cellule in modo da cambiare temporaneamente le caratteristiche della membrana cellulare, per esempio, mediante shock termico oppure applicando un campo elettrico tra due elettrodi immersi nella sospensione cellulare. In entrambi i casi si generano sulle membrane dei punti di rottura localizzati che permettono lo scambio di molecole tra l'interno e l'esterno della cellula. Per aumentare l'efficienza di trasformazione i batteri subiscono un pretrattamento che li rende competenti.

In questa fase bisogna:

- 1.-** Aggiungere 2  $\mu\text{L}$  della soluzione contenete il vettore di clonaggio al One Shot TOP10 (Invitrogen).
- 2.-** Incubare per 30' a 42 °C.
- 3.-** Aggiungere 250  $\mu\text{L}$  di SOC *medium* (il terreno di coltura). Segue un'incubazione per 1 ora a 37 °C in agitazione (200 rpm).

**4.-** Al termine dell'incubazione 20-100  $\mu$ L della trasformazione vengono seminate su piastre con terreno selettivo contenente Kanamicina e incubate a 37°C overnight.

Le colonie che crescono saranno quelle che hanno incorporato il plasmide che porta la resistenza all'antibiotico Kanamicina. Dunque, queste colonie, si possono successivamente far espandere ed analizzate in merito all'identità del plasmide contenuto. Le colonie bianche sono quelle nelle quali l'inserzione del vettore (contenente a sua volta il nostro inserto) è avvenuta con successo, mentre quelle di colore blu sono quelle in cui il vettore si è richiuso senza effettuare quindi l'inserzione. Dunque si sono scelte un paio di colonie bianche e per verificare la presenza dell'inserto è stata fatta una PCR da colonia.

Al termine della PCR si sono scelte le colonie che hanno dato amplificato e le si è trasferite in un terreno di coltura selettivo (LB liquido + Kanamicina) e lasciate crescere in sospensione a 37° C per tutta la notte.

#### ***V.6f ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEL DNA PLASMIDICO DAI BATTERI (MINIPREP).***

A questo punto si è estratto il DNA plasmidico dai batteri, utilizzando il kit QIA prep Spin Miniprep (QIAGEN) seguendo le istruzioni riportate nel manuale.

- 1.-** Aggiungere in una eppendorf 2 ml della nostra colonia di crescita. Centrifugare per 3 minuti a 10.000 rpm.
- 2.-** Buttare il surnatante e aggiungere al pellett altri 1,5 ml della nostra colonia. Centrifugare per 3 minuti a 10.000 rpm.
- 3.-** Ripetere passaggio 2.
- 4.-** Buttare il surnatante e aggiungere al pellett 250  $\mu$ l di Buffer P1 (fornito dal kit), vortexare fino a quando il pellett non si è disciolto bene.
- 5.-** Aggiungere 250  $\mu$ l di Buffer P2.

- 6.- Aggiungere 350  $\mu$ l di Buffer N3 e agitare manualmente. Centrifugare 10 minuti a 13.000 rpm.
- 7.- Trasferire il surnatante nella spin column (fornita dal kit) e centrifugare per 30 secondi a 10.000 rpm.
- 8.- Svuotare l'eluito e aggiungere nella spin column 500  $\mu$ l di Buffer PB. Centrifugare per 60 secondi.
- 9.- Svuotare l'eluito e aggiungere 750  $\mu$ l di Buffer PE. Centrifugare per 1 minuto.
- 10.- Svuotare l'eluito e riporre la spin column nella stessa collection tube (fornita dal kit).
- 11.- Centrifugare per 1 minuto per eliminare eventuali residui di buffer.
- 12.- Collocare la spin column in una nuova eppendorf da 1,5 ml e aggiungere al centro della spin (per eluire il DNA) 50  $\mu$ l di Buffer EB oppure acqua DNA/RNA free.
- 13.- Lasciare riposare per 1 minuto. Centrifugare per 1 minuto e poi procedere con la lettura al nanodrop.

### ***V.6g QUANTIFICAZIONE MINIPREP E RESTRIZIONE DEI VETTORI***

Dopo l'estrazione e la purificazione del DNA plasmidico utilizzando il miniprep è stato fatto correre un altro gel (1% di agarosio) caricando il DNA plasmidico precedentemente estratto. Con il software Molecular Analyst (Biorad) è stato quantificato il DNA a disposizione. In seguito si è fatta una restrizione dei vettori contenenti *mt* per capire il verso in cui gli inserti si sono integrati. Quest'ultimo passaggio è necessario per sintetizzare le sonde che verranno utilizzate durante l'ibridazione *in situ* poiché, i plasmidi utilizzati come vettori, possiedono due promotori disposti in direzioni opposte: il promotore per la polimerasi del fago T7 e quella del fago SP6.

La **restrizione** consiste nella creazione di mappe di restrizione per i nostri 2 geni di interesse, in modo da renderli identificabili mediante elettroforesi. Per la creazione di

mappe di restrizione ci si è avvalsi del programma Webcutter (disponibile in rete). Questo programma controlla la sequenza da noi inserita, generando in automatico una mappa di restrizione con indicati tutti gli enzimi che tagliano all'interno o alle estremità UTR 5' e UTR 3' della nostra sequenza. Si sono così scelti degli enzimi specifici e, conoscendo i siti di taglio all'interno dei nostri geni, si sono stimate le dimensioni dei frammenti che si sarebbero prodotti.

### ***V.6h COSTRUZIONE DELLE SONDE ANTISENSO***

Dopo aver stabilito l'orientamento degli inserti, per la sintesi di sonde antisense di RNA, si è utilizzata la polimerasi fagica T7 il cui promotore si trova in un lato del polilinker del vettore plasmidico pCRII-TOPO. Per la reazione vengono utilizzate miscele di ribonucleotidi contenenti una frazione di UTP (desossiridintrifosfato) marcate con digossigenina (NTPs-DIG), molecola bersaglio di anticorpi specifici.

<b>QUANTITÀ</b>	<b>REAGENTI</b>
2 µL	Buffer di reazione 5 X
2 µL	NTPs-DIG10X
1 µg	DNA
1 µL	RNasi Inibitore
1 µL	T7
9 µL	Acqua MilliQ

La reazione viene incubata a 37°C per 2 ore al termine delle quali vengono aggiunti 2µl di DNasi priva di RNasi per degradare lo stampo. La reazione viene lasciata per 20 minuti a 37°C. A questo punto le sonde vanno purificate utilizzando il kit Mege-CLEAR (Ambion), quantificate con un gel di agarosio al 1,5% e infine conservate a -80°C.

## ***V.6i IBRIDAZIONE IN SITU***

L'ibridazione in situ è stata eseguita secondo le metodiche di Ebbesson e colleghi (2011). I campioni di tessuto epatico sono stati fissati in paraformaldeide al 4% in 0.1 M Sørensen tampono fosfato (28 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) per 48 ore. Il tessuto è stato lavato 3 × 20 min in PBS, conservato overnight in 25% di saccarosio in PBS a 4°C, incluso in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Fintek, Zoeterwoude, Netherlands) e conservati a -80°C fino al sezionamento. Sezioni di tessuto epatico (12 µm) sono state tagliate utilizzando il criostato (Leica CM 1850), raccolte su vetrini SuperFrost Ultra Plus (Menzel Gläser, Braunschweig, Germany) ed essiccate a 60°C per 10 min. I riboprobe marcati con digossigenina sono stati preparati utilizzando un digossigenina (DIG) RNA labelling mix seguendo le istruzioni del produttore (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Prima di effettuare l'ibridazione *in situ*, il tessuto è stato essiccato a temperatura ambiente per 1 ora e 65 °C per 10 min, reidratato in una serie decrescente di etanolo (95-50%), lavato con 2 × SSC per 1 min, trattato poi con proteinasi K (10 mg/ml a 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0) per 3,5 min e post-fissato in paraformaldeide al 4% in 137 mM NaCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,3) per 5 min, seguita da due risciacqui da 2 min in PBS. Il tessuto è stato quindi trattato con 0,1 M di trietanolamina (TEA, pH 8,0; Sigma) per 3 minuti e poi con anidride acetica 0,25% (Sigma-Aldrich) in 0,1 M TEA per 10 min. Infine, il tessuto è stato disidratato in una serie decrescente di etanolo (50-100%) e essiccato per 1 ora. Per il saggio di ibridazione sono stati applicati, su ciascun vetrino, 200



ng di sonda marcata con digossigenina in 100 ml di soluzione di ibridazione. La composizione della soluzione di ibridazione era: 10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, acido 20 mM etilendiamminotetraacetico (EDTA), 0,2% Tween-20, 1% (Roche Diagnostics), 0,1% dextran sulphate (Sigma-Aldrich) e 50% di formammide deionizzata (Sigma-Aldrich). L'incubazione per 16 ore è stata effettuata a 65°C in camera umida. E' stata utilizzata una sonda 'senso' come controllo negativo. Dopo l'ibridazione, il tessuto è stato lavato per 2 volte in 2 × SSC (30 min), trattato con 50% di formammide deionizzata in 2 × SSC a 65 ° C per 30 min e 2 volte con 2 × SSC a 37 ° C (10 min). Il tessuto è stato trattato per 20 minuti con RNasi A (0,02 mg/ml, Sigma-Aldrich) a 37 °C. Le sezioni sono state incubate per 1 ore con 2% di blocking solution in 2 × SSC con 0,05% Triton X-100 e poi trattate con anticorpo anti-DIG (1: 2000, Roche Diagnostics) overnight. Il tessuto è stato lavato 2 volte per 10 min in maleat buffer e poi trattato per 10 min con tampone di visualizzazione + 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, (pH 9,5). La reazione di colorazione con il substrato cromogeno conteneva 3,4 ml di nitroblu tetrazolio (NBT) e 3,5 ml di 5-bromo-4-cloro-3-indoylphosphate (BCIP) (Roche Diagnostics) in tampone di visualizzazione è stata incubata per 3 ore al buio a temperatura ambiente. La reazione è terminata utilizzando una soluzione di arresto contenente 10 mM di Tris-HCl, 1 mM di EDTA e 150 mM di NaCl (pH 8,0). Alla fine i vetrini sono stati chiusi utilizzando glicerolo al 70% e le sezioni sono state osservate e fotografate utilizzando un microscopio LM LEITZ Dialux EB 20.

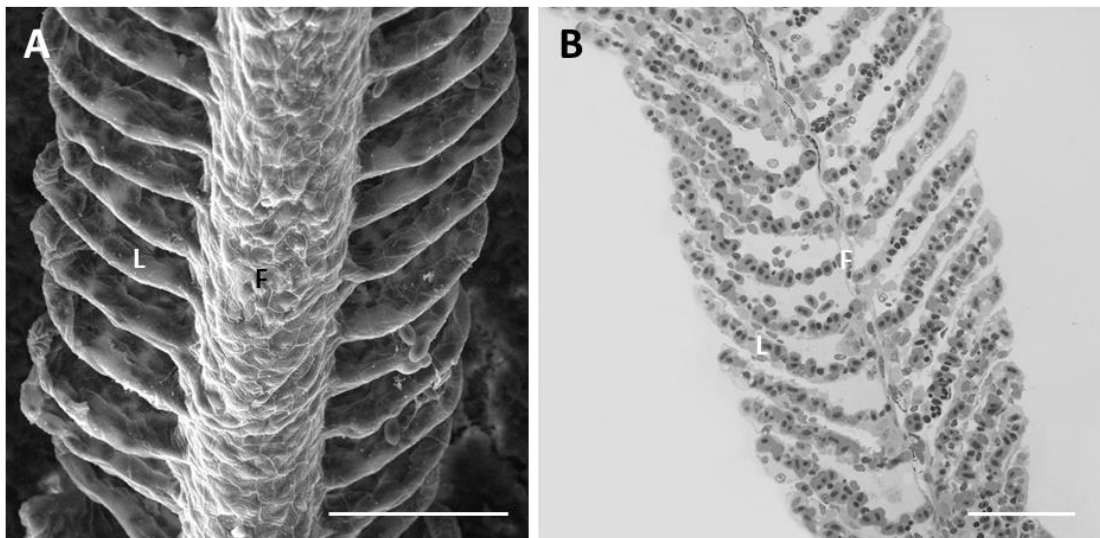
# CAPITOLO VI

## RISULTATI

### VI.1 STRUTTURA ED ULTRASTRUTTURA DELLE BRANCHE DI *D.*

#### *RERIO*

La morfologia delle branchie di *D. rerio* è simile a quella degli altri Teleostei di acqua dolce ed è stata descritta in dettaglio da Karlsson (1983). Ogni branchia è supportata da quattro archi branchiali che danno inserzione ad una doppia serie di filamenti (detti anche filamenti principali). Da ciascun filamento diparte una doppia serie di lamelle secondarie (o filamenti secondari) caratterizzate da una grande superficie appiattita (Fig. VI.1a, VI.1b).



**Fig. VI.1:** (A) organizzazione concentrica delle microcreste delle PVCs. F=filamento, L=lamelle. Barra 50 µm; (B) generale organizzazione morfologica dell'epitelio branchiale; F=filamento, L=lamelle. Foto colorata in blu di toluidina. Barra 50 µm.

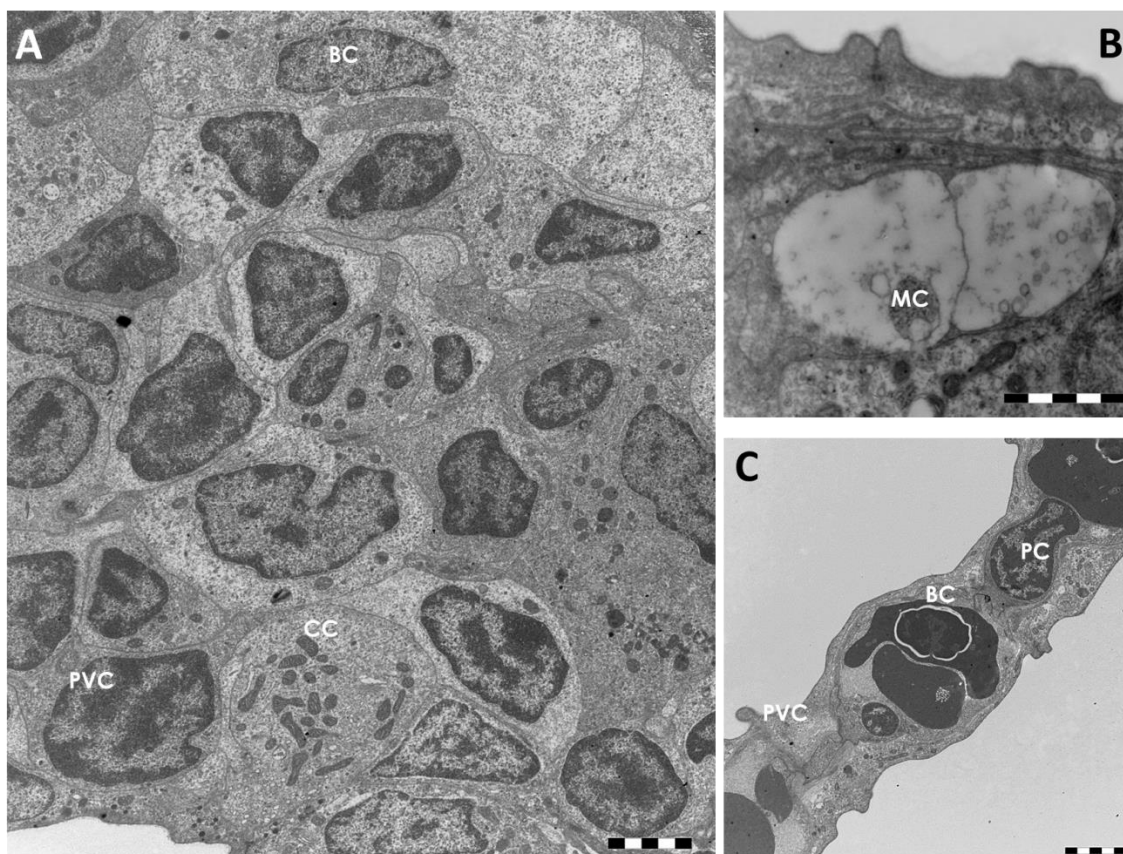
Al SEM è possibile riconoscere le cellule pavimentose (PVC) che formano lo strato epiteliale esterno sia del filamento che delle lamelle. Le PVCs mostrano confini ben delineati e sono dotate di numerose microcreste concentriche sulla loro superficie apicale (Fig. VI.1a).

Le osservazioni istologiche ci permettono di identificare, nell'epitelio primario, quattro tipi di cellule: le cellule pavimentose (PVC), le cellule mucose (MC), le cellule a cloruro (CC) e le cellule basali (Fig. VI.2a).

Le cellule basali indifferenziate compongono lo strato epiteliale più interno del filamento principale che prende contatto con la sottostante membrana basale (Fig. VI.2a). Entrambe le CCs e le MCs sono sparse al di sotto delle PVCs, in particolare nella regione interlamellare. La loro superficie apicale è parzialmente coperta dalle PVCs adiacenti e si apre verso l'esterno attraverso la presenza di piccoli pori (Fig. VI.2, Fig. VI.2b).

Le MCs sono facilmente identificabili dalla loro forma tondeggianti e dalla presenza di numerosi granuli elettron-chiari all'interno del citoplasma (Fig. VI.2b). Le CCs, sono grandi cellule rotondeggianti o ovoidali caratterizzate da un citoplasma ricco di numerosi mitocondri e da un complesso sistema tubulo-vescicolare (Fig. VI.2a).

L'epitelio secondario è molto semplice ed è composto di uno strato esterno di PVCs ed uno interno di cellule basali (Fig. VI.2c). Le pillar cells (PC) che regolano il flusso sanguigno capillare e le cellule endoteliali sono facilmente riconoscibili (Fig. VI.2c).



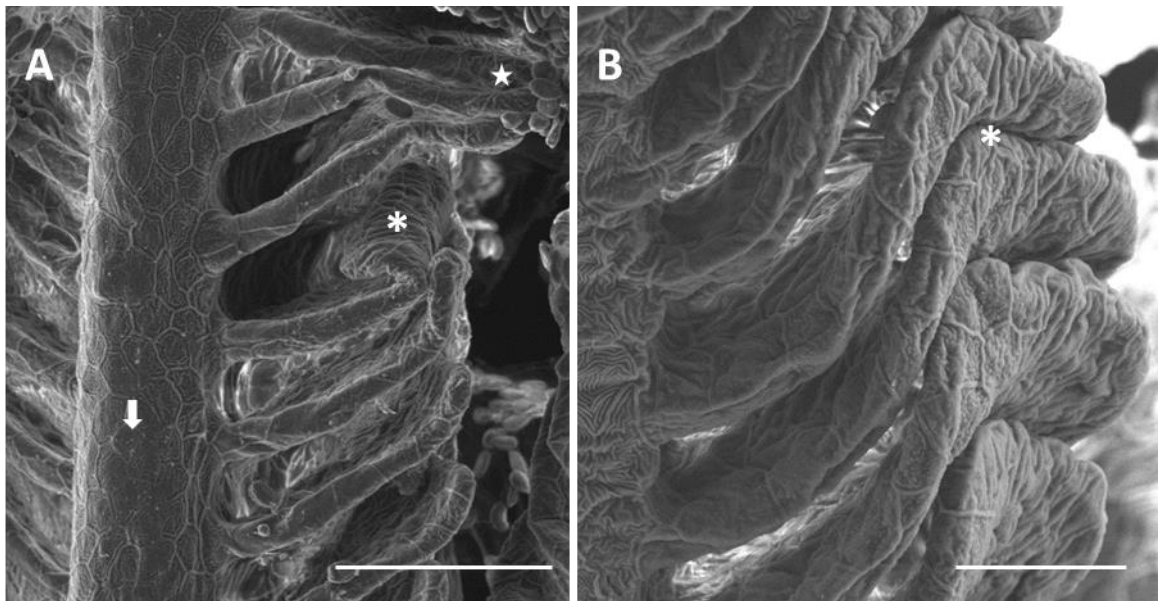
**Fig. VI.2:** (A) organizzazione cellulare dell'epitelio primario. CC=cellula a cloruro, PVC=cellula pavimentosa; BC=cellula basale; (B) alto ingrandimento di una cella mucosa (MC); (C) organizzazione ultrastrutturale dell'epitelio secondario. PVC=cellula pavimentosa; BC=cellula basale; PC=pillar cell. Tutte le barre 2 µm.

## **VI.2 STRUTTURA ED ULTRASTRUTTURA DELLE BRANCHE DI *D. RERIO* DOPO ESPOSIZIONE A CLORURO DI MERCURIO**

### ***VI.2a ESPOSIZIONE A 7.7 µg/L DI HgCl<sub>2</sub>***

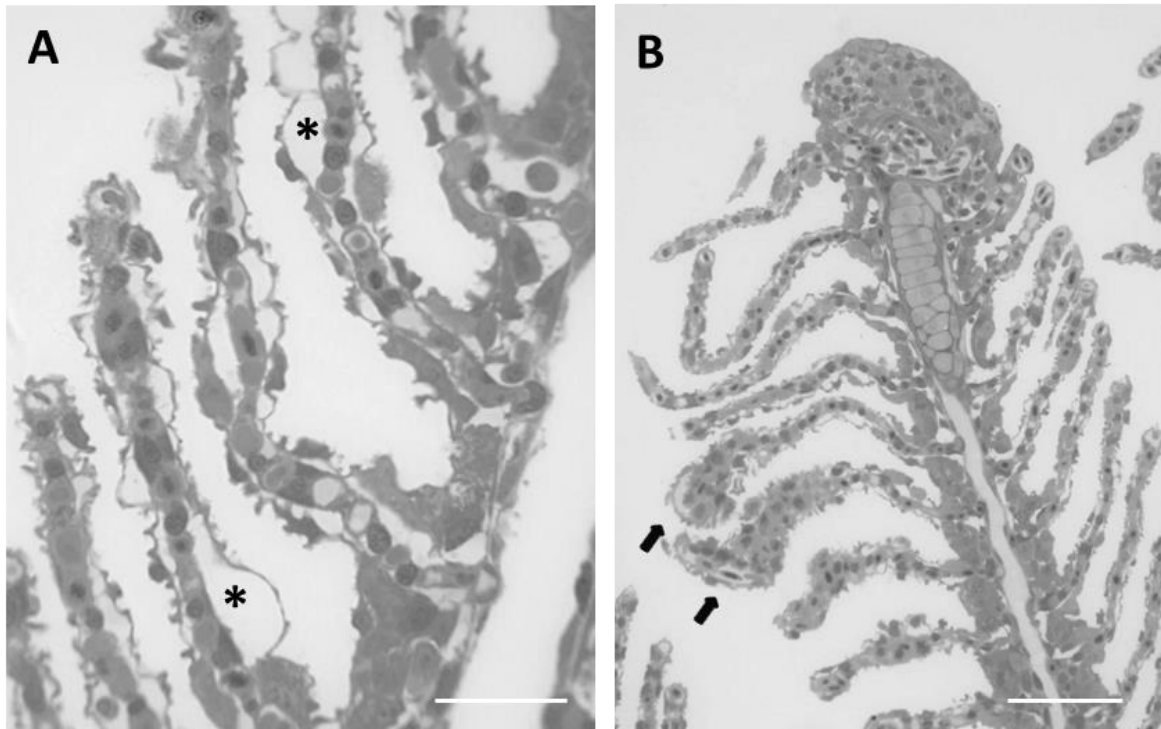
Già dopo 96 h di esposizione alla concentrazione di 7.7 µg/L di cloruro di mercurio (per semplicità ci riferiremo a tale concentrazione chiamandola 'bassa concentrazione'), nell'apparato branchiale di *D. rerio* è possibile notare un inizio di degenerazione a carico delle cellule pavimentose, che mostrano in più punti, la parziale alterazione delle microcreste superficiali come evidente dalle immagini al SEM. L'alterazione delle microcreste interessa essenzialmente le cellule del filamento principale e quelle della

regione prossimale delle lamelle secondarie; le lamelle, inoltre, iniziano a perdere il loro tipico assetto apparendo fuse e ripiegate nella porzione distale. (Fig. VI.3a, VI.3b).



**Fig. VI.3:** (A) degenerazione a carico delle microcreste delle PVCs dell'epitelio primario (freccia); ripiegamento nella porzione distale delle lamelle (asterisco) e fusione lamellare (stella). Bar 50  $\mu\text{m}$ . (B) alto ingrandimento di una fusione lamellare (asterisco). Bar 20  $\mu\text{m}$ .

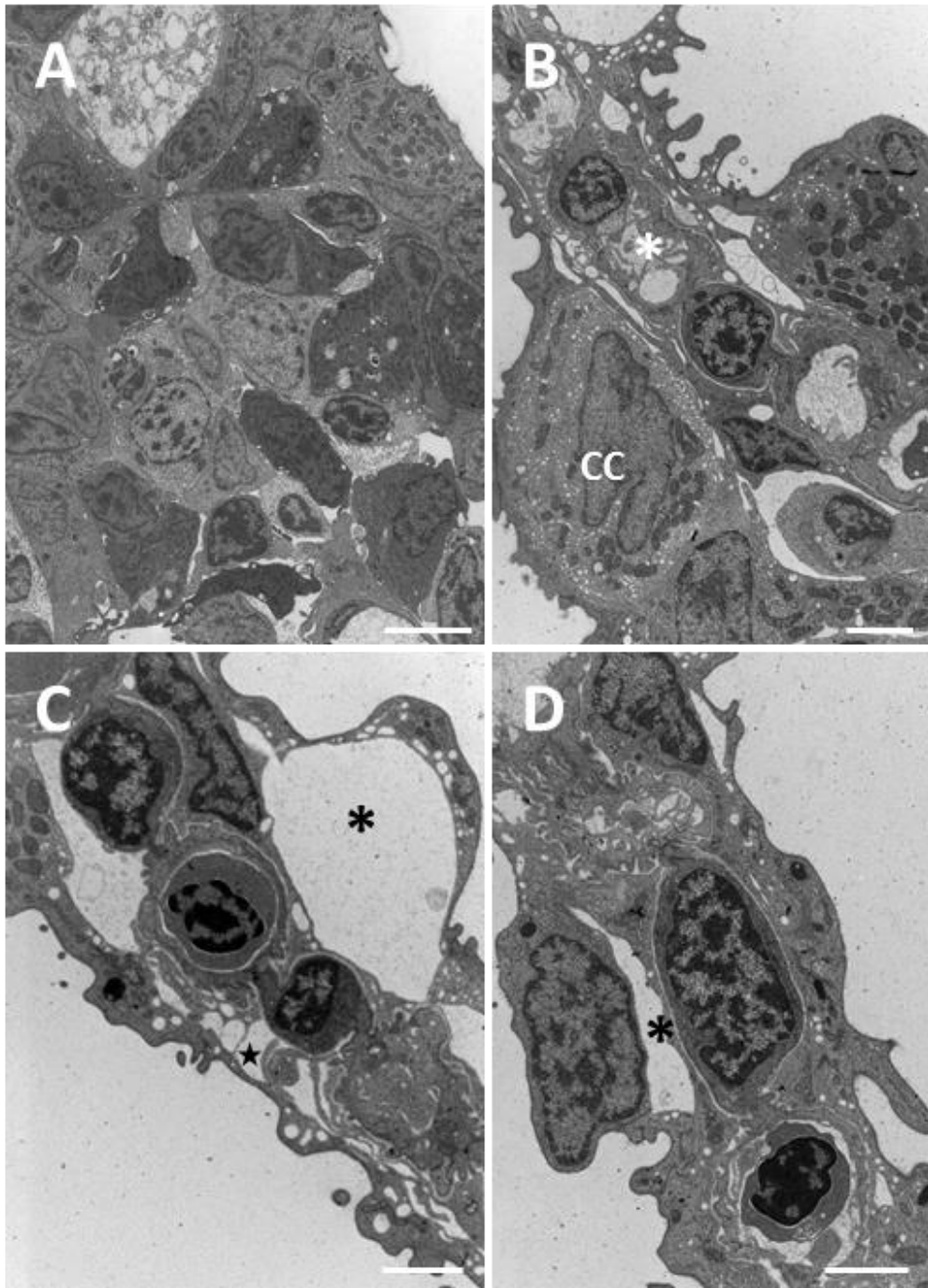
L'analisi istologica mostra come le principali alterazioni dell'apparato branchiale siano a livello delle lamelle secondarie. L'osservazione al MO rivela inoltre un ampio distacco dell'epitelio branchiale dal tessuto connettivo sottostante che favorisce la formazione di vaste lacune nel tessuto lamellare. Inoltre l'ipertrofia delle cellule epiteliali è particolarmente evidente nella porzione distale delle lamelle e porta alla piegatura ed, in alcuni casi, alla fusione lamellare (Fig. VI.4a, VI.4b). L'ipertrofia delle cellule endoteliali associata alla congestione dei vasi sanguigni è spesso visibile (Fig. VI.4b).



**Fig. VI.4:** (A) il distacco dell'epitelio dal tessuto connettivo crea ampie lacune a carico delle lamelle (asterisco). Bar 20  $\mu\text{m}$ ; (B) ipertrofia delle cellule endoteliali e congestione del sangue (freccia). Bar 50  $\mu\text{m}$ .

Nonostante la morfologia delle branchie a livello microscopico sia sostanzialmente mantenuta, l'osservazione ultrastrutturale dell'epitelio primario, rivela la comparsa di degenerazione cellulare spesso associata a modesti fenomeni d'apoptosi e necrosi cellulare ed al manifestarsi di fenomeni d'infiltrazione macrofagica (Fig. VI.5). A livello della porzione interlamellare, inoltre, le CCs appaiono ipertrofiche (Fig. VI.5b).

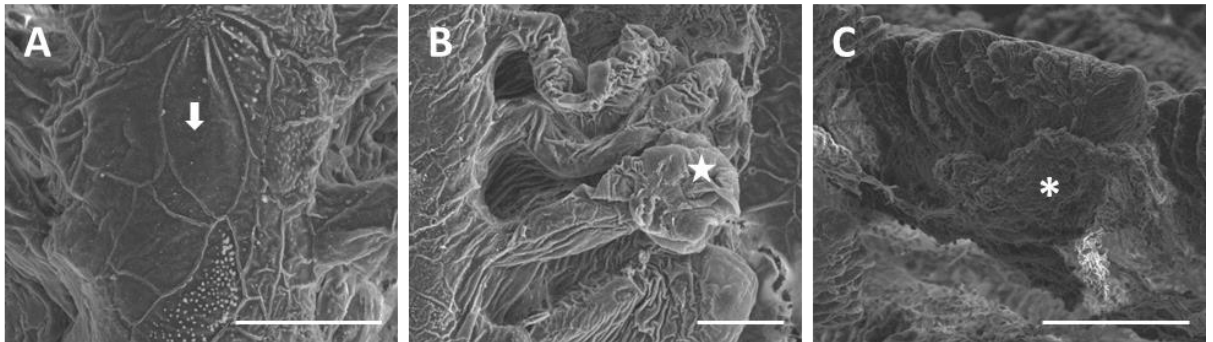
Come apprezzato mediante analisi morfologica anche al TEM, alla bassa concentrazione, le alterazioni più evidenti sono a carico delle lamelle secondarie, dove assistiamo ad un completo distacco dell'epitelio lamellare dalla lamina basale (Fig. VI.5b, VI.5d) ed alla notevole vacuolazione citoplasmatica delle PVCs (Fig. VI.5c, VI.5d).



**Fig. VI.5:** (A) precoce degenerazione negli strati epiteliali interni del filamento; (B) distacco epiteliale (asterisco) ed ipertrofia delle cellule a cloruro (CC); (C) distacco nell'epitelio secondario (asterisco) e degenerazione delle PVCs (stella); (D) perdita dei collegamenti intercellulari tra PVCs e lamina basale (asterisco). Tutte le barre 2 µm.

### **VI.2b ESPOSIZIONE A 38.5 $\mu\text{g/L}$ DI $\text{HgCl}_2$**

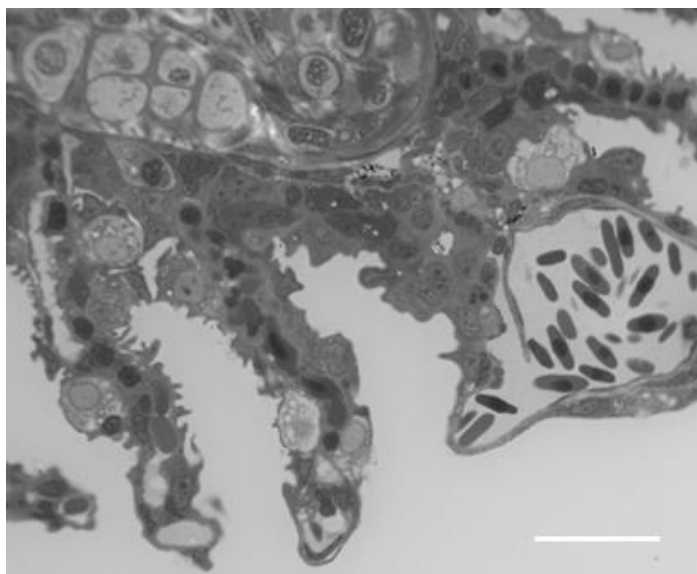
Dopo esposizione a 38.5  $\mu\text{g/L}$  di  $\text{HgCl}_2$  (per semplicità ci riferiremo a tale concentrazione chiamandola ‘alta concentrazione’), le alterazioni a carico dell’apparato branchiale di *D. rerio* diventano più cospicue. L’osservazione al SEM mostra come a livello del filamento principale le microcreste delle PVCs perdono completamente la loro disposizione tipica e, in alcuni casi, scompaiono (Fig. VI.6a). La superficie epiteliale, sia del filamento principale sia delle lamelle, appare rugosa e quasi tutti lamelle secondarie mostrano una severa degenerazione nella porzione distale (Fig. VI.6b). A questa concentrazione inoltre appare rilevante la presenza di una forte coltre mucosa che ricopre l’intero apparato branchiale (Fig. VI.6c).



**Fig. VI.6:** (A) degenerazione a carico delle microcreste delle PVCs dell’epitelio primario (freccia). Bar 20  $\mu\text{m}$ ; (B) la superficie dell’epitelio primario e secondario appare rugosa con gonfiore nella porzione distale delle lamelle (stella). Bar 20  $\mu\text{m}$ ; (C) aumento della secrezione mucosa (asterisco). Bar 100  $\mu\text{m}$ .

A livello strutturale, le alterazioni istologiche osservate già negli esemplari esposti alla bassa concentrazione si accentuano. Notiamo una notevole iperplasia lamellare e la comparsa di numerose CCs e MCs nelle lamelle secondarie (Fig. VI.7).

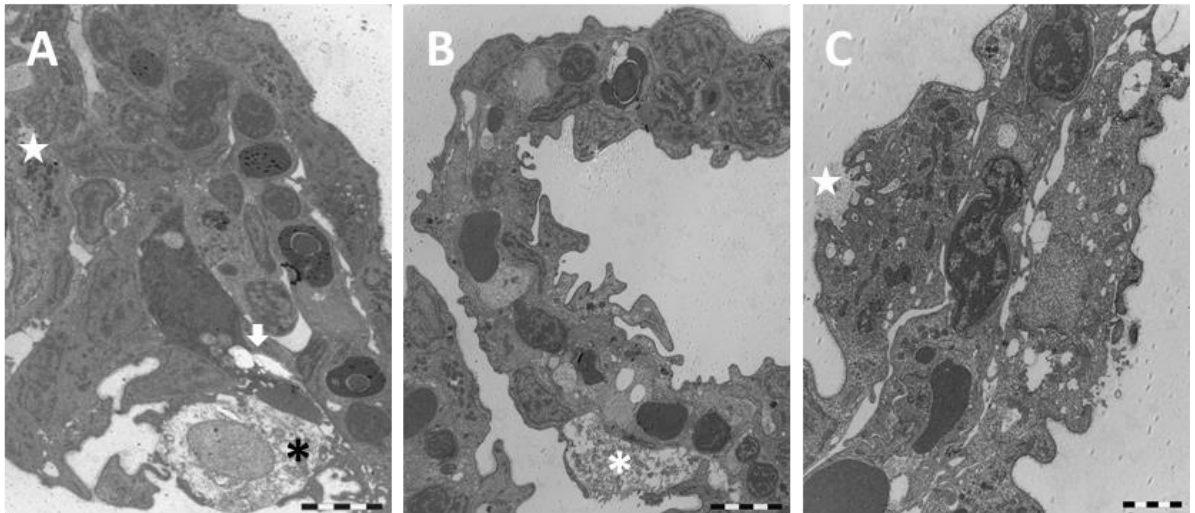




**Fig. VI.7:** sezione trasversale dell'apparato branchiale colorata in blu di toluidina. Iperplasia dell'epitelio secondario con comparsa di CCs e MCs. Bar 20  $\mu$ m.

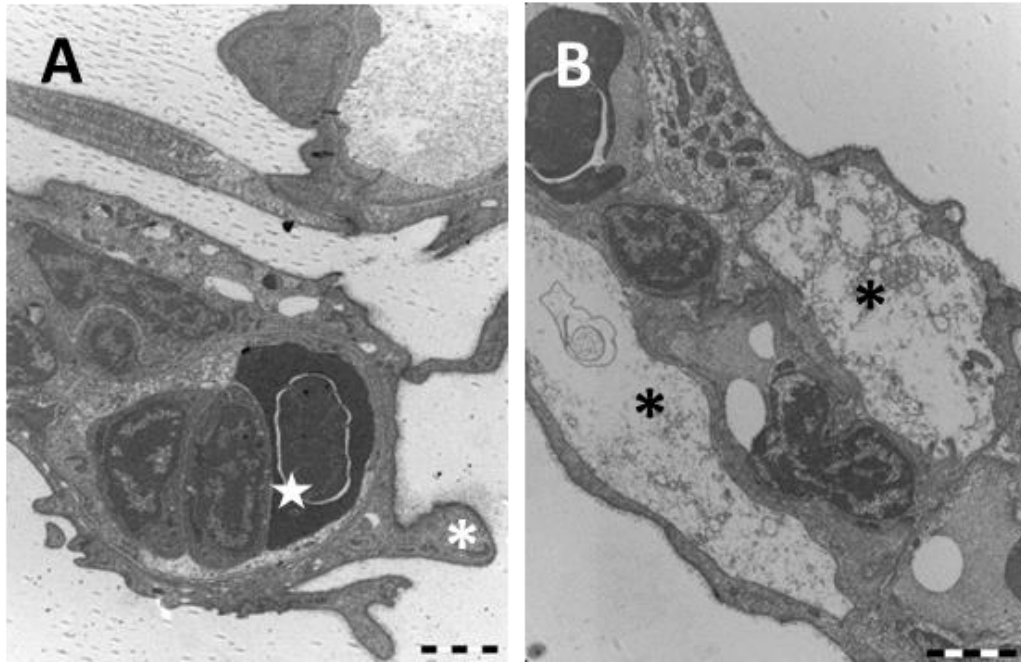
Il profondo stato di degenerazione tissutale e cellulare dell'intero apparato branchiale è ben visibile al TEM. L'epitelio del filamento principale è alterato da numerose lacune intercellulari e dalla massiccia degenerazione delle cellule mucose; l'infiltrazione da macrofagi è anche frequente (Fig. VI.8a).

Sebbene all'alta concentrazione siano ben visibili le alterazioni a carico del filamento principale, le alterazioni più cospicue sono osservabili a livello delle lamelle secondarie. Il ripiegamento lamellare è confermato dalle osservazioni al TEM, che rivelano anche fenomeni cospicui d'iperplasia (Fig. VI.8b). Nelle lamelle secondarie numerose cellule a cloruro sono presenti ed alcune di queste nuove cellule formate, mostrano profonde invaginazioni apicali (Fig. VI.8c).



**Fig. VI.8:** (A) alterazioni dell'epitelio primario con degenerazione delle MCs (asterisco), lacune epiteliali (freccia) ed infiltrazioni macrofagiche (stella); (B) piegatura delle lamelle secondarie, ipertrofia delle MCs (asterisco) ed iperplasia tissutale; (C) comparsa delle CCs nelle lamelle secondarie con presenza di profonde invaginazioni nella porzione apicale (stella). Tutte le barre 2 µm.

Nella porzione distale delle lamelle è inoltre possibile apprezzare la congestione del sangue con formazione di aneurismi (Fig. VI.9a); inoltre la degenerazione cellulare è evidente ed in alcune zone anche le pillar cells scompaiono (Fig. VI.9b).



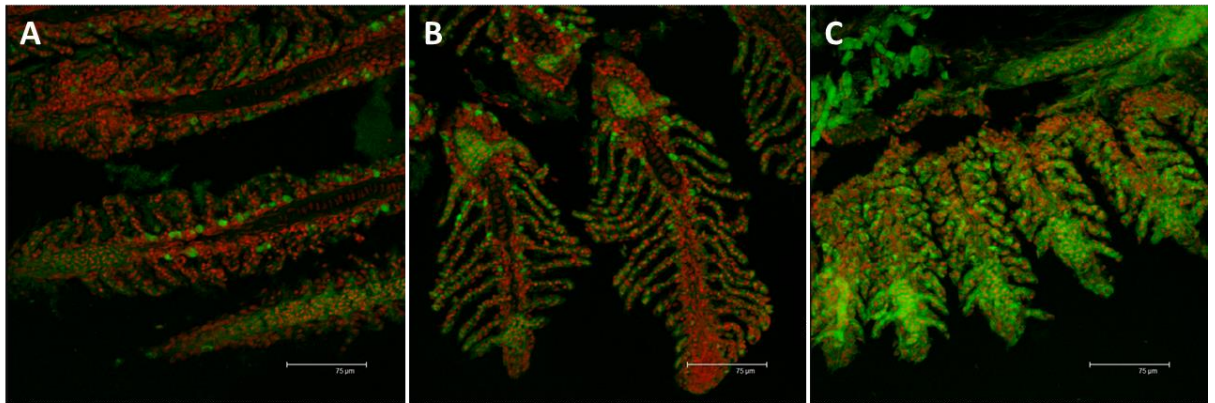
**Fig. VI.9:** (A) alto ingrandimento dei lunghi processi nelle PVCs (asterisco) e formazione di edema nella porzione distale delle lamelle (stella); (B) degenerazione ed apoptosi delle PVCs (asterisco) con la scomparsa delle PCs. Tutte le barre 2 µm.

### **VI.3 IMMUNOLocalizzazione di Proteine Target nelle Branchie di *D. rerio***

#### ***VI.3a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi***

L'immunolocalizzazione ha permesso di evidenziare come in condizioni basali, la pompa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi sia presente nella porzione interlamellare del filamento principale, esclusivamente a livello delle CCs, mettendo così in luce la notevole attività di questa tipologia cellulare negli esemplari di controllo. In particolare, la fluorescenza è apprezzabile a livello citoplasmatico e mette inoltre in mostra l'ampio corpo cellulare delle CCs (Fig. VI.10a). Dopo 96 h di esposizione a 7.7 µg/L di cloruro di mercurio, l'espressione della proteina diminuisce rispetto alle condizioni basali ma alcune cellule immunoreattive sono evidenti anche a livello delle lamelle secondarie (Fig. VI.10b).

Sempre dopo 96 h di esposizione, questa volta alla concentrazione di 38.5 µg/L di cloruro di mercurio, il pattern di distribuzione della pompa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi aumenta notevolmente rispetto a quanto apprezzato sia in condizioni basali che dopo esposizione alla bassa concentrazione e si riscontrano numerose cellule che mostrano una positività del segnale a livello lamellare (Fig. VI. 10c).



**Fig. VI. 10.** Sezioni branchiali marcate con un anticorpo contro la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi (verde-FITC); nuclei marcati con ioduro di propidio (rosso); (A) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi localizzata nelle CCs della regione interlamellare in condizioni basali; (B) alla bassa concentrazione l'immunoreattività per la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi è fortemente diminuita rispetto alle condizioni basali, ma il segnale fluorescente appare a livello dell'epitelio secondario; (C) all'alta concentrazione l'espressione della Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi aumenta sia nel filamento che nell'epitelio lamellare. Tutte le barre 75 µm.

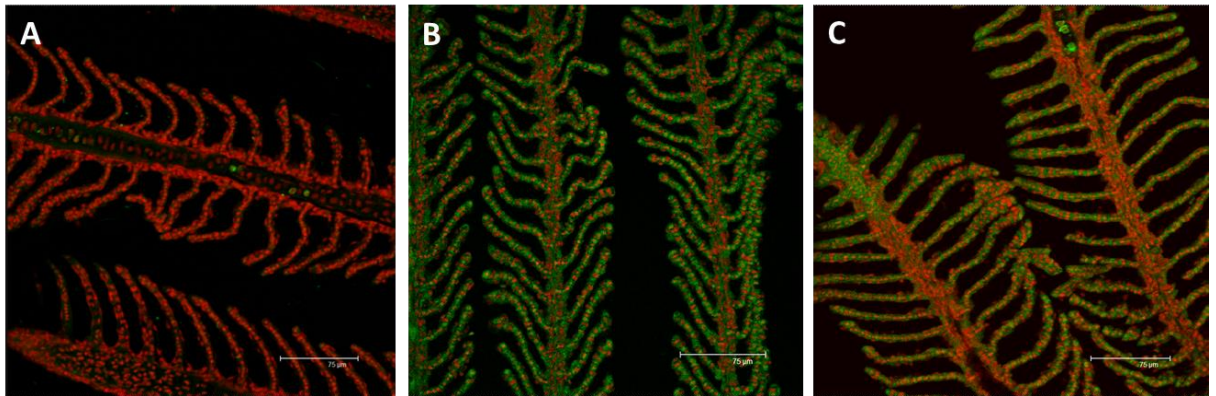
### **VI.3b METALLOTIONEINA**

I risultati dell'analisi funzionale per le MTs, mostrano l'assenza della proteina nelle branchie degli esemplari di controllo di *D. rerio* (Fig. VI.11a).

Dopo 96 ore di esposizione nelle branchie degli esemplari esposti a 7.7 µg/L di cloruro di mercurio, è possibile notare un incremento dell'immunoreattività relativa a tale proteina a livello del filamento principale, ma soprattutto a livello del filamento secondario (Fig. VI.11b).

Lo stesso pattern d'immunolocalizzazione interessa le branchie degli esemplari esposti alla concentrazione più alta del contaminante. Infatti anche nelle branchie trattate con 38.5

$\mu\text{g/L}$  di cloruro di mercurio, sono numerose le cellule che esprimono un'immunopositività di segnale per la metallotioneina, sia a livello del filamento principale che a livello delle lamelle branchiali (Fig. VI.11c). Tuttavia, l'intensità della marcatura è inferiore rispetto a quanto osservato nel gruppo esposto alla bassa concentrazione.

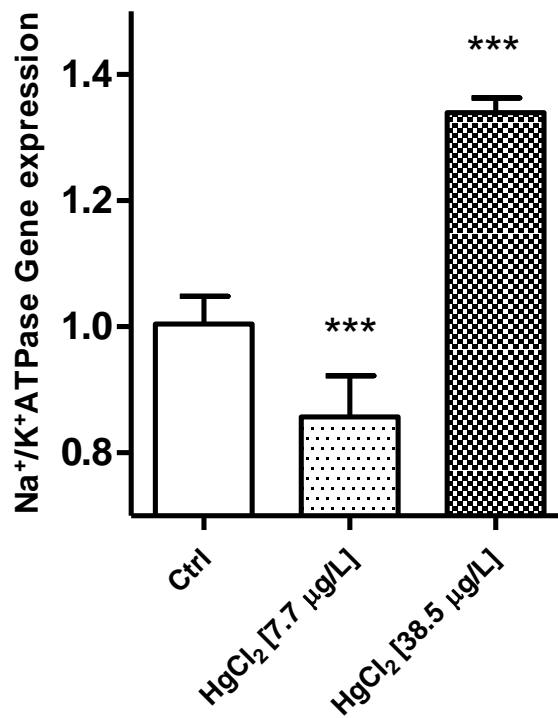


**Fig. VI. 11.** Sezioni branchiali marcate con un anticorpo contro le MTs (verde-FITC); nuclei marcati con ioduro di propidio (rosso); (A) nessuna espressione delle MTs nelle branchie del gruppo di controllo; (B) alla bassa concentrazione l'immunoreattività per le MTs aumenta sia nell'epitelio primario sia in quello secondario; (C) all'alta concentrazione l'intensità della colorazione leggermente diminuisce rispetto alle condizioni basali sia nell'epitelio primario sia nell'epitelio lamellare. Tutte le barre 75  $\mu\text{m}$ .

## VI.4 ANALISI MOLECOLARE: REAL-TIME PCR

### VI.4a $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi

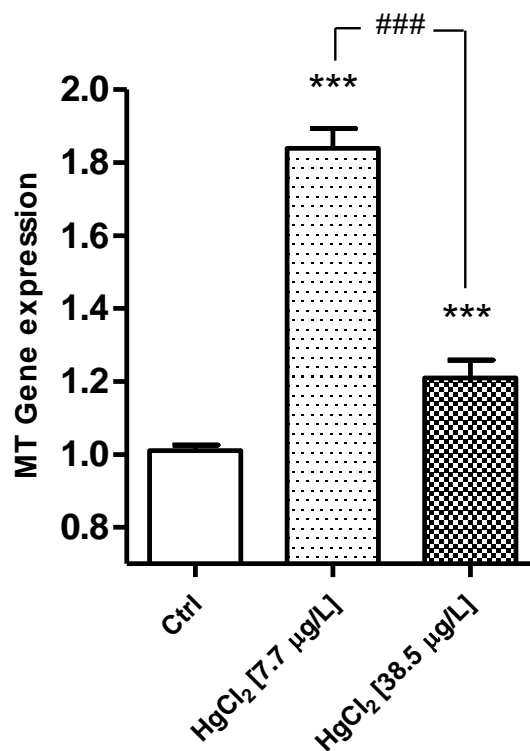
Anche nel caso dell'espressione relativa alla pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi, l'analisi genetica rivela una significativa modulazione dopo esposizione a  $\text{HgCl}_2$ . Il livello di espressione genica della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi è significativamente down-regolato nel gruppo esposto alla bassa concentrazione rispetto al gruppo di controllo ( $p < 0.001$ ). Al contrario, dopo esposizione all'alta concentrazione di  $\text{HgCl}_2$ , il gene è significativamente up-regolato comparato alle condizioni basali ( $p < 0,001$ ) (Fig. VI.12).



**Fig. VI.12:** Variazioni relative all'espressione genica delle Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi nell'apparato branchiale di *D. rerio* in condizioni basali e dopo 96 ore di esposizione ad HgCl<sub>2</sub> [7,7-38,5 µg/L]. Le barre mostrano la media ± S.D, n = 6. Gli asterischi indicano i gruppi trattati che differiscono dal controllo, \*\*\* p <0.001 (One way ANOVA seguito da Bonferroni post hoc test).

#### **VI.4b METALLOTIONEINA**

L'analisi genetica di RT-PCR conferma un aumentato tasso di espressione per le MTs dopo esposizione ad entrambi i gruppi sperimentali (p <0.001), rispetto al controllo. In particolare il tasso di modulazione è maggiore nel gruppo esposto alla bassa concentrazione come mostrato in Fig. VI.13.



**Fig. VI.13** :Variazioni relative all'espressione genica delle MTs nell'apparato branchiale di *D. rerio* in condizioni basali e dopo 96 ore di esposizione ad HgCl<sub>2</sub> [7,7-38,5 µg/L]. Le barre mostrano la media ± S.D, n = 6. Gli asterischi indicano i gruppi trattati che differiscono dal controllo, \*\*\* p <0,001; i cancelletti indicano le differenze tra i gruppi trattati con ### p <0.001 (One way ANOVA seguito da Bonferroni post hoc test).

## VI.6 STRUTTURA ED ULTRASTRUTTURA DEL FEGATO DI *D.*

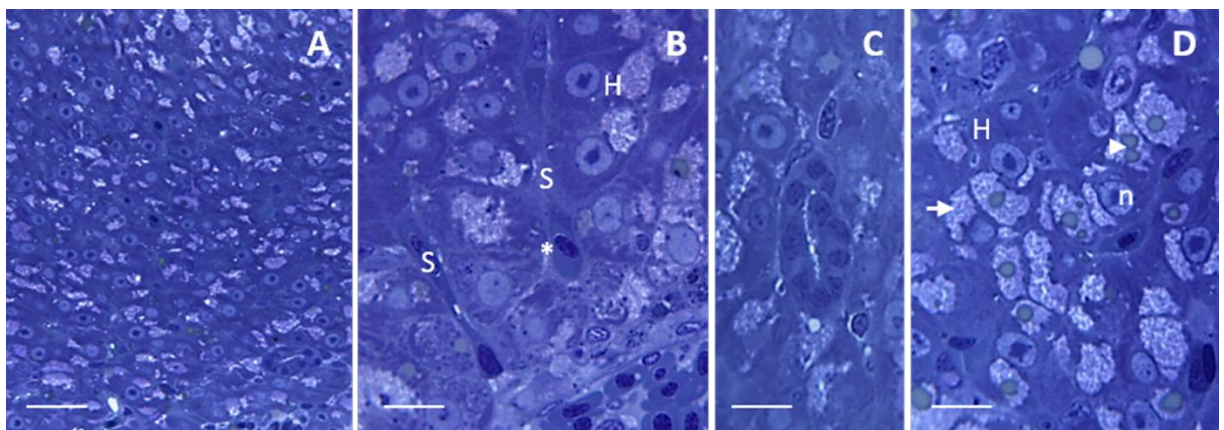
### *RERIO*

La morfologia e l'ultrastruttura del tessuto epatico di *D. rerio* sono state precedentemente studiate (Braunbeck *et al.*, 1990; Yao *et al.*, 2012) e solo una generale descrizione relativa al presente lavoro è stata fornita. Il fegato di zebrafish è un organo denso collocato nella parte craniale della cavità addominale a partire dalla posizione caudale del cuore e circonda l'intero tratto digestivo. I tipici lobuli epatici e l'area portale, non sono presenti ed inoltre, vi sono poche prove per sostenere l'esistenza di un'arteria epatica. Il sangue entra



nel fegato attraverso la vena porta che si dirama direttamente nei sinusoidi che convergono, a loro volta, alla vena centrale che trasporta il sangue fuori dal fegato.

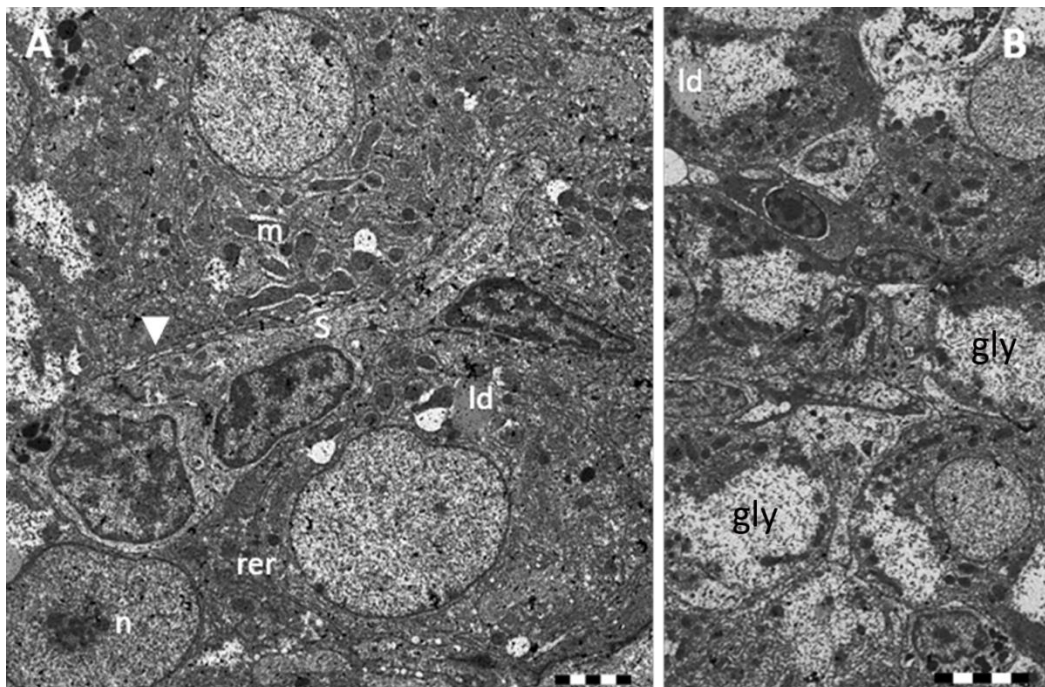
Osservato al microscopio ottico, il fegato di zebrafish, mostra un parenchima omogeneo composto di epatociti (Fig. IV. 14a) che circondano una rete di sinusoidi. Gli epatociti che circondano i sinusoidi sono disposti in due file che danno origine a cordoni mentre, il lume sinusoidale, è fiancheggiato da un endotelio continuo in cui non è presente alcuna lamina basale. Lo spazio di Disse (chiamato anche spazio perisinusoidale) si estende tra l'endotelio dei sinusoidi e gli epatociti. Gli epatociti mostrano dimensioni uniformi e contengono un nucleo di grandi dimensioni situato nel centro della cellula; il nucleolo è denso e solitamente ben evidente (Fig. IV.14b). Il parenchima epatico è drenato da un reticolo di strutture circolari chiamati dotti biliari, racchiusi da un epitelio cubico (Fig. IV.14c). All'interno del citoplasma, goccioline lipidiche, spesso circondate da numerosi granuli di glicogeno, sono visibili (Fig. IV.14d).



**Fig. IV.14:** (A) organizzazione omogenea del parenchima epatico. Barra 25  $\mu\text{m}$ ; (B) gli epatociti (H) che circonda i sinusoidi (S) sono disposti in cordoni. Lo spazio di Disse (asterisco) è compreso tra gli epatociti e l'endotelio dei sinusoidi. Barra 10  $\mu\text{m}$ ; (C) i dotti biliari sono racchiusi da un epitelio cubico. Barra 10  $\mu\text{m}$ ; (D) gli epatociti contengono diverse gocce lipidiche (punta di freccia) e numerosi granuli di glicogeno (freccia), n=nucleo. Barra 10  $\mu\text{m}$ . Tutte le foto colorate in blu di toluidina.



Le osservazioni al TEM mostrano come lo spazio di Disse sia una regione poco elettrondensa, mentre il citoplasma degli epatociti, mostra un alto grado di elettrondensità ed è caratterizzato da un reticolo endoplasmatico rugoso (RER) ben sviluppato, che spesso corre parallelamente alla membrana cellulare ed alla membrana nucleare (Fig. IV.15a). All'interno del citoplasma sono presenti numerosi mitocondri di forma diversa (sferica ed ovoidale) ed un complesso del Golgi poco sviluppato, mentre il reticolo endoplasmatico liscio (SER) non è apprezzabile. Una grande quantità di granuli di glicogeno a bassa densità si trova alla periferia del citoplasma epatica e diverse piccole gocce lipidiche possono essere osservate. Il nucleo è sferico oppure ovoidale e si trova in genere al centro della cellula; l'eucromatina è granulata ed occupa la maggior parte del nucleo mentre l'eterocromatina è distribuita alla periferia. Il nucleolo altamente elettrondenso è spesso situato nella regione centrale del nucleo (Fig. IV.15b).



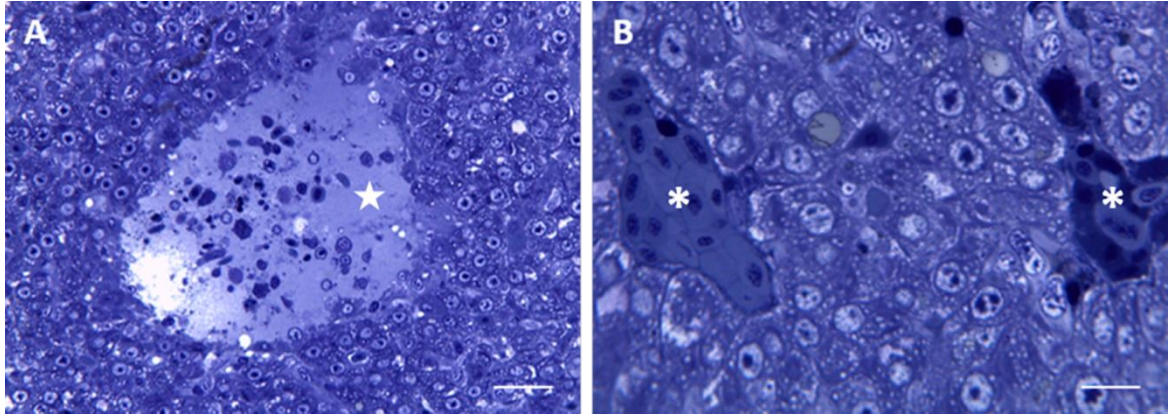
**Fig. IV.15:** (A) alto ingrandimento di epatociti ad che circondano un sinusoido; punta di freccia=spazio di Disse. m = mitocondri; n = nucleo; rer = reticolo endoplasmatico rugoso. Barra 2 µm; (B) goccioline lipidiche (LD) e riserve di glicogeno (gli). Barra 5 µm.

## VI.7 STRUTTURA ED ULTRASTRUTTURA DEL FEGATO DI *D. RERIO* DOPO ESPOSIZIONE A CLORURO DI MERCURIO

### VI.7a ESPOSIZIONE A 7.7 $\mu\text{g/L}$ DI $\text{HgCl}_2$

Dopo 96 ore di esposizione a 7,7  $\mu\text{g/L}$  di  $\text{HgCl}_2$ , l'osservazione istologica rivela gravi alterazioni nella morfologia del fegato degli animali trattati rispetto agli esemplari di controllo. Il parenchima epatico subisce cambiamenti degenerativi, è possibile osservare grandi aree di lisi (Fig. VI.16a) mentre il lume dei sinusoidi e delle vene appare pieno di globuli rossi (Fig. VI.16b).

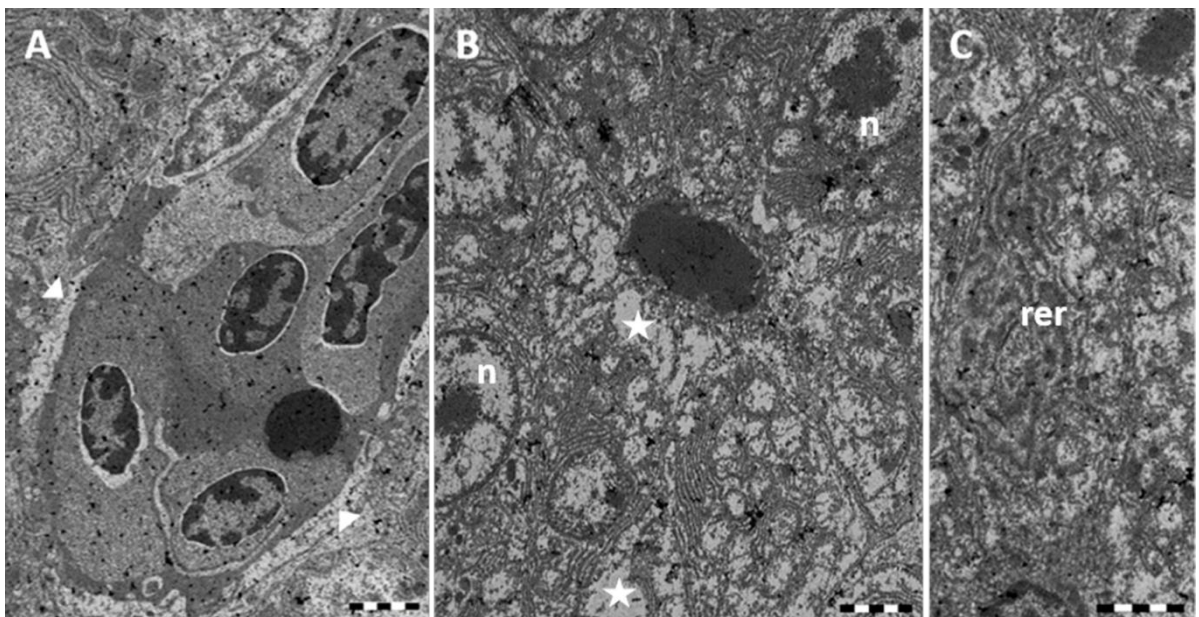
I principali cambiamenti osservati nel parenchima epatico degli esemplari esposti ad  $\text{HgCl}_2$ , includono un'intensa vacuolizzazione citoplasmatica degli epatociti ed una diminuzione nel contenuto sia delle goccioline lipidiche sia dei granuli di glicogeno (Fig. VI.16b).



**Fig. VI.16:** (A) zona lisata nel parenchima epatico (stella). Barra 25  $\mu\text{m}$ ; (B) vacuolizzazione citoplasmatica degli epatociti; presenza di vasi occlusi (asterisco). Barra 10  $\mu\text{m}$ . Tutte le foto colorate in blu di toluidina.

Le osservazioni ultrastrutturali rivelano inoltre una modificazione nella tipica architettura dello spazio di Disse, con degenerazione delle cellule endoteliali e la congestione dei vasi sanguigni (Fig. VI.17a). Le osservazioni al TEM inoltre, confermano la vacuolizzazione

cospicua del citoplasma degli epatociti che si mostra ampiamente elettrone-chiaro (Fig. VI.17b). Sono anche evidenti la dilatazione e la frammentazione delle cisterne del RER e la diminuzione delle riserve di glicogeno (Fig. VI.17b, VI.17c). I Nuclei spesso perdono la loro forma tondeggianti ed è apprezzabile un cambiamento sia nella distribuzione sia nella quantità di eterocromatina presente al loro interno (Fig. VI.17b). A tutto questo si aggiunge l'impossibilità di una chiara distinzione degli organelli citoplasmatici degli epatociti (Fig. VI.17b, VI.17c).



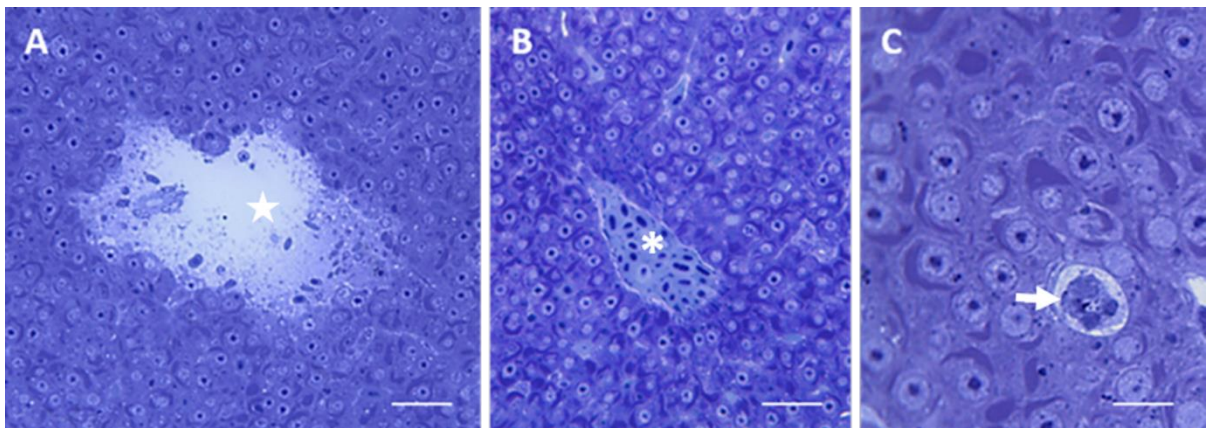
**Fig. VI.17:** (A) alterazioni nello spazio del Disse (punta di freccia); (B) ampie lacune citoplasmatiche (stella); nuclei (n) danneggiati; (C) reticolo endoplasmatico rugoso (RER) notevolmente dilatato e frammentato. Tutte le barre 2  $\mu\text{m}$ .

### ***VI.7b ESPOSIZIONE A 38.5 $\mu\text{g/L}$ DI $\text{HgCl}_2$***

Dopo 96 ore di esposizione all'alta concentrazione di cloruro di mercurio, la morfologia del fegato degli esemplari trattati, appare notevolmente alterata. Nel parenchima epatico, cospicue aree di lisi sono evidenti (Fig. VI.18a) insieme alla congestione dei vasi (Fig. VI.18b).



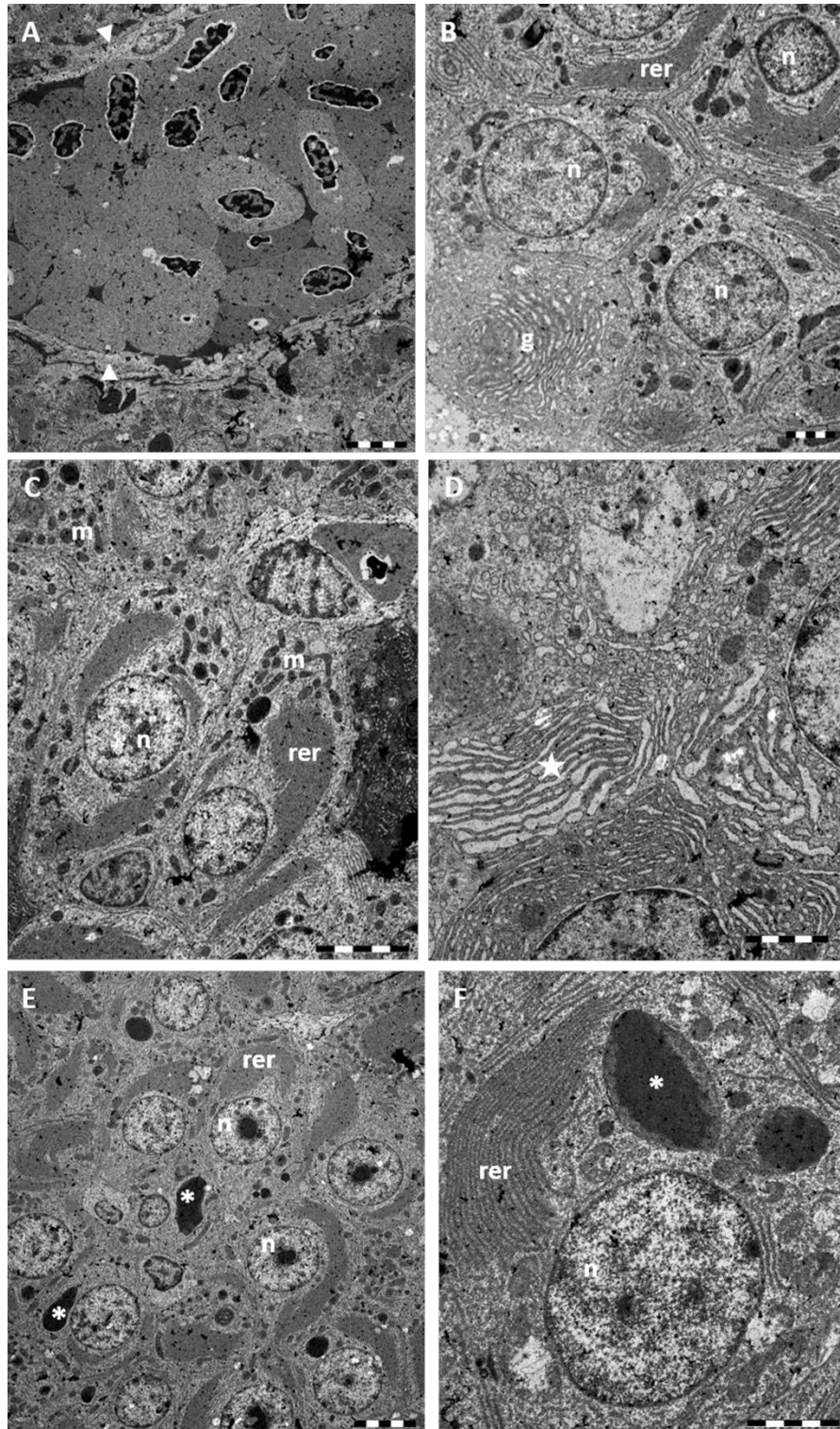
In questo caso, il parenchima epatico degli esemplari di zebrafish esposti, non presenta vacuolizzazioni citoplasmatiche, ma la caratteristica più evidente è la presenza di un grande ed esteso RER solitamente localizzato alla periferia del nucleo (Fig. VI.18c). Una diminuzione del contenuto delle goccioline lipidiche e dei granuli di glicogeno è chiaramente osservabile (Fig. VI.18b, VI.18c), nonché la presenza di diversi epatociti degenerati all'interno del parenchima epatico (Fig. VI.18c).



**Fig. VI.18:** (A) grande area di lisi nel parenchima epatico (stella). Barra 25  $\mu\text{m}$ ; (B) occlusione di alcuni vasi sanguigni (asterisco). Barra 25  $\mu\text{m}$ ; (C) degenerazione cellulare (freccia). Barra 10  $\mu\text{m}$ . Tutte le foto colorate in blu di toluidina.

Con l'analisi al TEM, è possibile confermare le alterazioni a carico dello spazio di Disse, già apprezzate dopo esposizione alla concentrazione più bassa di cloruro di mercurio e la presenza di numerosi globuli rossi nel lume dei sinusoidi e delle vene (Fig. VI.19a). Le osservazioni ultrastrutturali forniscono un'ulteriore prova del grande sviluppo relativo al RER, che occupa gran parte del citoplasma elettron-chiaro degli epatociti (Fig. VI.19b, VI.19f); il cospicuo sviluppo dell'apparato del Golgi è ben visibile (VI.19b). I numerosi mitocondri, sparsi nel citoplasma delle cellule epatiche, mostrano un leggero aumento di elettrone-densità (VI.19b, VI.19c). Nella parte centrale del nucleo inoltre, è possibile

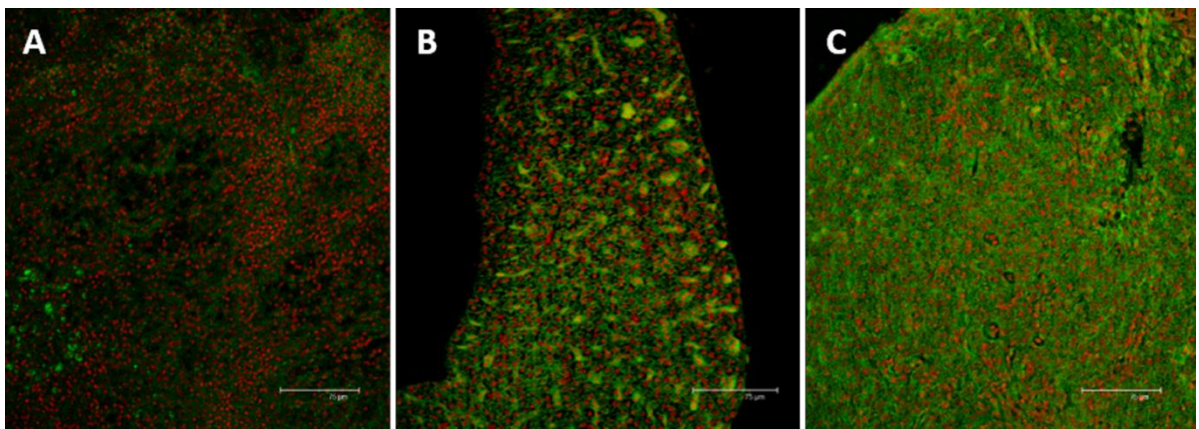
apprezzare un nucleolo, di notevoli dimensioni, mentre l'eterocromatina è localizzata nella porzione più periferica del nucleo (Fig. VI.19b, VI.19f). Sparsi all'interno del parenchima epatico sono stati osservati diversi epatociti in avanzato stato di degenerazione (Fig. VI.19c); inoltre il rigonfiamento delle cisterne del RER ed alcuni nuclei picnotici sono chiaramente apprezzabili (Fig. VI.19b, VI.19c). È importante sottolineare come sparsi all'interno del citoplasma degli epatociti compaiono numerosi e atipici granuli elettron-densi, non apprezzati negli esemplari del gruppo di controllo (Fig. VI.19c, VI.19e).



**Fig. VI.19:** (A) occlusione dei vasi sanguigni e danneggiamento a carico dello spazio di Disse (punta di freccia). Barra 5  $\mu$ m; (B) il RER aumenta ed occupa la maggior parte del citoplasma; l'apparato del Golgi è ben sviluppato (g); degenerazione degli epatociti e presenza di nuclei picnotici. Barra 2  $\mu$ m; (C) Numerosi mitocondri (m) sparsi nel citoplasma. Barra 5  $\mu$ m; (D) alto ingrandimento del RER; si nota in diversi punti, il rigonfiamento delle cisterne (stella). Barra 2  $\mu$ m; (E) nella porzione centrale del nucleo il grande nucleolo è evidente. Nel citoplasma possiamo osservare l'abbondante RER e la presenza di atipici granuli elettron-densi (asterisco). Barra 5  $\mu$ m; (F) alto ingrandimento dei granuli elettron-densi (asterisco). Barra 2  $\mu$ m.

## VI.8 IMMUNOLOCALIZZAZIONE DELLA METALLOTIONEINA NEL FEGATO DI *D. RERIO*

Nel fegato degli esemplari di *D. rerio* provenienti dal gruppo di controllo, pochissime cellule mostrano immunoreattività per le MTs (Fig. VI.20a). Al contrario, dopo 96 ore di esposizione alla bassa concentrazione, l'analisi immunohistochimica rivela un aumento significativo dell'espressione relativa alle MTS nel fegato degli esemplari trattati. In particolare, le cellule che mostrano una spiccata immunoreattività per la proteina target, sono localizzate in tutto il parenchima epatico (Fig. VI.20b). Al termine del periodo di esposizione, anche gli esemplari esposti alla concentrazione più alta di cloruro di mercurio, mostrano un aumento del pattern di espressione delle MTs rispetto alle condizioni basali ed, anche in questo caso, le cellule epatiche che mostrano immunoreattività sono distribuite in tutto il parenchima epatico (Fig. VI.20c).



**Fig. VI.20:** sezioni di fegato marcate con un anticorpo monoclonale anti MT (verde-FITC); nuclei marcati con ioduro di propidio (rosso). (A) i campioni di controllo non hanno rivelato o rivelano un debole segnale per la MT; (B) dopo 96 h di esposizione alla bassa concentrazione l'immunoreattività può essere osservata nel citoplasma degli epatociti; (C) dopo 96 h di esposizione alla alta concentrazione, l'intensità della colorazione aumenta ed il segnale è presente soprattutto nelle zone danneggiate. Tutte le barre 75 µm.

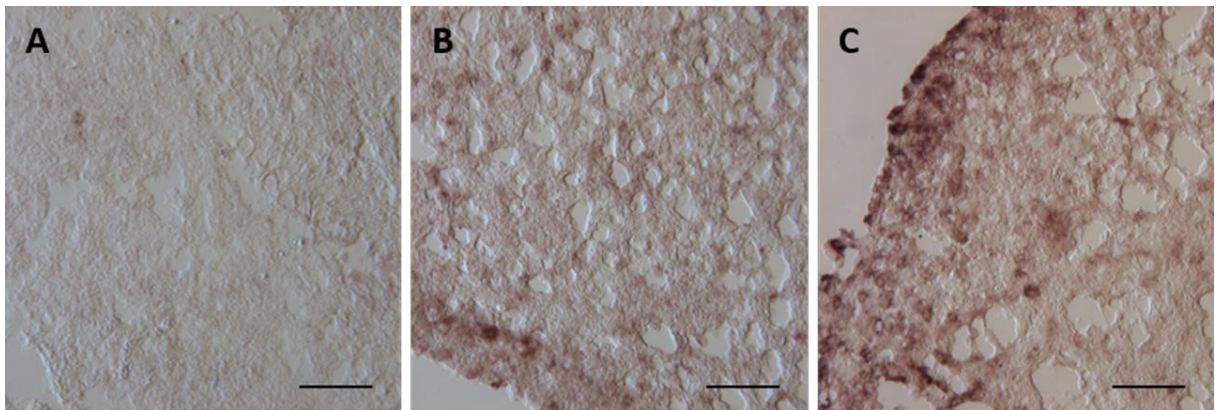


## VI.9 ANALISI MOLECOLARE METALLOTIONEINA NEL FEGATO

### DI *D. RERIO*

#### VI.9a IBRIDAZIONE IN SITU

Per quanto riguarda la presenza dell'mRNA che trascrive per la metallothioneina nel fegato di *D. rerio*, nel gruppo di controllo, il segnale d'ibridazione è talmente debole da non permettere l'identificazione delle cellule che esprimono l'*mt* mRNA (Fig. VI.21a). Rispetto al gruppo di controllo, un segnale positivo d'ibridazione è stato osservato nel fegato dei campioni esposti alla bassa concentrazione. In particolare, un marcato aumento del segnale era presente nell'intero parenchima, con un picco di reattività localizzato nel citoplasma degli epatociti (Fig. VI.21b). Nei campioni appartenenti al gruppo esposto all'alta concentrazione di cloruro di mercurio, il segnale di trascrizione osservato a livello del parenchima epatico, mostra un'intensità leggermente maggiore rispetto a quella rilevata nel gruppo esposto alla bassa concentrazione. In particolare, il segnale è stato osservato all'interno di tutto il tessuto epatico, con un'intensità di espressione maggiore nella porzione periferica (Fig. VI.21c).

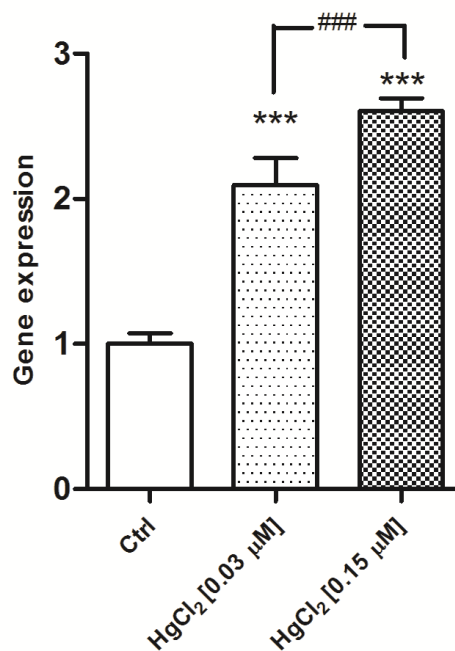


**Fig. VI.21:** (A) debole segnale d'ibridazione dell'*mt* mRNA nei campioni di controllo; (B) dopo 96 h di esposizione alla bassa concentrazione di HgCl<sub>2</sub>, il citoplasma degli epatociti mostra un segnale d'ibridazione positivo; (C) aumento del segnale d'ibridazione nel fegato degli animali esposti alla alta concentrazione di HgCl<sub>2</sub>. Tutte le barre 45µm.



### VI.9b REAL-TIME PCR

L'analisi genetica di real-time PCR, ha evidenziato un tasso di espressione tessuto-specifico. L'espressione genetica basale delle MTs nel fegato di zebrafish è minima, ma il gene ha mostrato una modificazione significativa della sua espressione in entrambi i trattamenti dopo 96 ore di esposizione ad HgCl<sub>2</sub> (Fig. VI.22). In particolare l'espressione del gene era significativamente aumentata ( $p < 0,001$ ) nei campioni esposti alla bassa concentrazione di cloruro di mercurio rispetto al gruppo di controllo. I livelli di modulazione del gene hanno comunque mostrato una risposta più alta nel fegato degli esemplari esposti all'alta concentrazione del contaminante; in particolare in quest'ultimo gruppo, l'espressione delle MTs era significativamente aumentata ( $p < 0,001$ ) sia rispetto alle condizioni basali che rispetto agli esemplari esposti alla bassa concentrazione (Fig. VI.22).



**Fig. VI.22:** Variazioni relative all'espressione genetica delle MTs nel fegato di *D. rerio* in condizioni basali e dopo 96 ore di esposizione ad HgCl<sub>2</sub> [7.7-38.5 µg/L]. Le barre mostrano la media ± S.D., n = 6. Gli asterischi indicano i gruppi trattati che differiscono dal controllo, \*\*\*  $p < 0,001$ . I cancelletti indicano la differenza tra i gruppi trattati, ###  $p < 0,001$  (One way ANOVA seguito da Bonferroni post hoc test).

# CAPITOLO VII

## DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Nel nostro studio i cambiamenti funzionali e molecolari sono stati correlati alle perturbazioni morfologiche ed ultrastrutturali indotte nell'apparato branchiale e nel fegato di *D. rerio* dopo esposizione acuta a due basse concentrazioni di HgCl<sub>2</sub>.

I cambiamenti morfo-funzionali osservati confermano come il mercurio sia una sostanza estremamente tossica tanto da essere stata classificata, a livello mondiale, come uno dei 10 contaminanti di maggiore preoccupazione per la salute pubblica (WHO, 2010).

Tale metallo pesante influenza inoltre, in maniera rilevante, l'equilibrio ionico ed osmotico come testimoniato dalla modulazione sia a livello funzionale che molecolare, dell'espressione della pompa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi.

Nel monitoraggio delle contaminazioni ambientali, gli indicatori biologici sono considerati di fondamentale importanza per indagare gli effetti tossici degli inquinanti chimici (Ivanković *et al.*, 2005; Sinaie *et al.*, 2010; Jaishankar *et al.*, 2014) ed, a tal proposito, le metallotioneine si confermano dei precoci biomarker di stress indotto dall'esposizione a metalli pesanti.

### **VII.1 ANALISI MORFOLOGICA ED ULTRASTRUTTURALE DELL'APPARATO BRANCHIALE DI *D. RERIO***

Le alterazioni morfologiche e funzionali a carico delle branchie rappresentano una delle risposte più significative alla presenza di sostanze inquinanti nell'ambiente acquatico (Mallatt, 1985; Laurent and Perry, 1991; Au, 2004). Le branchie dei pesci oltre a svolgere

l'importante funzione respiratoria, hanno molteplici compiti: giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'equilibrio idro-elettrolitico ed acido-base, regolano l'escrezione azotata e rappresentano uno dei principali siti d'ingresso dei metalli pesanti (Evans *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2000).

Diversi lavori hanno studiato gli effetti del mercurio sull'apparato branchiale, tuttavia la maggior parte dei dati disponibili sono relativi agli effetti indotti dal metilmercurio (MeHg), mentre gli effetti del mercurio inorganico sono meno noti. I danni provocati dal mercurio inorganico sull'apparato branchiale dei pesci sono stati investigati solo in poche specie, sia di acqua dolce che di acqua salata (Canli *et al.*, 1996; Jagoe *et al.*, 1996; de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2000; de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002) e quasi tutti gli studi precedenti hanno utilizzato un approccio morfologico puramente qualitativo (Giari *et al.*, 2008).

L'obiettivo della nostra ricerca è di fornire informazioni approfondite per una comprensione più ampia degli effetti indotti dal mercurio sulle branchie dei pesci, utilizzando un approccio morfo-funzionale. Nel presente lavoro abbiamo dimostrato che l'esposizione a breve termine a due concentrazioni di cloruro di mercurio, è in grado di indurre severe alterazioni morfologiche dell'apparato branchiale di *D. rerio*, modificando inoltre il pattern di espressione della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi e delle MTs ed in base alle nostre conoscenze, questo è il primo studio che descrive gli effetti morfologici ed ultrastrutturali del mercurio inorganico sull'apparato branchiale di zebrafish.

Nel nostro lavoro, abbiamo osservato una grande varietà di alterazioni morfologiche nelle branchie di *D. rerio*, ed i nostri risultati, sono in accordo con precedenti studi che indagavano gli effetti del mercurio inorganico sulle branchie di altre specie (Daoust *et al.*, 1984; Jagoe *et al.*, 1996; de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2000; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002). La gravità delle lesioni da noi riportate si accentua all'aumentare della dose dell'inquinante, portando nel caso della concentrazione più elevata, ad una completa disorganizzazione

morfologica e ad una modificazione della composizione cellulare . I più comuni cambiamenti ultrastrutturali da noi riportati sono: l'iperplasia e l'ectopia delle CCs, la fusione lamellare, l'aumento della secrezione mucosa, le alterazioni ultrastrutturali a carico delle PVCs, il distacco dell'epitelio secondario, la degenerazione delle PCs e l'insorgere di fenomeni di apoptosi. Alcune di queste alterazioni possono facilmente interferire con la fisiologia dell'organo coinvolto, compromettendone il normale funzionamento ed impedendo lo scambio di ioni e di gas.

L'iperplasia dell'epitelio secondario si verifica spesso nelle branchie dei pesci dopo esposizione a metalli pesanti, ed è stata riportata sia in specie d'acqua dolce che marini dopo esposizione a cloruro di mercurio e metilmercurio (Daoust *et al.*, 1984; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2012). Un'alterazione frequentemente osservata nel nostro studio è l'occlusione dello spazio interlamellare dovuto all'iperplasia dell'epitelio secondario. L'iperplasia delle cellule epiteliali potrebbe indicare un aumento del metabolismo cellulare atto a riparare il danno sub-cellulare oppure, potrebbe essere correlata ad un tentativo di disintossicazione cellulare che richiede, tra l'altro, una maggiore sintesi di metallotioneine (Daoust *et al.*, 1984). Tuttavia, l'ispessimento dell'epitelio secondario, aumenta notevolmente la distanza di diffusione tra il sangue e l'acqua, compromettendo di conseguenza il trasferimento di gas e di ioni, come precedentemente riportato in altre specie dopo esposizione a mercurio (Perry *et al.*, 1997; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2000).

In *D. rerio*, la superficie epiteliale, sia del filamento che delle lamelle, è alterata dalla riduzione e/o dalla perdita delle microcreste apicali delle PVCs; queste estroflessioni citoplasmatiche, in condizioni basali, aumentano la superficie per lo scambio respiratorio, ma si suppone svolgano anche un ruolo importante nella regolazione ionica ed osmotica (Pandey *et al.*, 2008). Jagoe e colleghi (1996) suggeriscono che la perdita delle microcreste osservata nelle branchie di *Gambusia holbrooki* dopo esposizione a cloruro di mercurio,

potrebbe essere correlata al rigonfiamento delle cellule pavimentose che a sua volta riflette un'alterazione dei meccanismi di regolazione osmotica. Nel nostro studio abbiamo osservato, piuttosto che il rigonfiamento, il sollevamento delle PVCs, nonostante le alterazioni a carico delle microcreste fossero molto estese. La riduzione delle microcreste è stata precedentemente riportata dopo esposizione ad altre sostanze tossiche e potrebbe rappresentare un tentativo di protezione attivato dalle branchie per ridurre lo scambio con il mezzo acquatico (Brunelli *et al.*, 2008).

Nel nostro studio dopo esposizione alla concentrazione più alta di HgCl<sub>2</sub> abbiamo osservato un cospicuo aumento della secrezione mucosa probabilmente correlato con il tentativo di contrastare l'ingresso della sostanza inquinante nell'organismo. L'aumento di muco è stato osservato sia in specie d'acqua dolce che di acqua marina dopo esposizione a diversi metalli pesanti (Cu, Cd, Fe e Ni) (Franklin, 1990; Brunelli *et al.*, 2011). Questa abbondante produzione mucosa, associata alla riduzione delle microcreste apicali delle PVCs, potrebbe indurre ipossia, come ipotizzato per numerose specie ittiche esposte a diverse condizioni sperimentali (Shepherd, 1994; Liao *et al.*, 2006; Brunelli *et al.*, 2008).

Accanto alle alterazioni epiteliali, abbiamo anche rilevato, in entrambi i gruppi sperimentali, importanti alterazioni nella struttura del sistema vascolare a livello delle lamelle, rappresentate principalmente dalla degenerazione delle pillar cells, le cellule deputate alla regolazione del flusso sanguigno capillare. Alterazioni a carico delle PCs sono già state riportate dopo esposizione a mercurio (de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Mazon *et al.*, 2002) e ad altri metalli pesanti (Haaparanta *et al.*, 1997; Olojo *et al.*, 2005; Brunelli *et al.*, 2011; Parvathi *et al.*, 2011). Alcuni autori suggeriscono che la modificazione di questo tipo cellulare potrebbe compromettere i normali scambi fisiologici provocando anche la comparsa di aneurismi (Van den Heuvel *et al.*, 2000; de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Brunelli *et al.*, 2008).

I nostri risultati sostengono fortemente l'ipotesi che la tossicità della forma inorganica del mercurio induca innanzitutto l'ipossia e la perdita della stabilità osmotica e ionica dell'apparato branchiale. Tuttavia i meccanismi di assorbimento e l'azione tossica del mercurio inorganico sulle branchie dei pesci richiedono ulteriori approfondimenti e ricerche (Jagoe *et al.*, 1996; de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Giari *et al.*, 2008).

Altre alterazioni frequentemente osservate nelle branchie di *D. rerio* dopo esposizione a mercurio sono il distacco epiteliale e la degenerazione cellulare. Il distacco epiteliale è una delle risposte più comuni nelle specie d'acqua dolce dopo esposizione ad inquinanti (Mallatt, 1985). Questo fenomeno è stato precedentemente riportato nelle lamelle secondarie di *Dicentrarchus labrax* dopo esposizione a 251, 355 e 501 µg/L di mercurio (Giari *et al.*, 2008), ed in *Channa punctata* dopo esposizione ad una miscela di metalli pesanti (Franklin, 1990). Jagoe e collaboratori invece (1996), non hanno rilevato alterazioni simili in esemplari di *Gambusia holbrooki* esposti a concentrazioni molto basse di mercurio, suggerendo che questa risposta patologica potrebbe essere indotta solo da una esposizione a dosi elevate di mercurio. Nel nostro studio, il distacco epiteliale insorge dopo esposizione a due concentrazioni molto basse di HgCl<sub>2</sub>, corrispondenti al 10% ed al 50% della concentrazione letale media a 96 ore (LC50<sub>96</sub>) (Vutukuru *et al.*, 2013), portandoci ad ipotizzare che questa risposta epiteliale al metallo pesante, possa essere specie-specifica.

Come già accennato, negli esemplari di zebrafish, l'intensità del danno cellulare aumenta con l'aumentare della concentrazione di mercurio e sono state osservate numerose cellule apoptotiche e necrotiche. L'apoptosi e la degenerazione cellulare sono state riportate nelle branchie dei pesci in conseguenza a diversi tipi di perturbazioni chimiche e fisiche del mezzo acquatico (Daoust *et al.*, 1984; Giari *et al.*, 2008). In particolare, Mallatt (1985) ha sottolineato come la necrosi dell'epitelio branchiale sia spesso associata all'esposizione a metalli pesanti e tale lesione, è stata riportata in *Dicentrarchus labrax* dopo esposizione acuta a mercurio (Giari *et al.*, 2008). Daoust e collaboratori (1984) hanno evidenziato

invece, in *Oncorhynchus mykiss*, l'instaurarsi di fenomeni apoptotici nelle PVCs dopo 96 ore di esposizione a cloruro di mercurio. L'evento apoptotico può svolgere un ruolo importante nella regolazione dell'omeostasi tissutale e potrebbe rappresentare una risposta mirata ad evitare fenomeni di necrosi e la cascata infiammatoria correlata.

### *VII.1a Chloride cells*

L'epitelio branchiale dei teleostei è caratterizzato dalla presenza di cellule a cloruro, ossia grandi cellule rotondeggianti tipicamente distribuite lungo il bordo posteriore dell'epitelio principale e a livello interlamellare. Le caratteristiche ultrastrutturali distintive delle CCs sono rappresentate dalla presenza di numerosi mitocondri sparsi nel citoplasma e da un esteso sistema tubolare che si origina dalla membrana basolaterale; tali caratteristiche riflettono l'importante ruolo delle CCs, nel trasporto e nella regolazione ionica (Wilson and Laurent, 2002).

Nel nostro studio uno dei principali effetti indotti dell'esposizione ad  $\text{HgCl}_2$  in zebrafish, è rappresentato dalla proliferazione e dall'ectopia delle CCs che, oltre ad essere abbondanti nell'epitelio lamellare, sono responsabili dell'occlusione degli spazi interlamellari. L'iperplasia delle CCs è spesso riportata in condizioni che possono alterare il normale scambio ionico, come l'esposizione a diverse sostanze inquinanti tra cui i metalli pesanti (Franklin, 1990 Perry, 1997). Un aumento del numero delle CCs è stato riportato nell'apparato branchiale di *Dicentrarchus labrax* (Giari *et al.*, 2008) ed in quello di *Gambusia holbrooki* (Jagoe *et al.*, 1996) dopo esposizione a mercurio e si presume possa essere correlato al tentativo da parte dell'epitelio di raggiungere l'equilibrio ionico.

È interessante notare come, nel presente lavoro, insieme all'aumento del numero delle CCs, abbiamo notato anche la comparsa di una cripta apicale nelle nuove CCs a livello lamellare. Nelle specie marine ed in alcune specie eurialine acclimatate all'acqua di mare,

le CCs formano complessi multicellulari con le cellule accessorie (Evans *et al.*, 1999; Wilson and Laurent, 2002; Evans *et al.*, 2005) e la loro membrana è in genere fornita di una cripta apicale (Carmona *et al.*, 2004). Recentemente è stato suggerito che il micro-ambiente che si crea a livello di queste profonde invaginazioni apicali, possa svolgere un ruolo importante nel determinare l'assorbimento di ioni attraverso la generazione di un gradiente positivo e quindi provocare, un miglioramento nell'attività dei canali e dei trasportatori di membrana (Sinha *et al.*, 2014). Inoltre, a livello della cripta apicale delle CCs è stata scoperta una sostanza mucosa e poli-anionica (Powell *et al.*, 1996) che sembra essere correlata al mantenimento di un gradiente di concentrazione ionico (Carmona *et al.*, 2004). Pertanto, sulla base dei nostri dati è concepibile che, sia l'aumento nel numero delle CCs che il ri-arrangiamento della loro porzione apicale, svolgano un ruolo importante nella regolazione dell'omeostasi osmotica ed ionica.

## **VII.2 ANALISI FUNZIONALE E MOLECOLARE DEGLI EFFETTI DEL MERCURIO SULL'APPARATO BRANCHIALE DI *D. RERIO***

### ***VII.2a ESPRESSIONE DELLA POMPA $Na^+/K^+$ -ATPasi***

Secondo l'attuale modello relativo al movimento trans epiteliale degli ioni nelle branchie dei teleostei d'acqua dolce, (Foskett and Scheffey, 1982; McCormick *et al.*, 2006) la pompa  $Na^+/K^+$ -ATPasi è localizzata a livello delle cellule a cloruro (Hirose *et al.*, 2003). Molti studi hanno riportato che l'attività della  $Na^+/K^+$ -ATPasi è influenzata da diversi contaminanti dopo un'esposizione sia a breve che a lungo termine (Watson and Beamish, 1980; Watson and Benson, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; De la Torre *et al.*, 2007; Brunelli *et al.*, 2008) ed in particolare questo enzima è anche considerato un sensibile biomarker di esposizione ai metalli pesanti (Ay *et al.*, 1999).



I metalli pesanti generalmente provocano l'inibizione della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi nell'apparato branchiale, come riportato in zebrafish (Griffitt *et al.*, 2007) ed in *Oreochromis niloticus* dopo esposizione a rame (Monteiro *et al.*, 2005). Atli e Canli (2007) hanno riscontrato in *Oreochromis niloticus* una diminuita espressione della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi dopo esposizione a Cd, Cu, Zn, ma un aumento dopo esposizione a Pb. Questi ultimi autori hanno supposto che la migliorata attività della pompa dopo trattamento con il Pb, possa dipendere da un adattamento della branchia alla continua esposizione al metallo pesante (Atli and Canli, 2007).

Per quanto riguarda il mercurio, una forte correlazione negativa tra la concentrazione delle sostanze inquinanti e l'attività della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi è stata riportata in esemplari di *Platichthys flesus* provenienti da una zona contaminata da mercurio (Stagg *et al.*, 1992) ed una simile inibizione è stata riscontrata anche in *Cirrhinus mrigala* dopo esposizione acuta a  $\text{HgCl}_2$  (0,068 e 0,034 mg/L) (Poopal *et al.*, 2013). Jagoe e colleghi (1996) invece, hanno dimostrato che non vi è alcuna correlazione tra la concentrazione del mercurio nell'ambiente e l'attività della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi nelle branchie di *Micropterus salmoides*.

Nel nostro studio abbiamo chiaramente evidenziato una significativa modulazione dei livelli della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi nelle branchie di *D. rerio*, provenienti da entrambi i gruppi sperimentali, rispetto agli esemplari non trattati. In particolare, abbiamo rilevato una diminuzione nell'espressione enzimatica dopo esposizione alla bassa concentrazione di  $\text{HgCl}_2$ , ma un aumento dopo esposizione alla alta concentrazione. L'incremento significativo della pompa dimostrato mediante analisi di RT-PCR, nel gruppo esposto alla alta concentrazione, è confermato dall'analisi in microscopia confocale, che rivela una intensa immunolocalizzazione a livello delle CCs, comprese quelle situate nelle lamelle. Poiché nel gruppo esposto all'alta concentrazione, il numero delle CCs è notevolmente aumentato e queste cellule abbondano anche a livello lamellare, questo può giustificare l'aumentata espressione della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi.

È tuttavia importante sottolineare che ulteriori studi saranno necessari per comprendere meglio le ragioni che sono alla base della variabilità di risposta osservata nell'espressione di questo enzima in base all'organismo studiato, al tipo di metallo ed alle diverse condizioni sperimentali (Ay *et al.*, 1999).

### ***VII.2b ESPRESSIONE DELLA METALLOTIONEINA***

Le metallotioneine (MTs) sono proteine non enzimatiche a basso peso molecolare e con un alto contenuto in cisteine. I gruppi -SH dei residui di cisteina presenti nella struttura delle metallotioneine, consentono a queste proteine di legare particolari metalli. Si ritiene che esse abbiano un importante ruolo nel controllo omeostatico dei metalli essenziali come Cu e Zn, essendo in grado di renderli disponibili quando necessario per soddisfare le richieste del metabolismo enzimatico (Brouwer *et al.*, 1989;. Viarengo and Nott, 1993; Roesijadi, 1994). Metalli non essenziali come il Cd ed il Hg sono in grado di sostituirsi ai metalli essenziali normalmente associati alle MTs (Amiard and Cosson, 1997). Inoltre, poiché la tolleranza al metallo da parte di un organismo è maggiore quando la proteina viene indotta e quindi espressa a livello cellulare, si pensa che le MTs siano anche coinvolte nella detossificazione da metalli quando questi sono presenti in quantità eccessive (Roesijadi *et al.*, 1982;. George and Olsson, 1994;. Pavicic *et al.*, 1994).

Sulla base della forte correlazione tra l' espressione delle MTs e le concentrazioni ambientali di metalli pesanti, la quantità di tali proteine nella cellula è considerata cruciale per monitorare gli effetti dell'esposizione ai contaminanti e per prevederne gli effetti tossici (Knapen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014).

L'induzione nella sintesi delle MTs da parte di metalli pesanti è stata dimostrata in molte specie di teleostei, sia di acqua dolce che di acqua marina (Lam *et al.*, 1998; Dang *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2016). Nei

teleostei, il ruolo delle MTs a livello dell'apparato branchiale è ancora incerto, a causa dei risultati sperimentali contraddittori. Alcuni autori hanno affermato che le branchie non sarebbero un organo bersaglio utile per la quantificazione delle MTs (Hamza-Chaffai *et al.*, 2000; Olsvik *et al.*, 2001; Bebianno *et al.*, 2007), mentre altri, segnalano la reattività delle MTs nell'epitelio branchiale di due specie di acqua marina provenienti da aree contaminate da mercurio (Mieiro *et al.*, 2011). Inoltre un aumento dei livelli di espressione delle MTs è stata osservato in *Scatophagus argus* dopo solo 72 ore di esposizione a 30 µg/L di mercurio (Nikpour *et al.*, 2008).

La nostra analisi funzionale e molecolare ha rivelato un significativo aumento nell'espressione delle MTs dopo esposizione a HgCl<sub>2</sub> nell'apparato branchiale di *D. rerio*. Tuttavia quando si confrontano i livelli delle MTs tra le due concentrazioni testate, possiamo notare una risposta maggiore nel gruppo esposto alla bassa concentrazione. Questi risultati riflettono il tentativo di disintossicazione cellulare e sono in linea con le alterazioni istopatologiche ed ultrastrutturali descritte. Nel presente studio, infatti, l'apparato branchiale del gruppo esposto alla alta concentrazione ha mostrato segni di degenerazione epiteliale molto intensi che senz'altro sono in grado di interferire con le attività biosintetiche della cellula, nel gruppo esposto alla bassa concentrazione la morfologia branchiale era ancora sostanzialmente mantenuta facendo ipotizzare che anche le attività sintetiche siano ancora integre.

### **VII.3 ANALISI MORFOLOGICA ED ULTRASTRUTTURALE DEL FEGATO DI *D. RERIO***

Le nostre osservazioni sul tessuto epatico di *D. rerio* negli esemplari di controllo, confermano l'organizzazione già descritta da Braunbeck *et al.*, (1990) e da Yao e colleghi

(2012). Il parenchima epatico è omogeneo, composto da epatociti disposti in cordoni, che circondano una rete di sinusoidi che convergono alla vena centrale. I lobuli epatici, le aree portali e le arterie epatiche non sono stati osservati.

Nel nostro studio abbiamo indagato gli effetti di una esposizione acuta a HgCl<sub>2</sub> sul fegato di *D. rerio*. Abbiamo dimostrato che, sebbene le concentrazioni utilizzate fossero molto basse (7,7 e 38,5 µg/L) ed il periodo di esposizione breve, si sono instaurati severi danni epatici, oltre che un significativo aumento nell'espressione delle metallotioneine secondo uno schema dose-dipendente.

Dopo l'esposizione ad entrambe le concentrazioni testate, il fegato di *D. rerio* appare notevolmente alterato, sia da un punto di vista strutturale che ultrastrutturale ed i fenomeni più evidenti sono stati la dilatazione dello spazio di Disse e la comparsa di vaste aree di lisi nel parenchima epatico. Simili modificazioni strutturali e fenomeni di necrosi a carico dello spazio di Disse sono stati riportati in *Hoplias malabaricus* dopo un'esposizione cronica a metilmercurio (Mela *et al.*, 2007). Gli autori hanno suggerito che le cellule endoteliali alterate possano influenzare negativamente lo scambio tra gli epatociti ed i sinusoidi (per esempio di sostanze nutritive e segnalatori chimici), con conseguente disturbo nella normale fisiologia cellulare e nella stabilità degli organi.

Vaste aree di lisi sono state osservate nel fegato di zebrafish dopo esposizione a solfato di rame (Paris-Palacios *et al.*, 2000). Poiché il del rame ha la capacità di provocare la rottura della membrana plasmatica, questi autori hanno suggerito che la presenza di aree di lisi possa riflettere una eterogenea distribuzione del rame all'interno del parenchima epatico.

La comparsa di ampie zone di lisi è stata da noi osservata in *D. rerio* dopo esposizione ad entrambe le concentrazioni di mercurio inorganico; è interessante sottolineare che, nella stessa specie, l'esposizione a metilmercurio non induce simili alterazioni (Ung *et al.*, 2010)

suggerendo che solo la forma inorganica sia in grado di interagire a livello della membrana plasmatica (Gogbold, 1994).

Nel presente studio è stata osservata inoltre una drastica diminuzione nella quantità di glicogeno e dei granuli lipidici in entrambi i gruppi sperimentali. Negli epatociti, la presenza dei granuli di glicogeno e delle gocce lipidiche, è legata alla normale funzione metabolica delle cellule. La deplezione del glicogeno è stata osservata nel fegato di alcune specie dopo esposizione, a breve e lungo termine, ad altri metalli pesanti come il rame, il cadmio ed il piombo (Paris-Palacios *et al.*, 2000; Bais and Lokhande, 2012; Khidr *et al.*, 2012). Tale fenomeno è stato inoltre verificato sia nel fegato che nel muscolo di *Oreochromis mossambicus* in seguito ad esposizione a cloruro di mercurio. Roy George ed i suoi collaboratori (2012), suggeriscono che la grande riduzione di glicogeno nel fegato, sia indicativa di un forte stress a carico di tale organo; infatti poiché il fegato rappresenta il principale sito di detossificazione, la deplezione del glicogeno potrebbe essere correlata con l'aumento dell'attività glicolitica necessaria per sostenere l'attività metabolica.

Anche la perdita dei lipidi, descritta nel presente lavoro, è stata spesso riportata in altre specie dopo trattamento con mercurio, sia organico che inorganico (de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Drevnick *et al.*, 2008). La deplezione di entrambe le sostanze di riserva negli epatociti, potrebbe suggerire un aumento delle attività metaboliche cellulari, anche in relazione alle alterazioni morfologiche indotte nel tessuto epatico.

Dopo esposizione alla bassa concentrazione di  $\text{HgCl}_2$ , altre comuni alterazioni ultrastrutturali osservate negli epatociti di zebrafish sono: la disorganizzazione degli organelli all'interno del citoplasma, la vacuolizzazione citoplasmatica, la dilatazione e la frammentazione del RER. Alterazioni simili sono state osservate anche dopo esposizione ad altri metalli pesanti e suggeriscono una risposta adattativa aspecifica del tessuto epatico in condizioni di forte stress (Paris-Palacios *et al.*, 2000). Alcune alterazioni ultrastrutturali,

come un aumento nel numero dei mitocondri ed un aumento del RER, osservate negli epatociti dopo esposizione alla concentrazione più alta di HgCl<sub>2</sub>, possono rappresentare risposte adattative; in particolare il notevole sviluppo del RER potrebbe indicare un aumento nella sintesi proteica epatica (Paris-Palacios *et al.*, 2000).

La comparsa di granuli elettron-densi atipici all'interno del citoplasma epatico, associata all'aumento dell'eterocromatina a livello nucleare, è stata riportata dopo esposizione a mercurio in *Hoplais malabaricus*. Gli autori hanno suggerito che questo tipo di alterazione rappresenta la prova di come i metalli pesanti siano in grado di accumularsi molto più facilmente all'interno del nucleo rispetto agli altri compartimenti cellulari (Mela *et al.*, 2007).

## **VII.4 ANALISI FUNZIONALE E MOLECOLARE DEGLI EFFETTI DEL MERCURIO NEL FEGATO DI *D. RERIO***

### ***VII.4a ESPRESSIONE DELLA METALLOTIONEINA***

Numerosi studi hanno dimostrato che le metallotioneine sono importanti nella regolazione di alcune funzioni biologiche, come l'omeostasi dello zinco e del rame (De Lisle *et al.*, 1996; Pearce *et al.*, 2000), la disintossicazione da metalli (Huang *et al.*, 1987; Li *et al.*, 2004) e nell'eliminazione dei radicali liberi (Anderson *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004). Le MTs sono considerate importanti biomarker per la valutazione dell'inquinamento ambientale da metalli sia nei vertebrati che negli invertebrati (Pedersen *et al.*, 1997; Hamza-Chaffai *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999; Cosson and Amiard, 2000). Sulla base della forte correlazione tra l'espressione delle MTs e la concentrazioni dei metalli pesanti nell'ambiente, la quantità di tali proteine nelle cellule, è considerata essenziale per

monitorare gli effetti dell'esposizione a metalli pesanti e per prevedere i loro effetti tossici a livello cellulare (Knapen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014).

I risultati ottenuti avvalendoci dell'analisi funzionale e molecolare, hanno dimostrato che l'espressione delle MTs e la trascrizione dell'*mt* mRNA, sono state indotte dopo esposizione a HgCl<sub>2</sub> nel fegato di *D. rerio* in maniera dose dipendente. Abbiamo dimostrato che l'induzione delle metallotioneine dopo trattamento con tale metallo pesante è stata significativa per entrambe le concentrazioni sperimentali rispetto al gruppo di controllo. Inoltre l'indagine funzionale e l'analisi molecolare di ibridazione *in situ*, hanno rivelato che sia la proteina che il relativo mRNA sono localizzati nel citoplasma degli epatociti. Secondo i dati di letteratura, le metallotioneine sono solitamente localizzate nel citoplasma cellulare, ma possono essere trasferite nel nucleo in seguito ai cambiamenti del ciclo cellulare (Thophon *et al.*, 1993). Pertanto analizzare sia la localizzazione proteica sia quella relativa all'mRNA è importante per chiarire la funzione fisiologica delle MTs (Sato and Kondoh, 2002). Secondo Woo e Lazo (1997) la localizzazione citoplasmatica delle MTs ha un effetto soppressivo sulla citotossicità dei metalli pesanti e porta alla riduzione delle specie reattive dell'ossigeno a livello intracellulare.

Ivanina ed i suoi collaboratori (2008) suggeriscono che, la tossicità del metallo a livello cellulare, è notevolmente ridotta una volta che la sostanza tossica si lega alle MTs. Il legame che si instaura tra le proteine ed il metallo, impedisce l'interazione del contaminante con altri componenti cellulari come per esempio enzimi, proteine, DNA e lipidi. Inoltre alti livelli di MTs nell'organismo forniscono alla cellula sufficiente protezione dagli effetti tossici provocati dai metalli pesanti come l'ossidazione, la denaturazione proteica ed il ripiegamento proteico.

Nel nostro studio, oltre ad essere stato registrato un aumento nell'espressione delle MTs nel fegato di *D. rerio*, anche i danni istologici ed ultrastrutturali a carico dell'organo epatico

sono stati significativi e suggeriscono come, a causa dell'elevata tossicità del mercurio, le MTs non sono state in grado di svolgere a livello cellulare la corretta detossificazione da metalli.

In conclusione i nostri risultati forniscono preziose informazioni per una comprensione più completa degli effetti del mercurio inorganico sull'apparato branchiale e sul fegato di zebrafish, a sostegno della forte relazione tra morfologia e biomarkers funzionali. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio gli effetti pericolosi indotti dai metalli pesanti in modo da avere una visione più completa dell'impatto sul biota acquatico e per stabilire limiti nell'utilizzo dei contaminanti.



## BIBLIOGRAFIA

- Aboud, O.A.S.A.** Impact of pollution with lead, mercury and cadmium on the immune response of *Oreochromis niloticus*. *N.Y. Sci. J.* **2010**, 3(9), 9-16.
- Agius, C.** Phylogenetic development of melano-macrophage centers in fish. *J. Zool.* **1980**, 191:11-31.
- Ahuja, SK,** Chloride cell and mucous cell response to chloride and sulphate enriched media in the gills of *Gambusia affinis* and *Catla catla*. *J. Exp. Biol.* **1970**, 173: 231-250.
- Alvarado, N.E.; Quesada, I.; Hylland, K.; Marigómez, I.; Soto, M.** Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. *Aquat. Toxicol.* **2006**, 77(1), 64-77.
- Amiard, J.C.; Cosson, R.P. 1997.** Les metallothioneines. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, pp. 53–66.
- Anderson, R. S.; Patel, K.M.; Roesijadi, G.** Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Dev. Comp. Immunol.* **1999**, 23(6), 443-449.
- Arias, I.M. 1988.** The liver. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, editors. *Biology and pathobiology*. Baltimore, Maryland: Raven Press.
- Atli, G.; Canli, M.** Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, **2007**, 145(2), 282-287.
- Au D.W.T.** The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut.Bull.* **2004**, 48, 817-834.
- Ay, Ö.; Kalay, M.; Tamer, L.; Canli, M.** Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na, K-ATPase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, 62(2), 160-168.
- Baatrup, E.** Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. *Comp. Biochem. Phys. C.* **1991**, 100(1), 253-257.

- Bailly, Y.; Dunel-Erb, S.; Geffard, M.; Laurent, P.** The vascular and epithelial serotonergic innervation of the actinopterygian gill filament with special reference to the trout, *Salmo gairderi*. *Cell. Tissue Res.* **1989**, 258: 349–363.
- Bailly, Y.; Dunel-Erb, S.; Laurent, P.** The neuroepithelial cells of the fish gill filaments: Indolamine-immunocytochemistry and innervation. *Anat. Rec.* **1992**, 233:143–161.
- Bailly, Y.J.R. 2009.** Serotonergic neuroepithelial cells in fish gills: cytology and innervation. In: Zacccone, G., Cutz, E., Adriaensen, D., Nurse, C.A., Mauceri, A. (Eds.), *Airway Chemoreceptors in the Vertebrates: Structure, Evolution and Function*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp. 61–97.
- Bais, U.E.; Lokhande, M.V.** Effect of cadmium chloride on histopathological changes in the freshwater fish *Ophiocephalus striatus* (Channa). *Int. J. Zool. Res.* **2012**, 8(1), 23-32.
- Bando, I.; Reus, M. I. S.; Andrés, D.; Cascales, M.** Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication. *J. Biochem. Mol. Toxic.* **2005**, 19,154-161.
- Barman, R.P. 1991.** A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio* Hamilton Buchanan (Pisces, *Cyprinidae*) (Vol. 137). Zoological Survey of India.
- Bebianno, M.J.; Santos, C.; Canário, J.; Gouveia, N.; Sena-Carvalho, D.; Vale, C.** Hg and metallothionein-like proteins in the black scabbardfish *Aphanopus carbo*. *Food. Chem. Toxicol.* **2007**; 45(8), 1443-1452.
- Berg, K.; Puntervoll, P.; Valdersnes, S.; Goksøyr, A.** Responses in the brain proteome of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to methylmercury. *Aquat. Toxicol.* **2010**, 100(1), 51-65.
- Berntssen, M.H.; Aatland, A.; Handy, R.D.** Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquat. Toxicol.* **2003**, 65(1), 55-72.
- Boujbiha, M.A.; Hamden, K.; Guermazi, F.; Bouslama, A.; Omezzine, A.; Kammoun, A.; El Feki, A.** Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod. Toxicol.* **2009**, 28, 81-89.

- Boujbiha, M.A.M.; Hamden, K.; Guerhazi, F.; Bouslama, A.; Omezzine, A.; El Feki, A.** Impairment of spermatogenesis in rats by mercuric chloride: Involvement of low 17 $\beta$ -estradiol level in induction of acute oxidative stress. *Biol. Trace. Elem. Res.* **2011**, 142, 598–610.
- Bradley Barbazuk, W.; Korf, I.; Kadavi, C.; Heyen, J.; Tate, S.; Wun, E.; Bedell, J.A.; McPherson, J.D.; Johnson, S.L.** The Syntenic Relationship of the Zebrafish and Human Genomes. *Genome Res.* **2000**, 10: 1351-1358.
- Brandão, F.; Cappello, T.; Raimundo, J.; Santos, M.A.; Maisano, M.; Mauceri, A.; Pacheco, M.; Pereira, P.** Unravelling the mechanisms of mercury hepatotoxicity in wild fish (*Liza aurata*) through a triad approach: bioaccumulation, metabolomic profiles and oxidative stress. *Metallomics.* **2015**, 7(9), 1352-1363.
- Braunbeck, T.; Storch, V.; Bresch, H.** Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*BrachyDanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroaniline. *Arch. Environ. Con. Tox.* **1990**, 19(3), 405-418.
- Bresch, H.; Beck, H.; Ehlermann, D.; Schlaszus, H.; Urbanek, M.** A long-term toxicity test comprising reproduction and growth of zebrafish with 4-chloroaniline. *Arch Environ. Contam. Toxicol.* **1990**, 19(3):419-27.
- Brouwer, M.; Winge, D.R.; Gray, W.R.** Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the American lobster *Homarus americanus*. *J. Inorg. Biochem.* **1989**, 35, 289–303.
- Brunelli, E.; Mauceri, A.; Maisano, M.; Bernabò, I.; Giannetto, A.; De Domenico, E.; Fasulo, S.** Ultrastructural and immunohistochemical investigation on the gills of the teleost, *Thalassoma pavo* L., exposed to cadmium. *Acta Histochem.* **2011**, 113(2), 201-213.
- Brunelli, E.; Talarico, E.; Corapi, B.; Perrotta, I.; Tripepi, S.** Effects of a sublethal concentration of sodium lauryl sulphate on the morphology and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity in the gill of the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*). *Ecotox. Environ. Safe.* **2008**, 71(2), 436-445.
- Bruslé, J.; González, I.; Anadon, G.** **1996.** The structure and function of fish liver. In: Fish morphology, (eds) J.S.D. Munshi & H.M. Dutta. Science Publishers Inc.

- Cambier, S.; Benard, G.; Mesmer-Dudons, N.; Gonzalez, P.; Rossignol, R.; Brethes, D.; Bourdineaud, J.P.** At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Biochem. Cell B.* **2009**, 41(4), 791-799.
- Cambier, S.; Gonzalez, P.; Mesmer-Dudons, N.; Brèthes, D.; Fujimura, M.; Bourdineaud, J.P.** Effects of dietary methylmercury on the zebrafish brain: histological, mitochondrial, and gene transcription analyses. *Biometals.* **2012**, 25(1), 165-180.
- Canli, M.; Stagg, R.M.** The effects of in vivo exposure to cadmium, copper and zinc on the activities of gill ATPases in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Arch. Environ. Con. Tox.* **1996**, 31(4), 494-501.
- Carmona, R.; García-Gallego, M.; Sanz, A.; Domezain, A.; Ostos-Garrido, M.V.** Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater acclimated specimens. *J. Fish Biol.* **2004**, 64(2), 553-566.
- Chen, L.; Ma, L.; Bai, Q.; Zhu, X.; Zhang, J.; Wei, Q.; Li, D.; Gao, C.; Li, J.; Zhang, Z.; Liu, C.; He, Z.; Zeng, X.; Zhang, A.; Qu, W.; Zhuang, Z.; Chen, W.; Xiao, Y.** Heavy metal-induced metallothionein expression is regulated by specific protein phosphatase 2A complexes. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289(32), 22413-22426.
- Chu, J.; Sadler, K.C.** New school in liver development: lessons from zebrafish. *Hepatology.* **2009**, 50:1656–1663.
- Clarkson, T.W.; Magos, L.; Myers, G.J.** The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations. *New Engl. J. Med.* **2003**, 349(18), 1731-1737.
- Cognetti, G.; Sarà, M.; Magazzù, G.** **2004.** *Biologia marina*. Ed. Calderini, Bologna.
- Compeau, G.; Bartha, R.** Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied Environmental Microbiology.* **1985**, 50, 498-502.
- Coons, A.H.; Leduc, E.H.; Connolly, J.M.** Studies on antibody. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.* **1955**, 102, 49–59.

- Cossa, D.; Averty, B.; Pirrone, N.** The origin of methylmercury in open Mediterranean waters. *Limnol. Oceanogr-meth.* **2009**, 54, 837-844.
- Crespo, S.; Soriano, E.; Sampera, C.; Balasch, J.** Zinc and copper distribution in excretory organs of the dogfish *Scyliorhinus canicula* and chloride cell response following treatment with zinc sulphate. *Mar. Biol.* **1981**, 65:117–123.
- Crump, K.L.; Trudeau, V.L.** Mercury-induced reproductive impairment in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **2009**, 28(5), 895-907.
- Damjanov, I.** 1996. Histopathology: A color atlas and textbook. Williams and Wilkins.
- Dang, Z.C.; Berntssen, M.H.G.; Lundebye, A.K.; Flik, G.; Bonga, S.W.; Lock, R.A.C.** Metallothionein and cortisol receptor expression in gills of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exposed to dietary cadmium. *Aquat. Toxicol.* **2001**, 53(2), 91-101.
- Daoust, P.Y.; Wobeser, G.; Newstead, J.D.** Acute pathological effects of inorganic mercury and copper in gills of rainbow trout. *Vet. Pathol.* **1984**, 21(1), 93-101.
- Dave, G.; Andersson, K.; Berglind, R.; Hasselrot, B.** Toxicity of eight solvent extraction chemicals and of cadmium to water fleas, *Daphnia magna*, rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and zebrafish, *BrachyDanio rerio*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **1981**; 69C(1): 83-98.
- De Boeck, G.; Ngo, T.T.H.; Van Campenhout, K.; Blust, R.** Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. *Aquat. Toxicol.* **2003**, 65(4), 413-424.
- De la Torre, F.R.; Salibián, A.; Ferrari, L.** Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere.* **2007**, 68(8), 1582-1590.
- De Lisle, R.C.; Sarras, M.P.; Hidalgo, J.; Andrews, G.K.** Metallothionein is a component of exocrine pancreas secretion: implications for zinc homeostasis. *Am. J. Physiol-Cell Ph.* **1996**, 271(4), 1103-1110.
- de Oliveira Ribeiro, C.A.; Belger, L.; Pelletier, E.; Rouleau, C.** Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Res.* **2002**, 90(3), 217-225.

- de Oliveira Ribeiro, C.A.; Nathalie, M.D.; Gonzalez, P.; Yannick, D.; Jean-Paul, B.; Boudou, A.; Massabuau, J.C.** Effects of dietary methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2008**, 25(3), 304-309.
- de Oliveira Ribeiro, C.O.; Pelletier, E.; Pfeiffer, W.C.; Rouleau, C.** Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. *Environ. Res.* **2000**, 83(3), 286-292.
- Della Croce, N.; Cattaneo, V.; Danovaro, R. 2001.** Ecologia e protezione dell'ambiente marino costiero. Ed. UTET, Torino.
- Draghici, C.; Coman, G.; Jelescu, C.; Dima, C.; Chirila, E. 2010.** Heavy metals determination in environmental and biological samples, In: Environmental Heavy Metal Pollution and Effects on Child Mental Development- Risk Assessment and Prevention Strategies, NATO Advanced Research Workshop, Sofia, Bulgaria.
- Drevnick, P.E.; Roberts, A.P.; Otter, R.R.; Hammerschmidt, C.R.; Klaper, R.; Oris, J.T.** Mercury toxicity in livers of northern pike (*Esox lucius*) from Isle Royale, USA. *Comp. Biochem. Phys. C.* **2008**, 147(3), 331-338.
- Driscoll, C.T.; Mason, R.P.; Chan, H.M.; Jacob, D.J.; Pirrone, N.** Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47(10), 4967-4983.
- Duffus, J.H.** "Heavy metals" a meaningless term?(IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2002**; 74(5), 793-807.
- Dunel-Erb, S. 1994.** The neuroepithelial cells of the fish gill filament. In: Advances in Fish Research. B.R. Singh, ed. Narendra, Delhi. (in press).
- Dunel-Erb, S.; Bailly, Y.; Laurent, P.** Neuroepithelial cells in fish gill primary lamellae. *J. Appl. Physiol.* **1982**, 53:1342-1353.
- Eaton, R.; Farley, R.D.** Spawning cycle and egg production in zebrafish, *Brachidanio rerio*, reared in the laboratory. *Copeia.* **1974**, 1, 195-204.
- Ebbesson, L.O.E.; Nilsen, T.O.; Helvik, J.V.; Tronci, V.; Stefansson, S.O.** Corticotropin-Releasing Factor Neurogenesis during Midlife Development in

- Salmon: Genetic, Environmental and Thyroid Hormone Regulation. *J. Neuroendocrinol.* **2011**, 23(8), 733-741.
- Ecker, D.J.; Butt, T.R.; Sternberg, E.J.; Neepser, M.P.; Debouck, C.; Gorman, J.A.; Crooke, S.T.** Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261(36), 16895-16900.
- Eckert, R. Randall, D.** 1991. Fisiologia animale: meccanismi e adattamenti. Zanichelli Ed., Bologna.
- Elias, H.; Bengelsdorf, H.** The structure of the liver of vertebrates. *Acta anat.* **1952**, 14:297-337.
- Elias, H.; Bengelsdorf, H.** The structure of the liver of vertebrates. *Acta Anat. Basel.* **1952**, 14:297-337.
- Engeszer, R.E.; Patterson, L.B.; Roa, A.A.; Parichy, D.M.** Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish.* **2007**, 4(1): 21-40.
- Evans, D.H.; Piermarini, P.M.; Choe, K.P.** The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* **2005**, 85(1), 97-177.
- Fasulo, S.; Mauceri, A.; Tagliafierro, G.; Ricca, M.B.; Lo Cascio, P.; Ainis, L.** Calcium-binding proteins (CaBPs): immunoreactive cells in the skin and gill epithelia of the catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Ital. J. Zool.* **1998**, 65: 149-153.
- Ferrara, R.; Maserti, B.E.; Andersson, M.; Edner, H.; Ragnarson, P.; Svanberg, S.** Mercury degassing rate in some Mediterranean areas. *Water, Air & Soil Pollution.* **1997**, 93, 59-66.
- Ferri, S.; Sesso, A.** Ultrastructural study of the endothelial cells in teleost liver sinusoids under normal and experimental conditions. *Cell. Tissue. Res.* **1981**, 219:649-657.
- Feyrter, F.** Zur pathologie des argyrophilen Helle-Zellen-Organes in bronchialbaum des menschen. *Virchows Arch.* **1954**, 325:723-732.
- Field, H.A.; Ober, E.A.; Roeser, T.; Stainier, D.Y.** Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis. *Dev Biol.* **2003**, 253:279-290.

- Fitzgerald, W.F. 1993.** Mercury as a global pollutant. *The World & I Journal*, October:192-198.
- Foskett, J.K.; Scheffey, C.** The chloride cell: definitive identification as the salt-secretory cell in teleosts. *Science*. **1982**, 215(4529), 164-166.
- Franklin, G.E.** Surface ultrastructure changes in the gills of sockeye salmon(*Teleostei: Oncorhynchus nerka*) during seawater transfer: comparison of successful and unsuccessful seawater adaptation. *J. Morphol.* **1990**, 206, 13-23.
- Fröhlich, F.** Die “Helle-Zelle” der Bronchialschleimhaut und ihre beziehungen zum Problem der Chemoreceptoren. *Frankf. Z. Pathol.* **1949**, 60:517–559.
- Fujita, H.; Tatsumi, H.; Ban, T.; Tamura, S.** Fine ultrastructural characteristics of the liver of the cod (*Gadus morhua macrocephalus*), with special regard to the concept of a hepatoskeletal system formed by Ito cells. *Cell Tissue Res.* **1986**, 244:63-67.
- Fujita, T.; Kanno, T.; Kobayashi, S. 1988.** The Paraneuron. Tokyo, Springer-Verlag, pp. 1–357.
- Gentès, S.; Maury-Brachet, R.; Feng, C.; Pedrero, Z.; Tessier, E.; Legeay, A.; Mesmer-Dudons, N.; Baudrimont, M.; Maurice, L; Amouroux, D.; Gonzalez, P.** Specific effects of dietary methylmercury and inorganic mercury in zebrafish (*Danio rerio*) determined by genetic, histological, and metallothionein responses. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, 49, 14560–14569.
- Gentès, S.; Maury-Brachet, R.; Feng, C.; Pedrero, Z.; Tessier, E.; Legeay, A.; Mesmer-Dudons, N.; Baudrimont, M.; Maurice, L; Amouroux, D.; Gonzalez, P.** Specific effects of dietary methylmercury and inorganic mercury in zebrafish (*Danio rerio*) determined by genetic, histological, and metallothionein responses. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, 49, 14560–14569.
- George, S.G.; Olsson, P.E. 1994.** Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: Kramer, K.J.M. (Ed.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 151–171.
- Geyer, H.J. 1989.** Die morfologie, histologie en ultrastruktuur van die pankreas, lewer en galblaas van die algvoeder *Oreochromis mossambicus* (Peters). M.Sc thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.



- Ghidini, S.; Delbono, G.; Campanili, G. 2000.** Livelli ed evoluzione di cadmio, mercurio ed arsenico nei pesci dell'Alto Adriatico. Istituto di Scienza e Tecnologia degli Alimenti. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma. 20, 201-217.
- Giari, L.; Simoni, E.; Manera, M.; Dezfuli, B.S.** Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. *Ecotox. Environ. Safe.* **2008**, 70(3), 400-410.
- Gogbold, D.L. 1994.** Mercury in forest ecosystem: risk and research needs. In Mercury pollution: integration and synthesis; Watras C.J., Huckabee J.W.; CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.; pp. 295-304.
- Goniakowska-Witalinska, L.; Zacccone, G.; Fasulo, S.; Youson, J.** The neuroendocrine cells in the gills of the bowfin *Amia calva*. The ultrastructural and immunocytochemical study. *Folia Histochem. Cytobiol.* **1995**, 33:171–177.
- González, C.; Almaraz, L.; Obeso, A.; Rigual, R.** Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol. Rev.* **1994**, 74: 829–898.
- Gonzalez, P.; Dominique, Y.; Massabuau, J.C.; Boudou, A.; Bourdineaud, J.P.** Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39(11), 3972-3980.
- Griffitt, R.J.; Weil, R.; Hyndman, K.A.; Denslow, N.D.; Powers, K.; Taylor, D.; Barber, D.S.** Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41(23), 8178-8186.
- Haaparanta, A.; Valtonen, E.T.; Hoffmann, R.W.** Gill anomalies of perch and roach from four lakes differing in water quality. *J. Fish Biol.* **1997**, 50(3), 575-591.
- Hampton, J.A.; Mccuskey, P.A.; Mccuskey R.S.; Hinton D.E.** Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver: I. Arrangement and histochemical properties of hepatocytes. *Anat. Record.* **1985**, 213:166-175.
- Hampton, J.A.; McCuskey, P.A.; McCuskey, R.S.; Hinton, D.E.** Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Liver: I. Arrangement and histochemical properties of hepatocytes. *Anat. Rec.* **1985**, 213: 166–175.

- Hamza-Chaffai, A.; Amiard, J.C.; Pellerin, J.; Joux, L.; Berthet, B.** The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **2000**, 127(2), 185-197.
- Hardman, R.C.; Volz, D.C.; Kullman, S.W.; Hinton, D.E.** An in vivo look at vertebrate liver architecture: three-dimensional reconstructions from Medaka (*Oryziaslatipes*). *Anat. Rec.* **2007**, 290:770–782.
- Hassan, S.A.; Moussa, E.A.; Abbott, L.C.** The effect of methylmercury exposure on early central nervous system development in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *J. Appl. Toxicol.* **2012**, 32, 707–713.
- Heijne, W.H.; Kienhuis, A.S.; van Ommen, B.; Stierum, R.H.; Groten, J.P.** Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. *Expert. Rev. Proteomics.* **2005**, 2(5):767–80.
- Hill, A.J.; Teraoka, H.; Heideman, W.; Peterson, R.E.** Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* **2005**, 86(1), 6-19.
- Hinton, D.E.; Couch, J.A.** Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: relationship to experimentally induced neoplastic responses. *Exs.* **1998**, 86:141–164.
- Hinton, D.E.; Laurén, D.J.** Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *Am. Fish. Symp.* **1990**, 8:51-66.
- Hirose, S.; Kaneko, T.; Naito, N.; Takei, Y.** Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Phys. B.* **2003**, 136(4), 593-620.
- Ho, N.Y.; Yang, L.; Legradi, J.; Armant, O.; Takamiya, M.; Rastegar, S.; Strähle, U.** Gene responses in the central nervous system of zebrafish embryos exposed to the neurotoxicant methyl mercury. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47, 3316–3325.
- Hootman, S.R.; Philpott, C.W.** Ultracytochemical localization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- activated ATPase in chloride cells from gills of euryhaline teleost. *Anat. Rec.* **1979**, 193: 99-130.
- Huang, P.C.; Morris, S.; Dinman, J.; Pine, R.; Smith, B.** Role of metallothionein in detoxification and tolerance to transition metals. *Experientia Suppl.* **1987**, 52, 439–446.

- Hughes, G.M.** Scanning electron microscopy of the respiratory surface of trout gills. *J. Zool.* **1979**, 188, 443-453.
- Ivanina, A.V.; Cherkasov, A.S.; Sokolova, I. M.** Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica Gmelin*. *J. Exp. Biol.* **2008**, 211(4), 577-586.
- Ivanković, D.; Pavičić, J.; Erk, M.; Filipović-Marijić, V.; Raspor, B.** Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis Lam.* Digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. *Mar. Pollut. Bull.* **2005**, 50, 1303–1313.
- Jago, C.H.; Faivre, A.; Newman, M.C.** Morphological and morphometric changes in the gills of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to mercury (II). *Aquat. Toxicol.* **1996**, 34(2), 163-183.
- Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B.B.; Beeregowda, K.N.** Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* **2014**, 7(2), 60-72.
- Järup, L.** Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* **2003**, 68,167-82.
- Jomova, K.; Valko, M.** Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* **2010**, 283, 65-87.
- Jonz, M.G.; Nurse, C.A. 2009.** Oxygen-sensitive Neuroepithelial Cells in the Gills of Aquatic Vertebrates. In: Zaccone, G., Cutz, E., Adriaensen, D., Nurse, C.A., Mauceri, A. (Eds.), *Airway Chemoreceptors in the Vertebrates: Structure, Evolution and Function*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp. 1–30.
- Jonz, M.G.; Nurse, C.A.** Neuroepithelial cells and associated innervation of the zebrafish gill: a confocal immunofluorescence study. *J. Comp. Neurol.* **2003**, 461: 1–17.
- Jonz, M.G.; Nurse, C.A.** Ontogenesis of oxygen chemoreception in aquatic vertebrates. *Resp. Physiol. Neurobi.* **2006**, 154: 139–152.
- Jürss, K.; Bastrop, R.** The function of mitochondria-rich cells (chloride cells) in teleost gills. *Fish Biology and Fisheries.* **1995**, 5: 235-255.
- Kari, G.; Rodeck, U.; Dicker, A.P.** Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, 82(1):70-80.

- Karlsson, L.** Gill morphology in the zebrafish, *BrachyDanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Fish Biol.* **1983**, 23(5), 511-524.
- Karnaky, K.J.J.; Degnan, K.J.; Garretson, L.T.; Zadunaisky, J.A.** 1984. Identification and quantification of mitochondria-rich cells in transporting epithelia. *American Journal of Physiology*, 246 (Regulatory Integrative Comparative Physiology 15), R770-R775.
- Kent, G C.** 1997. *Anatomia comparata dei vertebrati; a cura di Gerzeli G, Barni S, Gervaso M V.* Piccin-Nuova Libreria.
- Khidr, B.M.; Mekkawy, I.A.; Harabawy, A.S.; Ohaida, A.S.** Effect of lead nitrate on the liver of the cichlid fish (*Oreochromis niloticus*): a light microscope study. *Pak. J. Biol. Sci.* **2012**, 15(18), 854-62.
- Kikuchi, K.; Verkade, H.; Reiter, J.F. Kim, C.H.; Chitnis, A.B.; Kuroiwa, A. Stainier, D.Y.** Notch signaling can regulate endoderm. *Dev. Dyn.* **2004**, 229:756–762.
- Kim, H.; Lim, B.; Kim, B.D.; Lee, Y.M.** Effects of heavy metals on transcription and enzyme activity of Na<sup>+</sup>. *J. Toxicol. Environ. Health Sci.* **2016**, 8(2), 128-134.
- Klinck, J.; Dunbar, M.; Brown, S.; Nichols, J.; Winter, A.; Hughes, C.; Playle, R.C.** Influence of water chemistry and natural organic matter on active and passive uptake of inorganic mercury by gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **2005**, 72(1), 161-175.
- Knapen, D.; Reynders, H.; Bervoets, L.; Verheyen, E.; Blust, R.** Metallothionein gene and protein expression as a biomarker for metal pollution in natural gudgeon populations. *Aquat. Toxicol.* **2007**, 82(3), 163–172.
- Lam, K.L.; Ko, P.W.; Wong, J.K.Y.; Chan, K.M.** Metal toxicity and metallothionein gene expression studies in common carp and tilapia. *Mar. Environ. Res.* **1998**, 46(1), 563-566.
- Laurent P.** 1984. Gill internal morphology. In: Hoar WS, Randall DJ, editors. *Fish physiology*, Vol Vol 10A. New York: Academic Press. p 73–183.
- Laurent, P., Perry, S.F.** Environmental effects on fish gill morphology. *Physiol. Zool.* **1991**, 64: 4-25.

- Laurent, P.; Dunel-Erb, S. 1984.** The pseudobranch: morphology and function. In: Hoar WS, Randall DJ, editors. Fish physiology, Vol 10B. New York: Academic Press. p 285–323.
- Lauweryns, J.M.; Peuskens, J.C.** Argrophil (kinin and amine producing?) cells in human infant airway epithelium. *Life Sci.* **1969**, 8:577–585.
- Lauweryns, J.M.; Peuskens, J.C.** Neuro-epithelial bodies(neuroreceptor or secretory organs?) in human infant bronchial and bronchiolar epithelium. *Anat. Rec.* **1972**, 172:471–481.
- Lawrence, C.** The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture.* **2007**, 269(1-4):1-20.
- Lee, J.W.; Kim, J.W.; De Riu, N.; Moniello, G.; Hung, S.S.** Histopathological alterations of juvenile green (*Acipenser medirostris*) and white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) exposed to graded levels of dietary methylmercury. *Aquat. Toxicol.* 2012, 109, 90-99.
- Li, X.; Chen, H.; Epstein, P.N.** Metallothionein protects islets from hypoxia and extends islet graft survival by scavenging most kinds of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279(1), 765-771.
- Liao, C.Y.; Fu, J.J.; Shi, J.B.; Zhou, Q.F.; Yuan, C.G.; Jiang, G.B.** Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. *Environ. Toxicol. Phar.* **2006**, 22(2), 225-233.
- Liem, K.F.; Bemis, W.E.; Walker, W.F.; Grande, L. 2012.** Anatomia comparata dei vertebrati: una visione funzionale ed evolutiva. - 2. ed.- Napoli : Edises.
- López-Barneo, J.; Ortega-Saenz, P.; Pardal, R.; Pascual, A.; Piruat, J.I.** Carotid body oxygen sensing. *Eur. Respir. J.* **2008**, 32; 1386–1398.
- Lorent, K.; Yeo, S.Y.; Oda, T. Chandrasekharappa, S.; Chitnis, A.; Matthews, R.P.; Pack, M.** Inhibition of Jagged-mediated Notch signaling disrupts zebrafish biliary development and generates multi-organ defects compatible with an Alagille syndrome phenocopy. *Development.* **2004**, 131:5753–5766.

- Magnani, T. 1998.** Bioaccumulo di metalli pesanti in licheni epifiti nell'area del Destra Secchia, Convegno annuale SLI 26-28 Ottobre 2001, Roma. ASL di Mantova, PMIP di Mantova, IV U.O. Fisica e Tutela dell'Ambiente.
- Mallatt, J.** Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **1985**, 42(4), 630-648.
- Mazon, A.F.; Monteiro, E.A.S.; Pinheiro, G.H.D.; Fernandez, M.N.** Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Braz. J. Biol.* **2002**, 62(4A), 621-631.
- McClure, M.M.; McIntyre, P.B.; McCune, A.R.** Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *J. F. Biol.* **2006**, 69:553–570.
- McCormick, S.D.; Regish, A.M.; Christensen, A.K.** Distinct freshwater and seawater isoforms of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon. *J. Exp. Biol.* **2009**, 212(24), 3994-4001.
- Mela, M.; Randi, M.A.F.; Ventura, D.F.; Carvalho, C.E.V.; Pelletier, E.; de Oliveira Ribeiro, C.A.** Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotox. Environ. Safe.* **2007**, 68(3), 426-435.
- Mieiro, C.L.; Bervoets, L.; Joosen, S.; Blust, R.; Duarte, A.C.; Pereira, M.E.; Pacheco, M.** Metallothioneins failed to reflect mercury external levels of exposure and bioaccumulation in marine fish—Considerations on tissue and species specific responses. *Chemosphere.* **2011**, 85(1), 114-121.
- Milsom, W.K.; Burleson, M.L.** Peripheral arterial chemoreceptors and the evolution of the carotid body. *Resp. Physiol. Neurobi.* **2007**, 157: 4–11.
- Milsom, W.K.; Reid, S.G.; Rantin, F.T.; Sundin, L.** Extrabranhial chemoreceptors involved in respiratory reflexes in the neotropical fish *Colossoma macropomum* (the tambaqui). *J. Exp. Biol.* **2002**, 205: 1765–1774.
- Montaser, M.; Mahfouz, M.E.; El-Shazly, S.A.; Abdel-Rahman, G.H.; Bakry, S.** Toxicity of heavy metals on fish at Jeddah coast KSA: Metallothionein expression as a biomarker and histopathological study on liver and gills. *W. J. Fish Marine Sci.* **2010**, 2, 174-185.

- Monteiro, S.M.; Mancera, J.M.; Fontainhas-Fernandes, A.; Sousa, M.** Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Phys. C.* **2005**, 141(4), 375-383.
- Monteiro, S.M.; Oliveira, E.; Fontainhas-Fernandes, A.; Sousa, M.** Effects of sublethal and lethal copper concentrations on the gill epithelium ultrastructure of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Zool. Stud.* **2012**, 51(7), 977-987.
- Morris, C.A.; Stürzenbaum, S.; Nicolaus, B.; Morgan, A.J.; Harwood, J.L.; Kille, P.** **1999.** Identification and characterisation of metallothioneins from environmental indicator species as potential biomonitors. In *Metallothionein IV*, Klaassen, C.D; Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland; pp. 621-627.
- Munshi, J.S.D.; Dutta, H.M.** **1996.** Fish morphology: Horizon of new research. Science Publishers, Inc. U.S.A.
- Nikpour, Y.; Zolgharnein, H.; Sinaei, M.; Najafzadeh, H.; Ghavasi, M.** Evaluation of metallothionein expression as a biomarker of mercury exposure in *Scatophagus argus*. *Pak. J. Biol. Sci.* **2008**, 11(18), 2269-2273.
- Niyogi, S.; Wood, C.M.** Effects of chronic waterborne and dietary metal exposures on gill metal-binding: implications for the biotic ligand model. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2003**, 9(4), 813-846.
- Nonnotte, G.; Kirsch, R.** **1978.** Cutaneous respiration in seven seawater teleosts. *Respiration Physiology* 35: 111-118. *International Review of Cytology* 130: 191-232.
- Oehlenschläger, J.** **2002.** Identifying heavy metals in fish In: *Safety and Quality issues in fish processing*, (Edited by Bremner H.A.), 95-113, Woodhead Publishing Limited, 978-1-84569-019-9, Cambridge.
- Olojo, E.A.A.; Olurin, K.B.; Oluwemimo, A.D.** Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. *Afr. J. Biotechnol.* **2005**, 4(1), 117-122.
- Olson, K.R.** **1996.** Scanning electron microscopy of the fish gill. In: Munshi JSD, Dutta HM, editors. *Fish morphology. Horizon of new research*. Rotterdam: AA Balkema. p 32-45.

- Olsvik, P.A.; Hindar, K., Zachariassen, K.E.; Andersen, R.A.** Brown trout (*Salmo trutta*) metallothioneins as biomarkers for metal exposure in two Norwegian rivers. *Biomarkers*. **2001**, 6, 274–288.
- Padoa, E.** 1986. Manuale di anatomia comparata dei vertebrati - ed. Feltrinelli, Milano.
- Pandey, S.; Parvez, S.; Ansari, R.A.; Ali, M.; Kaur, M.; Hayat, F.; Raisuddin, S.** Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, 174(3), 183-192.
- Pardal, R.; Ortega-Saenz, P.; Duran, R.; López-Barneo, J.** Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell*. **2007**, 131: 364–377.
- Paris-Palacios, S.; Biagianti-Risbourg, S.; Vernet, G.** Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *BrachyDanio rerio* (Teleostei, *Cyprinidae*) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquat. Toxicol.* **2000**, 50(1), 109-124.
- Parvathi, K.; Sivakumar, P.; Sarasu, C.** Effects of chromium on histological alterations of gill, liver and kidney of fresh water teleost, *Cyprinus carpio* (L.). *J. Fish. Int.* **2011**, 6(1), 1-5.
- Pavicic, J.; Skreblin, M.; Krebar, I.; Tusek-Zidaric, M.; Stegnar, P.** Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations. I. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **1994**, 107, 249–257.
- Pearce, L.L.; Wasserloos, K.; Croix, C.M.S.; Gandley, R.; Levitan, E.S.; Pitt, B.R.** Metallothionein, nitric oxide and zinc homeostasis in vascular endothelial cells. *J. Nutr.* **2000**, 130(5), 1467S-1470S.
- Pedersen, S.N.; Lundebye, A.K.; Depledge, M.H.** Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.* **1997**, 37(2), 183-200.
- Penglase, S.; Hamre, K.; Ellingsen, S.** Selenium and mercury have a synergistic negative effect on fish reproduction. *Aquat. Toxicol.* **2014**, 149, 16-24.



- Perry, S.F.** The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* **1997**, 59(1), 325-347.
- Perry, S.F.; Jonz, M.G.; Gilmour, K.M.** **2009**. Oxygen sensing and the hypoxic ventilatory response. In: Richards, J.G., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Hypoxia*. , 1st ed. Elsevier, London, U.K., p. 194.
- Perugini, M.; Visciano, P.; Manera, M.; Zaccaroni, A.; Olivieri, V.; Amorena, M.** Heavy metal (As, Cd, Hg, Pb, Cu, Zn, Se) concentrations in muscle and bone of four commercial fish caught in the central Adriatic Sea, Italy. *Environ. Monit. Assess.* **2014**, 186, 2205–2213.
- Peute, J.; van der Gaag, M.A.; Lambert, J.G.** Ultrastructure and lipid content of the liver of the zebrafish, *BrachyDanio rerio*, related to vitellogenin synthesis. *Cell. Tissue Res.* **1978**, 186:297–308.
- Pisam, M. Rambourg, A.** Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of Teleost fishes: an ultrastructural approach. *Int. Rev. Cytol.* **1991**, 130: 191-232.
- Poopal, R.K.; Ramesh, M.; Dinesh, B.** Short-term mercury exposure on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and ionoregulation in gill and brain of an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2013**, 27(1), 70-75.
- Powell, M.D.; Speare, D.J.; Wrigth, G.M.** Comparative ultrastructural morphology of lamellar epithelial, chloride and mucus cell glycoalyx of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill. *J. Fish Biol.* **1994**, 44, 725-730.
- Rajeswari, R.; Sailaja, N.** Impact of heavy metals on environmental pollution. *J. Chem. Pharm. Sci.* **2014**, 7, 175-181.
- Randall, D. Burggren, W.; French, K.** **1999**. Fisiologia animale. Meccanismi e adattamenti (illustrato). Zanichelli Ed., Bologna.
- Rao, M.V.; Gangadharan, B.;** Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol. in Vitro.* **2008**, 22, 935-942.
- Robertson, J.C.; Bradley, T.M.** Hepatic ultrastructure changes associated with the parr-smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Exper. Zool.* **1991**, 260:135-148.

- Robertson, J.C.; Bradley, T.M.** Liver ultrastructure of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Morphol.* **1992**, 211:41–54.
- Rocha, E.; Monteiro, R.A.; Pereira, C.A.** The liver of the brown trout, *Salmo trutta fario*: a light and electron microscope study. *Anal.* **1994**, 185 (2):241–249.
- Roesijadi, G.** Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ. Health Persp.* **1994**, 102(12), 91-95.
- Roesijadi, G.; Drum, A.S.; Thomas, J.M., Fellingham, G.W.** Enhanced mercury tolerance in marine mussels and relationship to low weight, mercury-binding proteins. *Mar. Pollut. Bull.* **1982**. 13 (7), 250–253.
- Rose, S.U.M.I.T.; Vincent, S.; Meena, B.; Suresh, A.; Mani, R.** Metallothionein induction in fresh water catfish *Clarias gariepinus* on exposure to cadmium. *Int. J. Pharmacy Pharm. Sci.* **2014**, 6, 377-383.
- Ross, M.H.; Reith, E.J.; Rombell, L.J.** **1989**. Histology: A text and atlas, 2nd edn. Williams & Wilkins.
- Roy George, K.; Malini, N.A.; Sandhya Rani, G.O.** Biochemical changes in liver and muscle of the cichlid, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) exposed to sub-lethal concentration of mercuric chloride. *Indian J. Fish.* **2012**, 59(2), 147-152.
- Sakano, E.; Fujita, H.** Comparative aspects on fine structure of the teleost liver. *Fol. Anat. Jap.* **1982**, 58:501-520.
- Saltys, H.A.; Jonz, M.G.; Nurse, C.A.** Comparative study of gill neuroepithelial cells and their innervation in teleosts and *Xenopus* tadpoles. *Cell. Tissue Res.* **2006**, 323: 1–10.
- Sato, M.; Kondoh, M.** Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J. Exp. Med.* **2002**, 196(1), 9-22.
- Schär, M.; Maly, I.P.; Sasse, D.** Histochemical studies on metabolic zonation of the liver in the trout (*Salmo gairdneri*). *Histochemistry.* **1985**, 83:147-151.
- Scholz, S.; Fischer, S.; Gündel, U.; Küster, E.; Luckenbach, T.; Voelker, D.** The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. R.* **2008**, 15(5): 394-404.

- Selman, K.; Wallace, R.A.; Sarka, A.; Qi, X.** Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *J. Morphol.* **2005**, 218(2): 203-224.
- Senger, M.R.; Rico, E.P.; de Bem Arizi, M., Frazzon, A.P.G.; Dias, R.D.; Bogo, M.R.; Bonan, C.D.** Exposure to Hg<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology.* **2006**, 226(2), 229-237.
- Senger, M.R.; Rosemberg, D.B.; Seibt, K.J.; Dias, R.D.; Bogo, M.R.; Bonan, C.D.** Influence of mercury chloride on adenosine deaminase activity and gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Neurotoxicology.* 2010, 31, 291–296.
- Senger, M.R.; Rosemberg, D.B.; Seibt, K.J.; Dias, R.D.; Bogo, M.R.; Bonan, C.D.** Influence of mercury chloride on adenosine deaminase activity and gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Neurotoxicology.* **2010**, 31(3), 291-296.
- Sharma, M.K.; Sharma, A.; Kumar, A.; Kumar, M.** Evaluation of protective efficacy of *Spirulina fusiformis* against mercury induced nephrotoxicity in Swiss albino mice. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, 45, 879–887.
- Shepherd, K.L.** Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fisheries.* **1994**, 4, 401–429.
- Shore, T.W.; Jones, H.L.** On the structure of the vertebrate liver. *J. Physiol.* **1989**, 10:408-428.
- Sinaie, M.; Bastami, K.D.; Ghorbanpour, M.; Najafzadeh, H.; Shekari, M.; Haghparast, S.** Metallothionein biosynthesis as a detoxification mechanism in mercury exposure in fish, spotted scat (*Scatophagus argus*). *Fish Physiol. Biochem.* **2010**, 36(4), 1235-1242.
- Sinha, A.K.; Matey, V.; Giblen, T.; Blust, R.; De Boeck, G.** Gill remodeling in three freshwater teleosts in response to high environmental ammonia. *Aquat. Toxicol.* **2014**, 155, 166-180.
- Spence, R.; Gerlach, G.; Lawrence, C.; Smith, C.** The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2008**, 83(1):13-34.

- Spitsbergen, J.M.; Kent, M.L.** The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research- advantages and current limitations. *Toxicol. Pathol.* **2003**, 31: 62-87.
- Stagg, R.M.; Rusin, J.; Brown, F.** Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the gills of the flounder (*Platichthys flesus*) in relation to mercury contamination in the Firth of Forth. *Mar. Environ. Res.* **1992**, 33(4), 255-266.
- Sternberg, S.S.** **1997.** Histology for pathologists, 2nd edn. Lippincott – Raven. Philadelphia. New York.
- Sundin, L.; Nilsson, S.** Branchial innervation. *J. Exp. Zool.* **2002**, 293: 232–248.
- Sundin, L.I.** Responses of the branchial circulation to hypoxia in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Am. J. Physiol.-Reg. I* **1995**, 268(3), R771-R778.
- Talwar, P.K.; Jhingran, A.G.** **1991.** Inland fishes of India and adjacent countries. A.A. Balkema, Rotterdam, 1158pp.
- Tan, S.; Li, H.; Jin, Y.; Yu, H.** Cadmium exposure affects on the expression of metallothionein 2 gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Genes & Genomics.* **2016**, 38(2), 127-135.
- Tanuma, Y.** Electron microscope observations on the intrahepatocytic bile canalicules and sequent bile ductules in the crucian, *Carassius carassius*. *Arch. Histol. Jpn.* **1980**, 43:1–21.
- Tao, S.; Liu, C.; Dawson, R.; Long, A.; Xu, F.** Uptake of cadmium adsorbed on particulates by gills of goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotox. Environ. Safe.* **2000**, 47(3), 306-313.
- Thophon, S.; Pokethitiyook, P.; Chalermwat, K.; Upatham, E.S.; Sahaphong S.** Ultrastructural alterations in the liver and kidney of white sea bass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Toxicol.* **1993**, 19(1), 9-11.
- Tokar, E.J.; Benbrahim-Tallaa, L.; Waalkes, M.P.** Metal ions in human cancer development. *Metal Ions on Life Science.* **2011.** 8, 375-401.

- Trasande, L.; Landrigan, P.J.; Schechter, C.** Public health and economic consequences of methyl mercury toxicity to the developing brain. *Environ. Health Perspect.* **2005**, 113(5), 590–596.
- Ung, C.Y.; Lam, S.H.; Hlaing, M.M.; Winata, C.L.; Korzh, S.; Mathavan, S.; Gong, Z.** Mercury-induced hepatotoxicity in zebrafish: in vivo mechanistic insights from transcriptome analysis, phenotype anchoring and targeted gene expression validation. *Bmc Genomics.* **2010**, 11(1), 212.
- Van den Heuvel, M.R.; Power, M.; Richards, J.; MacKinnon, M.; Dixon, D.G.** Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters. *Ecotox. Environ. Safe.* **2000**, 46(3), 334-341.
- Velma, V.; Vutukuru, S.S.; Tchounwou, P.B.** Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: a critical review. *Rev. Environ. Health* **2009**, 24(2), 129-145.
- Viarengo, A.; Nott, J.A.** Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **1993**, 104 (3), 355–372.
- Vieira, C., Morais, S.; Ramos, S.; Delerue-Matos, C.; Oliveira, M.B.P.P.** Mercury, cadmium, lead and arsenic levels in three pelagic fish species from the Atlantic Ocean: intra- and inter-specific variability and human health risks for consumption. *Food & Chemical Toxicology.* **2011**, 49, 923-932.
- Vutukuru, S.S.; Basani, K.** Acute effects of mercuric chloride on glycogen and protein content of Zebra fish, *Danio rerio*. *J. Environ. Biol.* **2013**, 34(2), 277.
- Wagemann, R.; Trebacz, E.; Boila, G.; Lockhart, W.L.** Mercury species in the liver of ringed seals. *Sci. Total Environ.* **2000**, 261(1), 21-32.
- Wallace, K.N., Pack, M.** Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. *Dev. Biol.* **2003**, 255:12–29.
- Wang, C.; Zhang, F.; Cao, W.; Wang, J.** The identification of metallothionein in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) and its expression following heavy metal exposure. *Environ. Toxicol. Phar.* **2014**, 37(3), 1283-1291.
- Watson, C.F.; Beamish, F.W.H.** Effects of zinc on branchial ATPase activity in vivo in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Compos. Biochem. Physiol.* **1980**, 66, 77–82.

- Watson, C.F.; Benson, W.H.** Comparative activity of gill ATPase in three freshwater teleosts exposed to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* **1987**, 14, 252–259.
- Wendelaar Bonga, S.E.** The stress response in fish. *Physiol. Revs.* **1997**, 77, 591–625.
- WHO** (World Health Organization). **2010**. Ten Chemicals of Major Public Health Concern.
- Wilson, J.M.; Laurent, P.** Fish gill morphology: inside out. *J. Exp. Zool.* **2002**, 293(3), 192-213.
- Wisse, E.; Knook, D.L.** **1977**. Kupffer cells and other liver sinusoidal cells. Amsterdam, Elsevier.
- Woo, E.S.; Lazo, J.S.** Nucleocytoplasmic functionality of metallothionein. *Cancer Res.* **1997**, 57(19), 4236-4241.
- Woo, S.; Yum, S.; Jung, J.H.; Shim, W.J.; Lee, C.H.; Lee, T.K.** Heavy metal-induced differential gene expression of metallothionein in Javanese medaka, *Oryzias javanicus*. *Mar. Biotechnol.* **2006**, 8(6), 654-662.
- Yao, Y.; Lin, J.; Yang, P.; Chen, Q.; Chu, X.; Gao, C.; Hu, J.** Fine structure, enzyme histochemistry, and immunohistochemistry of liver in zebrafish. *Anat. Rec.* **2012**, 295(4), 567-576.
- Zaccone, G.; Fasulo, S.; Ainis, L.** Distribution patterns of the paraneuronal endocrine cells in the skin, gills and the airways of fishes as determined by immunohistochemical and histological methods. *Histochem. J.* **1994**, 26:609–629.
- Zaccone, G.; Fasulo, S.; Ainis, L.** The neuroendocrine epithelial cell system in the respiratory organs of air-breathing and teleost fishes. *Int. Rev. Cytol.* **1995**, 157:277–314.
- Zaccone, G.; Fasulo, S.; Ainis, L.; Licata, A.** Paraneurons in the gills and airways of fishes. *Microsc. Res. Techniq.* **1997**, 37(1): 4-12.
- Zaccone, G.; Lauweryns, J.M.; Fasulo, S.; Tagliafierro, G.; Ainis, L.; Licata, A.** Immunocytochemical localization of serotonin and neuropeptides in the neuroendocrine paraneurons of teleost and lungfish gills. **1992a**, *Acta Zool.* 73(3):177–183.

- Zaccone, G.; Mauceri, A.; Fasulo, S.; Ainis, L.; Lo Cascio, P.; Ricca, M.B.** Localization of immunoreactive endothelin in the neuroendocrine cells of fish gill. *Neuropeptides* **1996**, 30:53–57.
- Zaccone, G.; Wendelaar Bonga, S.; Flik, G.; Fasulo, S.; Licata, A.; Lo Cascio, P.; Mauceri, A.; Lauriano, E.R.** Localization of calbindin D28k-like immunoreactivity in fish gill: a light microscopic and immunoelectron histochemical study. *Regul. Pept.* **1992b**, 41: 195–208.