

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

Dottorato di Ricerca in Biologia Animale

(Settore disciplinare BIO-05)

XX Ciclo

(2004-2007)

**Effetti del cadmio sulle branchie del
teleosteo marino *Thalassoma pavo*:
uno studio morfo-funzionale**

Dott.ssa Barbara CORAPI

Coordinatore
Chiar.mo Prof.
Bruno TOTA



Docente Tutor
Dott.ssa
Elvira BRUNELLI



*... a chi sa di esser sempre stato accanto a me
a chi mi ha dato le certezze
a chi mi ha donato la conoscenza
... o semplicemente un sorriso.*

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 1
---------------------	--------

CAPITOLO 1

Inquinamento marino

1.1. Inquinamento	» 5
1.2. Inquinamento degli ambienti acquatici	» 7
1.3. Contaminanti biodegradabili:	» 11
1.4. Contaminanti non conservativi:	» 11
1.5. Contaminanti particellati	» 11
1.6. Contaminanti conservativi	» 11
1.7. Effetti tossici dei metalli pesanti e loro provenienza	» 13
1.7.1 Mercurio	» 13
1.7.2 Rame	» 13
1.7.3 Piombo	» 14
1.7.4 Cromo	» 14
1.7.5 Cadmio	» 14

CAPITOLO 2

La respirazione nei vertebrati acquatici

Premessa	» 17
2.1. Fattori che influenzano gli scambi gassosi	» 18
2.2. L'apparato branchiale	» 20
2.3. Le branchie dei pesci	» 20
2.3.1 Condroitti	» 21
2.3.2 Osteitti	» 22
2.4. L'epitelio delle branchie dei pesci	» 23
2.4.1 L'epitelio del filamento	» 24
2.4.2 L'epitelio lamellare: organizzazione e componenti cellulari nei Teleostei	» 26

CAPITOLO 3

La specie studiata

3.1. Inquadramento sistematico	» 29
3.2. Geonemia	» 29
3.3. Morfologia	» 29
3.4. Riproduzione e sviluppo	» 31
3.5. Habitat e biologia	» 32

CAPITOLO 4

Materiali e metodi

4.1. Provenienza del materiale e mantenimento in laboratorio	» 34
4.2. Test tossicologici	» 34
4.2.1. Determinazione dell'LC50	» 36
4.3. Allestimento dei preparati per l'osservazione al microscopio ottico ed ai microscopi elettronici a scansione ed a trasmissione	» 36
4.3.1. Prelievo	» 36
4.3.2. Fissazione	» 37
4.3.3. Disidratazione	» 37
4.3.4. Essiccamento (solo per SEM)	» 38
4.3.5. Montaggio (solo per SEM)	» 38
4.3.6. Ricopertura (solo per SEM)	» 39
4.3.7. Contrastazione (solo per TEM)	» 39
4.3.8. Inclusione (solo per TEM)	» 39
4.3.9. Sezionamento	» 40
4.3.10. Metallizzazione	» 40
4.4. Allestimento dei preparati per l'analisi istologica ed immunoistochimica	» 41
4.4.1. Fissazione	» 41
4.4.2. Disidratazione	» 41
4.4.3. Inclusione	» 42
4.4.4. Taglio o sezionamento	» 42
4.4.5. Sparaffinatura	» 43
4.5. Colorazione Alcian blu/P.A.S.	» 43
4.6. Tecniche di immunomarcatura	» 44
4.6.1. Serotonina	» 45
4.6.2. Ossido nitrico	» 46
4.6.3. Peptide vasoattivo intestinale (VIP)	» 47
4.6.4. Le metallotioneine	» 48
4.6.5. Caspasi3	» 48
4.6.6. Aquaporina 3	» 49
4.6.7. Na ⁺ /K ⁺ -ATPasi	» 49
4.6.8. Metodo indiretto di immunofluorescenza	» 51

CAPITOLO 5

Risultati

5.1. Determinazione dell'LC50	» 53
5.2. Apparto branchiale degli esemplari di controllo	» 54
5.3. Apparto branchiale degli esemplari esposti per 48h a cadmio	» 58
5.3.1. Morfologia ed ultrastruttura	» 58
5.3.2. Analisi funzionale e statistica	» 64

5.4.	Apparto branchiale degli esemplari esposti per 96h a Cadmio	»	70
	5.4.1. Morfologia ed ultrastruttura	»	70
	5.4.2. Analisi funzionale e statistica	»	75
5.5.	Apparto branchiale degli esemplari esposti per 192h a Cadmio	»	80
	5.5.1. Morfologia ed ultrastruttura	»	80
	5.5.2. Analisi funzionale e statistica	»	86

CAPITOLO 6

Discussioni e conclusioni

6.1.	Concentrazione letale	»	89
6.2.	Concentrazioni subletali	»	91
	6.2.1 Analisi morfologica	»	91
	6.2.2 Analisi funzionale	»	95
6.3.	Considerazioni conclusive	»	98

BIBLIOGRAFIA	»	100
--------------	---	-----

INTRODUZIONE

Nei mari europei vengono riversate ogni anno enormi quantità di rifiuti provenienti dalle città, dalle industrie e dalle aree agricole dove vengono utilizzate notevoli quantità di prodotti chimici. Il mar Mediterraneo, pur rappresentando meno dell'1% della superficie delle acque del pianeta, ospita oltre 7.000 specie animali e può quindi essere considerato un ecosistema estremamente ricco dal punto di vista biologico (Della Croce *et al.*, 1997).

L'integrità di questo sistema è minacciata da innumerevoli interventi di origine antropica quali la cementificazione delle coste e la costruzione di porti, impianti industriali centrali termoelettriche in prossimità della fascia costiera. Le attività umane hanno inoltre determinato modifiche dei fondali, impoverimento delle risorse nonché introduzione di specie estranee. Il più importante fattore di rischio per la fauna marina è comunque rappresentato dalle sostanze tossiche che vengono trasportate in mare dalle acque fluviali o riversate direttamente in ambiente marino. Tali sostanze tendono ad accumularsi lungo la fascia costiera, risultando molto pericolose per gli organismi che la popolano (Cognetti *et al.*, 2004).

I metalli pesanti sono contaminanti stabili e persistenti nell'ambiente e per questo altamente pericolosi (Bolognesi *et al.*, 1999).

Il cadmio è un metallo molto tossico, che tende ad accumularsi negli ecosistemi e nelle catene alimentari e la sua concentrazione nel Mediterraneo è di circa 15 volte più alta di quella riscontrata nelle acque degli oceani (Migliarini *et al.*, 2005). Il cadmio è un elemento ampiamente distribuito sulla superficie terrestre, viene utilizzato in associazione allo zinco per la produzione di batterie, ed è un sottoprodotto della fusione di questo metallo. La sua presenza negli ecosistemi acquatici deriva da attività antropiche quali la produzione di plastiche, di pigmenti e di batterie (Randi

et al., 1996). Ogni anno vengono riversate in mare circa 8000 tonnellate di cadmio, la metà delle quali di origine naturale (Novelli *et al.*, 1998).

Gli effetti del cadmio sugli organismi sono potenzialmente devastanti perchè esso può agire a livello molecolare cellulare, tissutale e di organo. In condizioni normali gli organismi marini sono in grado di tollerare una certa concentrazione di questo inquinante ma, quando l'attività di escrezione non risulta sufficiente al suo completo smaltimento possono verificarsi squilibri osmoregolatori e fenomeni di accumulo in vari organi (Pratap *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 2002.). La concentrazione o l'accumulo di tali sostanze in organi bersaglio viene dunque spesso utilizzata per valutare il grado di contaminazione ambientale e come parametro indicativo sulla reale nocività dei contaminanti (Zhang & Wang, 2005).

Per affermare che una sostanza è pericolosa per gli ecosistemi acquatici e per le catene alimentari bisogna verificare la sua tossicità acuta su mammiferi, batteri e pesci. I pesci sono spesso usati come modello sperimentale per valutare lo stato di salute degli ecosistemi acquatici (Garcia-Santos *et al.*, 2005). I test per determinare la tossicità sono molteplici (Yilmaz *et al.*, 2004) ed una delle tecniche maggiormente utilizzate per questo tipo di studi è quella dei saggi tossicologici che consentono di testare la tolleranza di una specie ad un determinato agente inquinante stabilendone le concentrazioni letali (LC50). Valutando inoltre gli effetti indotti da una sostanza a concentrazioni subletali, è possibile quantificare le concentrazioni limite tollerate dalla specie ed effettuare considerazioni che abbiano valore predittivo sull'entità del rischio derivante dalla presenza di quell'inquinante nel mezzo acquatico. In particolare le alterazioni istopatologiche sono utili per stabilire criteri sulla qualità delle acque (FAO, 1981; EIFAC, 1983; Murty 1986; Tripepi *et al.*, 2006).

In letteratura sono riportati numerosi lavori sulla tossicità del cadmio e tra gli effetti che il cadmio induce sono elencati alterazioni a livello delle branchie e del fegato, effetti neurologici e comportamentali (Gill & Epple,

1992), ritardi nella crescita (Karlsson-Norrgren *et al.*, 1985), alterazione della regolazione osmotica e ionica (Heath, 1987; Castanõ *et al.*, 1998), compromissione dell'attività di alcuni enzimi e differenti alterazioni nelle risposte immunitarie (Heath, 1987).

Le branchie rappresentano un organo particolarmente importante perchè svolge molteplici funzioni quali: osmoregolazione, escrezione, bilancio idrico ed ionico (Evans *et al.*, 1999).

Questo organo essendo in diretto contatto con il mezzo esterno può rappresentare un buon indicatore delle sostanze tossiche che si accumulano in mare (Evans *et al.*, 1999; Hinton *et al.*, 1992)

E' importante inoltre sottolineare che ad oggi la maggior parte dei dati disponibili in letteratura sugli effetti del cadmio si riferisce a specie d'acqua dolce (Holcombe *et al.*, 1976; Spehar, 1976; Lin *et al.*, 1993; Oryan *et al.*, 1997; Gelli *et al.*, 1999; Hollis *et al.*, 1999; Muley *et al.*, 2000; Dutta & Kaviray 2001; Mungkung *et al.*, 2001; Szebedinsky *et al.*, 2001; Yilmaz *et al.*, 2004) mentre le notizie riguardo a specie marine sono scarse e frammentarie (Robohm, 1986).

Questo lavoro vuole quindi rappresentare un primo contributo allo studio degli effetti di sostanze tossiche e inquinanti sull'apparato respiratorio di Teleostei del Mediterraneo.

Uno degli obiettivi che questo lavoro si è proposto è quindi di stabilire il valore di LC50 del cadmio per *Thalassoma pavo*, un labride ampiamente diffuso nel Mediterraneo.

La valutazione degli effetti del cadmio sull'apparato branchiale della specie in esame ha rappresentato la finalità principale della ricerca; a tale fine sono state testate diverse concentrazioni subletali e l'analisi è stata condotta attraverso l'integrazione di informazioni provenienti dall'applicazione di diverse metodiche di indagine microscopica.

Essa è stata infatti effettuata per mezzo di tecniche di microscopia ottica, microscopia elettronica a scansione ed a trasmissione al fine di

valutare le alterazioni morfologiche ed ultrastrutturali, e per mezzo di tecniche di immunofluorescenza ed immunoistochimica per la valutazione di alcuni parametri funzionali.

Per valutare gli effetti del cadmio sul tono vasale e sulla motilità branchiale abbiamo testato l'andamento di anticorpi rivolti contro la serotonina (5-HT), il peptide intestinale vasoattivo (VIP), e l'isoforma neuronale dell'ossido nitrico sintasi (n-NOS). Per verificare l'eventuale squilibrio ionico ed osmotico abbiamo marcato la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasi}$ e l'acquaporina 3 (AQP3). Per indagare sull'eventuale meccanismo di recupero dell'epitelio e l'instaurarsi di meccanismi di detossificazione, abbiamo testato l'andamento delle metallotioneine (MT) e della isoforma inducibile della NOS (i-NOS).

La marcatura della caspasi3 ci è infine servita per valutare l'apoptosi cellulare a livello dell'epitelio branchiale dopo esposizione a cadmio.

I dati da noi ottenuti possono rappresentare un importante strumento per l'individuazione di misure di sicurezza atte a prevenire l'inquinamento marino e per la messa a punto di metodi per il monitoraggio dell'inquinamento da metalli pesanti, al fine di stabilire limiti per l'utilizzo e l'emissione di tali sostanze nell'ambiente acquatico.

CAPITOLO 1

Inquinamento marino

1.1 Inquinamento

Per inquinamento si intende “l'immissione nell'aria, nell'acqua, nel suolo di materia e/o energia tali da provocare un'alterazione persistente e talvolta irreversibile delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche dell'ecosistema” (Della Croce *et al.*, 2001).

L'inquinamento può avere origine naturale (grandi incendi, grandi anossie di corpi idrici da esplosioni algali, eruzioni vulcaniche, ecc.) o antropica: guerre (ad esempio l'uso di armi all'uranio impoverito), trasporti (versamenti accidentali di petrolio in mare da petroliere), uso di tecnologie industriali obsolete (Provini *et al.*, 1998).

La maggior parte delle sostanze inquinanti derivano da scarti o rifiuti, che possono presentarsi allo stato solido, liquido o gassoso, generati dall'uomo durante le attività di estrazione, trasformazione o utilizzo di una determinata risorsa. Occorre però precisare che anche la produzione di calore, rumore e radiazioni sono fonte di fenomeni di inquinamento.

Gli effetti delle sostanze inquinanti su un ecosistema dipendono essenzialmente da tre fattori: la natura chimica, la persistenza e la concentrazione.

Sulla base della loro natura chimica gli inquinanti possono essere più o meno dannosi per gli organismi viventi. La persistenza viene definita come permanenza di un determinato inquinante negli organismi e negli ecosistemi. In relazione alla loro permanenza quindi si distinguono inquinanti degradabili, lentamente degradabili e non degradabili. Sono definiti degradabili quando vengono inattivati e degradati dai processi fisici, chimici e biologici naturali in modo alquanto rapido; lentamente degradabili sono invece quegli inquinanti che richiedono dei tempi molto lunghi per inattivarsi e infine, si definiscono non degradabili le sostanze che non vengono eliminate mediante processi naturali (Bullini *et al.*, 1998).

L'inquinamento inoltre si distingue in due grandi categorie: l'inquinamento acuto e quello cronico. Per inquinamento acuto si intende un fenomeno massivo che avviene in tempi e spazi ristretti, che crea danni di tipo catastrofico e avviene generalmente ad opera di eventi imprevedibili e accidentali. Un esempio di inquinamento acuto è lo sversamento di petrolio nelle acque. L'inquinamento cronico, invece, non genera mortalità immediata, ma è un fenomeno che si protrae in modo più o meno costante nel tempo, a causa della presenza di agenti che alterano l'ecosistema ambientale.

Questa forma di inquinamento deriva prevalentemente dall'uso continuo delle acque fluviali e costiere per lo smaltimento di sostanze o energia di rifiuto (Della Croce *et al.*, 2001).

1.2 Inquinamento degli ambienti acquatici

Secondo la definizione ufficiale dell'ONU per inquinamento marino s'intende l'immissione in mare diretta o indiretta di sostanze e di energie che producono effetti negativi sulla qualità delle acque, sulla salute umana e sulle risorse biologiche (Cognetti *et al.*, 2004). Questo processo può anche essere d'origine naturale (ad esempio eruzioni vulcaniche, alluvioni, frane) ma di norma è dovuto all'attività dell'uomo.

I fiumi sono tra i principali vettori dell'inquinamento marino in quanto rappresentano l'ambiente in cui maggiormente vengono riversate molte sostanze nocive e di rifiuto delle città e delle attività industriali, provocando non solo un'alterazione delle biocenosi fluviali ma anche cambiamenti radicali nelle caratteristiche ambientali della fascia costiera. Fortunatamente gran parte degli inquinanti vengono rapidamente smaltiti dai corsi d'acqua per via di fenomeni di diluizione e degradazione ad opera di decomposizione batterica.

Anche i laghi rappresentano un ambiente acquatico fortemente utilizzato per lo smaltimento di sostanze di rifiuto, ma in questo caso i processi di depurazione spontanea sono molto meno efficaci. L'accumulo di sostanze inquinanti di varia natura rappresenta un sostanziale problema non soltanto per molti organismi acquatici ma anche per l'uomo. A seconda di diversi fattori chimici, cui abbiamo già accennato gli effetti inquinanti vanno via via smorzandosi nel tempo e nello spazio. Tra i fattori che hanno un ruolo fondamentale nella depurazione spontanea si ricordano ad esempio:

- 1) *la diffusione turbolenta* delle acque costiere che provoca un rimescolamento e una diluizione degli inquinanti grazie alla formazione di moti irregolari e multidimensionali.
- 2) *la luce* che ha un ruolo importante nel favorire il decadimento batterico.

- 3) *il pH marino*, più alcalino rispetto a quello delle acque reflue e che agevola la precipitazione dei metalli nei sedimenti (Della Croce *et al.*, 2001).

L'esito dell'autodepurazione dipende anche della solubilità, facilità di precipitazione e di sedimentazione delle sostanze di rifiuto e della portata della massa d'acqua in cui esse sono riversate (Cognetti *et al.*, 1974).

In base al loro comportamento nell'acqua, i contaminanti ambientali si possono dividere in quattro categorie: biodegradabili, non conservativi, particellati e conservativi.

1.3 Contaminanti biodegradabili:

Sono suscettibili alla degradazione batterica, la cui attività è influenzata dalla consistenza dello scarico e dalla disponibilità di O₂.

Sono costituiti da materiale organico e provengono da:

- scarichi urbani e di particolari industrie
- terreni coltivati attraverso le acque di drenaggio
- perdite di petrolio

Gli scarichi urbani contengono in prevalenza sostanze organiche derivanti dall'attività dell'uomo: deiezioni, resti di animali e vegetali, detersivi. In particolare i detersivi sono molecole costituite da una parte liposolubile (idrofobica) e da un'altra idrosolubile. Questa caratteristica di affinità sia per l'acqua che per i grassi ottiene come effetto che le particelle di grasso si sciolgano nella parte liposolubile della molecola e vengano quindi portate in soluzione acquosa dalla parte idrosolubile.

La pericolosità di tali sostanze è dovuta al fatto che, una volta disperse nell'ambiente, tendono a legarsi al doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari solubilizzandole rapidamente. Inoltre nella produzione dei detersivi vengono utilizzati polifosfati; questi sono necessari per diminuire la durezza delle acque urbane dovuta alla presenza di ioni calcio;

la grande quantità di fosfati che arriva così in mare può dare origine al processo di eutrofizzazione (Cognetti *et al.*, 2004).

I fenomeni di eutrofizzazione sono innescati dall'immissione in mare di notevoli quantità di sostanza organica e di nutrienti inorganici (nitriti, nitrati, ioni ammonio, fosfati) attraverso la rete fluviale e fognaria, soprattutto in ambienti caratterizzati da acque poco profonde in cui il ricambio idrico è ridotto. Nei processi di eutrofizzazione si assiste da un lato a uno sviluppo abnorme di alghe ed essudati organici e dall'altro al forte consumo di ossigeno da parte dell'attività eterotrofa, principalmente batterica, nel processo di demolizione della materia organica (Della Croce *et al.*, 2001).

Tra i contaminanti biodegradabili ricordiamo anche il **petrolio** e i suoi derivati. Essi rappresentano una delle principali fonti energetiche ma la loro gestione è complessa dal punto di vista ambientale in quanto presenta aspetti assai rischiosi sia in fase estrattiva che di trasporto e di raffinazione. Gran parte del petrolio greggio viene trasferito dai paesi di origine ai paesi trasformatori via mare e il Mediterraneo è interessato da un intenso traffico marittimo. L'Italia si trova al centro di questo crocevia ed ha sviluppato dal dopoguerra un'importante industria petrolifera di stoccaggio e di raffinazione.

Il petrolio è una miscela di idrocarburi più o meno densi, la cui composizione varia moltissimo a secondo dell'area d'origine. Gli idrocarburi in base alle loro caratteristiche chimiche sono suddivisi in tre classi principali:

- 1) idrocarburi saturi o paraffine con solo legami C-C (ad esempio gli idrocarburi gassosi come il metano, l'etano etc.)
- 2) idrocarburi insaturi che posseggono un numero variabile di doppi legami tra atomi di carbonio adiacenti
- 3) idrocarburi aromatici che posseggono uno più nuclei benzenici, costituiti da anelli di 5 o 6 atomi di carbonio che li

rendono particolarmente stabili (benzene e i suoi derivati e gli idrocarburi aromatici policiclici).

Il petrolio, inoltre, contiene in percentuali più o meno importanti a seconda della sua provenienza, anche alte concentrazioni di zolfo che rappresentano nel corso della lavorazione del prodotto un'altra fonte di inquinamento non trascurabile. Durante la fase di estrazione e di trasferimento a terra del greggio, i problemi ambientali sono essenzialmente legati a possibili perdite dalle flange o dalla testa del pozzo. Perdite di greggio avvengono anche durante un naufragio, durante il lavaggio delle cisterne di una petroliera o per danni gravi agli impianti d'estrazione e stoccaggio.

A prescindere dagli aspetti tossicologici legati alla presenza di molti idrocarburi nell'ambiente, quelli meno densi tendono a distendersi in uno strato molto sottile sulla superficie del mare, riducendo localmente e temporaneamente il tasso di fotosintesi e lo scambio gassoso all'interfaccia aria/acqua. Sulla spiaggia gli idrocarburi provocano la morte delle biocenosi con cui inevitabilmente vengono in contatto; se affondano o vengono affondati, interagiscono con i popolamenti bentonici profondi alterandone la struttura (Della Croce *et al.*, 2001).

La tossicità degli idrocarburi è legata essenzialmente alla volatilità e al carattere aromatico delle molecole. Il benzene e il toluene insieme al naftaline, benzopirene e fenentrene sono considerati tra le sostanze più direttamente cancerogene poiché tendono ad accumularsi nei grassi e quindi difficilmente eliminabili dall'organismo. Negli animali gli idrocarburi policiclici aromatici possono venire ossidati ad epossido da una monossigenasi associata al citocromo P450 presente nel reticolo endoplasmico delle cellule. L'eossido può attaccare macromolecole come il DNA oppure essere trasformato in diolo dando mediante reazioni di detossificazione (Cognetti *et al.*, 2004).

1.4 Contaminanti non conservativi

Sono costituiti da quelle sostanze generalmente di origine industriale che perdono rapidamente le loro proprietà una volta che raggiungono le acque e pertanto la loro azione si limita all'area di scarico con un grado di dispersione in rapporto alla quantità immessa.

Si tratta di sostanze acide o alcaline che vengono rapidamente neutralizzate dal potere tampone dell'acqua (Cognetti *et al.*, 2004).

1.5 Contaminanti particellati

Ne fanno parte materiali inerti di grandezza variabile (materiali terrigeni, caolino, vari tipi di materie plastiche) che possono impedire la fotosintesi e danneggiare gli apparati respiratori e filtratori degli organismi (Cognetti *et al.*, 2004).

1.6 Contaminanti conservativi

Sono sostanze che permangono nelle acque senza subire degradazione, tendendo a concentrarsi negli organismi attraverso le catene alimentari. Comprendono i composti organo-alogenati e i metalli pesanti (Cognetti *et al.*, 2004).

Tra i contaminanti non conservativi si ricordano: i composti organo-alogenati ed i metalli pesanti.

I composti organo alogenati costituiscono un vasto gruppo di molecole organiche contenenti uno o più atomi di alogeni (fluoro, bromo e soprattutto cloro). La maggior parte di questi composti riscontrati in mare sono prodotti dalle industrie (insetticidi, diserbanti, conduttori termici) e costituiscono una preoccupante fonte di inquinamento. Gli insetticidi, pesticidi e vari altri composti di ampia applicazione industriale sono composti organo-clorurati insolubili in acqua e solubili nei grassi e per lo più resistenti all'azione batterica.

Una volta immessi nell'ambiente, quindi, provocano notevoli danni per la loro persistenza e tossicità (Cognetti *et al.*, 2004).

Tra i pesticidi, il più famoso è il DDT (diclorodifeniltricloroetano) che ha contribuito in maniera determinante a sconfiggere, almeno in Europa, la malaria. Però, accumulandosi velocemente nei tessuti ha interferito sul metabolismo del Ca^{2+} e sull'attività riproduttiva di molte specie. Ad esempio, nell'anguilla è stato osservato che il DDT a concentrazioni di 5 ppm inibisce l'attività enzimatica della $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasi determinando il malfunzionamento dei meccanismi di osmoregolazione. Altri effetti riguardano modificazioni nella struttura della membrana cellulare del SNC in seguito alla fissazione di molecole organoclorate con conseguente blocco delle funzioni. Molti pesticidi inoltre si sono rivelati inibitori del sistema di trasporto degli elettroni o delle ossidasi che svolgono un ruolo importante nei processi di detossificazione (Della Croce *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda i metalli, essi possono essere distinti dal punto di vista qualitativo in essenziali e non essenziali.

I primi comprendono (Fe, Cu, Zn, Cr, Ni, Co, Mo, Mn); essi sono richiesti dall'organismo a concentrazioni minime e sono coinvolti in molteplici funzioni biologiche come costituenti essenziali di molti enzimi. Esistono dei valori di concentrazione intracellulare ottimali, al di sotto dei quali l'organismo entra in sofferenza. Gli altri, invece, (Hg, Cd, Pb e Sn) non sembrano avere alcun ruolo nei cicli vitali e vengono quindi definiti non essenziali (Cognetti *et al.*, 2004).

Tutti però ad alte concentrazioni possono avere effetti tossici importanti interferendo nel metabolismo cellulare (Della Croce *et al.*, 2001). Nella maggior parte dei ecosistemi acquatici la concentrazione dei metalli disciolti è superiore ai livelli considerati accettabili e sono presenti come miscele nell'ambiente a causa del loro rilascio dall'erosione delle rocce, ma anche dal contributo dell'uomo mediante le attività di scavo e

dagli usi industriali. Ad esempio, le industrie galvaniche hanno come prodotti di scarto ferro, zinco e nichel. Mentre negli arenili alla foce del fiume Arno, nel cui bacino è concentrato il 50% delle concerie italiane, il contenuto di cromo e cadmio è venti volte superiore a quello di spiagge di zone limitrofe non direttamente interessate alle acque fluviali (Della Croce *et al.*, 2001).

1.7 Effetti tossici dei metalli pesanti e loro provenienza

1.7.1 Mercurio

Il mercurio, presente in natura, deriva dalla immissione nell'ambiente dovuta all'azione di agenti atmosferici sulle rocce mercurifere ed alle attività vulcaniche. La sua immissione nell'ambiente deriva inoltre dalle industrie elettrolitiche, dai fumi di carbon fossile, dai pesticidi a base di composti di mercurio; Una caratteristica del mercurio e dei suoi sali è la volatilità che comporta la sua deposizione in mare tramite la pioggia e i corsi d'acqua. In mare la flora batterica trasforma sia il mercurio metallico che i suoi complessi in metilmercurio - $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$ - che è solubile nei lipidi e quindi attraversa facilmente la membrana cellulare (Cognetti *et al.*, 2004).

1.7.2 Rame

Il rame è presente in natura sotto forma di due tipi di ioni: rameosi e rameici. La maggior parte dell'apporto di ioni rame al mare proviene dall'erosione delle rocce; l'uomo contribuisce usando sali di rame come fungicidi in agricoltura, nelle vernici e in vari attività industriali. L'effetto tossico sugli organismi è notevole. Tuttavia popolazioni di specie tendenzialmente opportuniste riescono ad adattarsi in zone inquinate da elevate quantità di ioni rameici, concentrando nel loro interno notevoli quantità di questo elemento (Cognetti *et al.*, 2004)

1.7.3 Piombo

La presenza di piombo negli ambienti acquatici è dovuta a fenomeni meteorologici ed all'attività vulcanica ma anche alle attività antropiche. Il piombo è presente nei combustibili, nelle batterie e nelle vernici e deriva inoltre dall'utilizzo del carbone e dalle industrie che lavorano bronzo e cemento.

Molte specie animali mostrano una notevole tolleranza a questo inquinante. I mitili ad esempio hanno un meccanismo di detossificazione che permette loro di accumulare il piombo sotto forma di granuli metallici che vengono isolati dall'organismo (Cognetti *et al.*, 2004).

1.7.4 Cromo

Il cromo è un elemento essenziale nel metabolismo dei glucidi, ma un suo eccesso è tossico specialmente nel caso dello ione esavalente cromato (CrO_4^{2-}) responsabile di danni ulcerativi alla pelle e alle mucose (BIBLIO). Il cromo è un elemento diffuso in natura; la sua presenza in mare è dovuta oltre che a fenomeni naturali all'uso che ne viene fatto in vari procedimenti industriali (cromature di metalli, concerie, tintorie ecc.) (Cognetti *et al.*, 2004).

1.7.5 Cadmio

Il Cadmio è un metallo largamente utilizzato nell'industria; è presente nei conduttori elettrici, in vari tipi di contenitori, nelle ceramiche, nei prodotti antiruggine; è inoltre un componente di varie leghe e viene utilizzato nell'industria fotografica e di placcatura, nella fabbricazione di apparecchiature TV, nella lavorazione di materie plastiche e nella produzione di batterie.

Questo metallo si libera nell'ambiente e nel suolo attraverso l'estrazione mineraria, la fusione di metalli, l'utilizzo del combustibile, l'incenerimento dei materiali di scarto e la produzione di fertilizzanti a base

di fosfati (Szebedinszky *et al.*, 2000). La concentrazione di cadmio ammonta a 0,01-0,1 µg/l nei fiumi e nei laghi non inquinati, mentre nei sistemi che ricevono scarichi industriali la concentrazione di tale metallo può raggiungere valori di 0,5 µg/l o anche maggiori. Il Cd²⁺ insolubile in acqua tende ad accumularsi nei sedimenti e negli organismi acquatici interferendo con il loro bilancio ionico (Hwang *et al.*, 1995).

Così come per altri metalli anche il cadmio può entrare nella catena alimentare, accumularsi negli organismi marini che fungono poi da vettori di contaminanti per l'uomo attraverso la catena alimentare. Le principali vie di esposizione per l'uomo sono l'inalazione e l'ingestione di cibo contenente Cd²⁺. Gli effetti del Cadmio sull'uomo sono molteplici. Questo metallo può generare danni a polmoni, reni e indurre malattie respiratorie e disordini neurologici (Liao & Freedman, 1998).

Nei pesci il cadmio si accumula solitamente nel fegato, nelle branchie, nei reni (De Smet & Blust, 2001; Szebedinszky *et al.*, 2001). A livello epatico il Cd²⁺ è in grado di indurre l'espressione dell'mRNA codificante per le metallothioneine (MT), proteine a basso peso molecolare (6-7 kDa) che sembrano avere un ruolo importante nel sequestro e quindi detossificazione di metalli pesanti (Dang *et al.*, 1999). La presenza e l'inducibilità delle metallothioneine in seguito ad accumulo dei metalli pesanti è stata verificata per varie specie di pesci fra cui la carpa comune (*Cyprinus carpio*), la trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*) e la tilapia (*Oreochromis mossambicus*). La tossicità del Cd²⁺ coinvolge non solo fegato, branchie, reni ma anche l'encefalo degli organismi acquatici. In alcune specie di pesci, l'esposizione a tale metallo comporta significative alterazioni comportamentali (Scott *et al.*, 2003; Giusi *et al.*, 2005). Nei pesci l'esposizione prolungata al Cd²⁺ determina l'indebolimento delle risposte comportamentali ai feromoni di allarme come diretta conseguenza della distruzione del sistema olfattivo, il quale gioca un ruolo importante in

molti comportamenti, quali la ricerca di cibo e le interazioni sociali (Sloman *et al.*, 2003).

Il cadmio è stato riconosciuto come uno dei metalli pesanti più tossici (Stoeppler, 1991). La commissione europea ha inserito questo metallo nella lista 1 delle sostanze pericolose per l'ambiente in base alla persistenza, alla tossicità e all'accumulo nei tessuti di vari organismi come bivalvi e pesci stabilendo in proposito limiti per l'emissione, regole per la gestione dei rifiuti, valori limite per gli scarichi e per la concentrazione nei generi alimentari. I livelli di cadmio, risultano più alti in prossimità degli estuari e dei porti.

Il mar Mediterraneo risente molto dell'inquinamento da metalli pesanti con una concentrazione di 15 volte superiore a quella riscontrata nelle acque degli oceani (Migliarini *et al.*, 2005).

Il dato preoccupante è che secondo un rapporto del WWF del 13 novembre 2003, l'Italia è il primo paese nell'inquinamento marino da metalli pesanti essendo responsabile del 30% dei rilasci totali di queste sostanze trovate nel mediterraneo.

CAPITOLO 2

La respirazione nei vertebrati acquatici

Premessa

L'acquisizione dell'ossigeno e l'eliminazione della CO₂ sono i due passaggi basilari della respirazione cellulare.

Il trasferimento di ossigeno e anidride carbonica avviene passivamente attraverso la superficie corporea e la portata di questo fenomeno è dunque determinata soprattutto dalla superficie di scambio disponibile.

La richiesta di ossigeno e la produzione di anidride carbonica di un animale aumentano in proporzione alla sua massa ed allo stato di attività; poiché l'area della superficie cresce in ragione del quadrato mentre il volume aumenta in ragione del cubo, il rapporto tra area di superficie e volume di un animale è adeguatamente elevato solo in animali molto piccoli ed il trasporto per diffusione sarà sufficiente a sostenere metabolicamente solo organismi delle dimensioni massime di circa 0.5 mm di raggio.

Le richieste del metabolismo di un organismo di dimensioni maggiori non possono essere soddisfatte solo da un trasporto per diffusione attraverso la sua superficie esterna e negli animali si sono dunque evoluti diversi sistemi per facilitare lo scambio gassoso con l'ambiente.

Nei Vertebrati vengono utilizzati per la respirazione organi diversi come branchie, polmoni e tegumento. Tutte le aree specializzate per lo scambio dei gas hanno ampie superfici e sono caratterizzate da epiteli sottili e riccamente vascolarizzati; questo tipo di struttura di base garantisce infatti una stretta associazione tra il sangue e il mezzo esterno e, grazie alla piccolissima distanza di diffusione, lo scambio dei gas può avvenire rapidamente.

2.1 Fattori che influenzano gli scambi gassosi

Gli scambi respiratori sono affidati, come abbiamo detto, a sistemi specializzati. La struttura di un sistema per lo scambio dei gas è influenzata dalle proprietà del mezzo e dalle esigenze degli organismi: gli animali a respirazione aerea e quelli a respirazione acquatica hanno dunque apparati respiratori molto differenti come diverse sono le modalità di aerazione.

Il paragone tra la composizione gassosa e le caratteristiche fisiche di acqua e aria mette in evidenza i diversi ordini di problemi che i vertebrati acquatici devono affrontare nell'effettuare gli scambi respiratori.

Il contenuto di ossigeno dell'aria è circa 20 volte superiore a quello dell'acqua satura di aria ed inoltre il tasso di diffusione dell'ossigeno nell'acqua è molto inferiore rispetto al suo tasso di diffusione nel mezzo aereo; è dunque evidente che, per estrarre una determinata quantità di ossigeno, il volume di acqua che deve passare sulla superficie respiratoria di un vertebrato acquatico è molto maggiore del corrispondente volume di aria che deve ventilare il polmone in un animale terrestre.

Inoltre, la densità dell'acqua (1000 volte superiore a quella dell'aria a pressione normale) e la sua viscosità (100 volte quella dell'aria) impongono un lavoro respiratorio molto maggiore. Il 20% del consumo di ossigeno di un pesce, ad esempio, viene speso proprio per sostenere la respirazione ed è una percentuale piuttosto alta se confrontata alla percentuale di ossigeno spesa per la respirazione polmonare dai Mammiferi che è pari solo all'1-2%.

La CO₂ al contrario, è estremamente solubile in acqua e gli ambienti acquatici hanno di solito pressioni parziali di anidride carbonica superiori a quelle dell'atmosfera.

La quantità di ossigeno disciolto nei corpi idrici naturali è determinata da diversi fattori. L'ossigeno disciolto nell'acqua si origina

dalla fotosintesi operata dalle piante acquatiche e dall'atmosfera grazie al fenomeno di diffusione.

Varie azioni naturali di miscelazione distribuiscono i gas nei corpi idrici. I corsi d'acqua vengono aerati quando l'acqua percorre rapide. Nei corpi idrici più grandi le onde aerano gli strati superficiali, ma i loro effetti sono minimi al disotto di qualche metro. I corpi idrici stazionari, comprendenti i laghi, gli oceani ed i mari, si miscelano grazie ai movimenti convettivi causati dal riscaldamento diurno ad opera dei raggi solari, dal raffreddamento notturno dovuto all'evaporazione e dalle variazioni stagionali della temperatura. La convezione tuttavia di solito non influenza gli strati profondi dei corpi idrici stazionari di grandi dimensioni ed il contenuto di ossigeno può variare notevolmente procedendo dalla superficie verso il fondo.

Una forte riduzione di ossigeno ed un notevole aumento della pressione parziale di CO₂ possono essere provocate dalla decomposizione della sostanza organica ad opera dei microrganismi presenti nel sedimento; effetto analogo hanno la prolungata oscurità ed il ridotto scambio con l'atmosfera causati dalla copertura di neve e ghiaccio. In quest'ultimo caso, la copertura della superficie impedisce all'ossigeno atmosferico di diffondere nel mezzo acquatico e inoltre l'assenza di energia luminosa ostacola la fotosintesi algale; il mancato apporto di ossigeno, unitamente ad un invariato consumo da parte degli organismi, comporta un drastico abbassamento del tenore di ossigeno che spesso provoca la cosiddetta "uccisione invernale", una vasta moria di animali acquatici frequente soprattutto nei laghi e negli ambienti acquatici stagnanti di medie e piccole dimensioni.

Altri fattori importanti nel determinare il contenuto di ossigeno nel mezzo acquatico sono la temperatura e la salinità.

La solubilità di un gas nell'acqua diminuisce con l'aumentare della temperatura; un cambiamento da 5° C a 35° C riduce il contenuto di ossigeno da 9 ml/l a 5 ml/l. Per contro l'aumento di temperatura produce negli animali ectotermi un incremento nel metabolismo e dunque un maggiore dispendio di ossigeno; gli animali che vivono negli stagni e nei corsi d'acqua poco profondi, dove la temperatura può raggiungere valori estremi, devono dunque far fronte a questo duplice svantaggio provocato dal rialzo termico.

La solubilità dell'ossigeno decresce anche in ragione dell'aumentare della concentrazione salina e, a tutte le temperature, l'acqua di mare contiene meno ossigeno rispetto all'acqua dolce. Infatti, nelle identiche condizioni di temperatura e pressione parziale l'acqua al 3,6% di NaCl (approssimativamente la salinità dell'oceano) contiene 38 ml O₂/l mentre l'acqua pura contiene 49 ml O₂/l.

2.2 L'apparato branchiale

Al fine di aumentare la superficie disponibile per gli scambi gassosi i Pesci e gli Anfibi allo stadio larvale utilizzano l'apparato branchiale.

Le branchie non svolgono però solo una funzione respiratoria e nelle diverse classi di Vertebrati si assiste ad una diversificazione e specializzazione di questa struttura la quale è spesso coinvolta nella regolazione osmotica e acido-base e può in alcuni casi svolgere, come vedremo più avanti, un ruolo attivo anche nell'alimentazione.

2.3 Le branchie dei pesci

La struttura e l'organizzazione dell'apparato branchiale sono estremamente variabili all'interno della superclasse *Pisces* e differenze morfologiche e strutturali sono riscontrabili anche nei *taxa* di rango inferiore quali ordine e famiglia; molto spesso quindi, l'organizzazione

della componente scheletrica dell'apparato branchiale è stata utilizzata come una delle caratteristiche fondamentali nella filogenesi dei Vertebrati.

2.3.1 Condroitti

Il cranio viscerale degli Elasmobranchi è costituito da diversi elementi cartilaginei; la prima arcata cartilaginea è detta arcata mandibolare mentre la seconda è l'arcata ioidea; le arcate cartilaginee successive sono le arcate branchiali, generalmente in numero di 5-6. Il condotto spiracolare è collocato tra le arcate mandibolare e ioidea mentre le camere branchiali sono collocate tra l'arcata ioidea e la prima arcata branchiale e tra le arcate branchiali successive. Ogni emiarcata branchiale è costituita da 4 elementi cartilaginei (faringobranchiale, epibranchiale, ceratobranchiale e ipobranchiale) in genere distinti con numeri romani.

Il condotto spiracolare non contiene strutture respiratorie. Ciascuna arcata branchiale invece emette lateralmente un setto branchiale che raggiunge la superficie; i setti branchiali sono rivestiti dalla lamina branchiale che rappresenta la struttura respiratoria.

Il setto branchiale è costituito dai raggi branchiali, bastoncelli cartilaginei che si dipartono perpendicolarmente dall'arcata branchiale; la lamina respiratoria risulta così suddivisa in altrettante lamelle branchiali primarie quanti sono i raggi branchiali; da ciascuna lamella si dipartono poi numerose lamelle secondarie.

L'arcata branchiale, inoltre, emette medialmente brevi processi scheletrici detti branchiostegi che ostruiscono in parte le aperture che immettono dal faringe alle camere branchiali; essi costituiscono così una sorta di filtro che impedisce alle particelle alimentari di entrare nelle camere respiratorie.

Rispetto agli Elasmobranchi, gli Olocefali mostrano differenze significative nell'organizzazione dell'apparato branchiale; si assiste infatti alla scomparsa degli spiracoli ed alla obliterazione dell'ultima fessura

branchiale. Inoltre, mentre negli Elasmobranchi la porzione terminale di ciascun setto branchiale si proietta all'indietro col suo rivestimento epiteliale a proteggere, verso l'esterno, l'apertura branchiale successiva, negli Olocefali si assiste alla comparsa di un'unica e ampia piega cutanea che riveste, come un opercolo, le 4 fenditure branchiali molto ravvicinate tra loro.

Il meccanismo respiratorio dei pesci cartilaginei è molto semplice: l'acqua entra dalla bocca, la quale poi si chiude, e il pavimento della regione orale si solleva per spingere l'acqua sulle branchie e farla poi fuoriuscire dalle fenditure branchiali.

2.3.2 Osteitti

Negli Osteitti, l'organizzazione dello splancnocranio appare più complessa rispetto a quella osservata nei Condroitti e si assiste alla comparsa di nuovi elementi scheletrici di natura ossea.

L'arcata mandibolare e quella ioidea sono costituite da un numero elevato di elementi spesso articolati mobilmente tra loro. Anche ciascuna delle arcate branchiali, in numero di 5 per ciascun lato, è formata da più ossa denominate: faringobranchiale, epibranchiale, ceratobranchiale, ipobranchiale e basibranchiale; quest'ultimo connette tra loro le due arcate eterolaterali.

A differenza di quanto osservato negli Elasmobranchi, negli Osteitti si assiste all'assenza o rudimentazione dello spiracolo ed alla comparsa di una piega cutanea, detta opercolo, che ricopre le fenditure branchiali. Una struttura analoga è presente, come abbiamo visto, negli Olocefali ma essa è costituita esclusivamente dalla cute mentre negli Osteitti questa struttura è sostenuta da lamine ossee dette appunto ossa opercolari.

La comparsa degli opercoli si associa anche a modificazioni delle branchie. I setti branchiali, presenti nei Condroitti, regrediscono progressivamente fino a scomparire completamente e le lamelle branchiali

si inseriscono direttamente sull'arcata branchiale conferendo alla branchia degli Osteitti la caratteristica conformazione "a pettine". Ciascun arco branchiale porta sul margine esterno due serie di filamenti o lamelle dalle quali si dipartono una fila superiore ed una inferiore di lamelle secondarie. Sul margine interno, l'arco porta invece una serie di branchiospine, provviste di numerosi dentelli che costituiscono una sorta di filtro atto a proteggere la branchia dai danni che potrebbero arrecare le particelle di cibo o i corpi estranei.

La modificata architettura dell'apparato branchiale, rispetto a quella degli Elasmobranchi, si associa ad una differente meccanica nell'assunzione di acqua. Il meccanismo respiratorio dei Pesci ossei si attua in due tempi: nella fase inalante gli opercoli si chiudono e la cavità boccale si dilata aspirando acqua dalla bocca; simultaneamente le camere branchiali si dilatano creando un gradiente pressorio che fa fluire l'acqua sulle branchie. Nella fase esalante la cavità boccale si contrae e le valvole orali passive si chiudono impedendo il reflusso dell'acqua che viene così forzata sulle branchie e fuoriesce poi attraverso gli opercoli.

2.4 L'epitelio delle branchie dei pesci

Il filamento branchiale rappresenta l'unità funzionale della branchia in quanto è dotato di un sistema motore proprio ed è sede dei principali siti di controllo vascolare. L'unità respiratoria è rappresentata invece dalla lamella secondaria dove avvengono gli scambi gassosi.

La branchia dei Pesci, infatti, non svolge solo la funzione respiratoria ma rappresenta anche sede della osmoregolazione e dello scambio ionico; questa diversità funzionale si riflette sulla morfologia degli epitelii deputati alle diverse funzioni.

2.4.1 L'epitelio del filamento

L'epitelio del filamento è multistratificato e riveste i filamenti branchiali, con l'esclusione delle lamelle, e le superfici anteriori e laterali degli archi branchiali. Esso è costituito da 5 tipi cellulari: cellule indifferenziate (cellule basali), cellule pavimentose, cellule mucose (“goblet cells”) e “chloride cells” (Laurent, 1984).

Cellula pavimentosa - E' una cellula di superficie di forma poligonale dal diametro di 3-10 μ ; essa rappresenta il tipo cellulare più comune nell'epitelio del filamento. Diversi studi condotti al SEM (Hughes, 1979; Kendall & Dale, 1979) hanno mostrato la presenza, sulla superficie esterna della cellula pavimentosa, di un complesso sistema di microcreste. Le microcreste possono variare leggermente in forma e dimensioni nelle diverse specie ma in genere hanno una lunghezza che varia da 5 a 15 μ ed una larghezza compresa tra 0.15 e 0.20 μ . Nella porzione superficiale il confine tra le cellule pavimentose adiacenti non è sempre chiaramente definito ma in molti casi le microcreste che decorrono parallelamente al limite cellulare rendono tale confine piuttosto marcato.

Un altro tipo di cellula pavimentosa è presente nell'epitelio del filamento: la cellula colonnare; questo secondo tipo cellulare, osservato al SEM non è distinguibile dalle altre cellule di superficie ma la sua ultrastruttura è invece caratteristica per la presenza di un grande numero di vescicole citoplasmatiche e per le profonde introflessioni delle membrane parietali.

Cellula mucosa (“goblet cell”) - Le cellule mucose sono collocate principalmente lungo i margini del filamento; solo poche cellule di questo tipo vengono rinvenute nell'area interlamellare dove prendono contatto con le “chloride cells”. Una lunga serie di osservazioni in differenti specie e in diverse condizioni sperimentali hanno mostrato tuttavia che il numero e la collocazione delle popolazioni di “goblet cell” è estremamente variabile.

In particolare il numero di cellule mucose è influenzato dalla salinità del mezzo acquatico. Nei Teleostei d'acqua dolce *Gambusia* e *Catla*, le cellule mucose scompaiono completamente quando il mezzo contiene cloro, persino a basse concentrazioni (Ahuja, 1970); in *Anguilla japonica* il numero diminuisce dopo un mese di acclimatazione in acqua salata. Nel pesce eurialino *Etroplus maculatus*, durante un graduale adattamento dall'acqua dolce all'acqua salata al 100% le cellule mucose subiscono un decremento numerico ma aumentano di dimensioni. Al 100% di acqua salata esse sono ridotte ad un numero trascurabile (Virabhadrachari, 1961).

Il ruolo delle cellule mucose non è ancora stato chiarito ma si ritiene che esse possano essere attivamente coinvolte nell'osmoregolazione: il numero più elevato di “goblet cell” rinvenuto nei pesci d'acqua dolce fa pensare ad un ruolo di controllo esercitato da questa cellula nella perdita di ioni o nell'influsso d'acqua.

“Chloride cell” - Una delle caratteristiche principali dell'epitelio branchiale dei Pesci è la presenza della “chloride cell”. Questo tipo cellulare è attivamente coinvolto nell'osmoregolazione ed è in grado di svolgere sia la funzione di escrezione ionica che la funzione di assorbimento.

Generalmente le CC si rinvengono nell'epitelio dei filamenti branchiali, ma a volte sono presenti anche nell'epitelio delle lamelle (Laurent 1984, 1989; Pisam & Rambourg, 1991). Oltre che nelle branchie, le “chloride cells” sono state rinvenute anche nella pelle dei pesci (Nonnotte *et al.*, 1979), nelle pseudobranchie (Laurent & Dunel 1980), e nell'epitelio opercolare (Karnaky *et al.*, 1984; Foskett *et al.*, 1981).

La “chloride cell” presenta, in genere, dimensioni maggiori rispetto agli altri tipi cellulari che costituiscono l'epitelio del filamento; spesso la CC si estende per l'intero spessore del foglietto epiteliale presentando così la porzione apicale a diretto contatto con il mezzo esterno e la porzione prossimale adagiata sulla membrana basale. La membrana plasmatica

apicale della “chloride cell”, nei pesci marini, è depressa a formare una cripta piuttosto profonda contenente muco e suddivisa da setti tra loro interconnessi o da microvilli; nei pesci d’acqua dolce, invece, la membrana apicale si presenta solo leggermente depressa (Pisam & Rambourg, 1991).

La CC è caratterizzata dalla presenza all’interno del citoplasma di un grande numero di mitocondri e di un sistema estremamente complesso di tubuli che si aprono verso la membrana basolaterale (Laurent, 1984, Pisam & Rambourg, 1991). Il sistema tubulare si estende attraverso l’intero citoplasma, eccetto che nell’area del Golgi e in una banda ristretta situata proprio sotto la superficie apicale delle “chloride cells” (Pisam & Rambourg, 1991). Questo complesso sistema di membrane plasmatiche basolaterali è ricco in Na^+/K^+ -ATPasi (Jürss & Bastrop, 1995); al contrario la membrana plasmatica apicale e le vescicole di secrezione mostrano una reazione istochimica debole per lo stesso enzima (Hootman & Philpott, 1979).

La “chloride cell”, nei Teleostei stenohalini marini e nei Teleostei eurialini acclimatati all’acqua salata, è circondata da cellule accessorie (Laurent, 1989) caratterizzate dalla presenza di processi citoplasmatici che penetrano nella porzione apicale delle CC. Le cellule accessorie hanno forma a pera o a semiluna e presentano un sistema tubulare simile a quello delle CC, ma meno sviluppato. Le porzioni apicali delle CC e le cellule accessorie associate formano un mosaico che crea le pareti delle cripte presenti nella membrana plasmatica apicale delle CC (Pisam & Rambourg, 1991).

2.4.2 L'epitelio lamellare: organizzazione e componenti cellulari nei Teleostei

L'epitelio lamellare riveste la ramificazione terminale delle branchie e rappresenta il sito principale degli scambi respiratori. Lo spessore degli strati è infatti modesto e dunque idoneo a consentire la diffusione dei gas.

L'epitelio lamellare si origina da cellule non differenziate dell'epitelio del filamento (Morgan, 1974) ed è costituito da due strati di cellule.

Tra lo strato più interno (sierosale o basale) e quello più esterno (mucosale o apicale), si colloca uno spazio intercellulare, che comunica con il seno venoso centrale attraverso gli spazi intercellulari dell'epitelio del filamento.

Le cellule che compongono i due strati presentano caratteristiche differenti ma in entrambi i casi è stata evidenziata, mediante studi al microscopio elettronico, la presenza nel citoplasma di numerosi organuli cellulari che sono indice dell'intensa attività di tutte le cellule (Laurent & Dunel, 1980).

Lo strato mucosale è costituito principalmente da cellule pavimentose; queste sono dotate di un apparato di Golgi molto sviluppato, di un abbondante reticolo endoplasmatico rugoso e di 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 per consentire il controllo nell'efflusso o nell'influsso attraverso la superficie branchiale la quale ha dimensioni quasi doppie rispetto all'intera area di superficie del corpo dell'animale (Hughes, 1979).

Le cellule superficiali sono legate tra loro tramite giunzioni strette e desmosomi; non sono state osservate giunzioni "gap".

Le giunzioni strette sono state studiate in esemplari di *Mugil capito* adattati all'acqua di mare e all'acqua dolce; in entrambi i casi sono state osservate giunzioni piuttosto lunghe, costituite da 5 a 9 microfilamenti anastomizzati tra loro. Questo modello di disposizione, che non varia in base al tipo di ambiente in cui l'animale vive, è compatibile con la classificazione delle giunzioni generalmente utilizzata e l'epitelio lamellare

può essere considerato un epitelio "stretto" e, pertanto, impermeabile agli elettroliti.

La superficie delle cellule è ricoperta da un materiale lanuginoso, contenente gruppi polisaccaridici; questo strato mucoso, probabilmente, si è ancora alle microcreste di superficie, evidenziate da Laurent & Dunel (1980) con studi di microscopia elettronica a scansione.

Lo strato basale o sierosale dell'epitelio lamellare è costituito, invece, da cellule poco o niente affatto differenziate, le quali sono a diretto contatto con la lamina basale. Il rapporto nucleo/citoplasma di queste cellule è molto elevato e la presenza di numerosi ribosomi liberi e di un reticolo endoplasmatico rugoso ben sviluppato suggeriscono l'inizio di un processo di differenziazione di queste cellule (Laurent & Dunel, 1980). Presumibilmente, la funzione di questo strato di cellule in differenziazione è quella di sostituire lo strato di cellule superficiali, così come si verifica con le cellule basali dell'epitelio del filamento. Solo occasionalmente le cellule basali si differenziano nelle "chloride-cells" (Laurent & Perry, 1991).

CAPITOLO 3

La specie studiata

3.1 Inquadramento sistematico

SUBPHYLUM	Vertebrati
CLASSE	Osteitti
SOTTOCLASSE	Actinopterigi
INFRACLASSE	Teleostei
ORDINE	Perciformi
FAMIGLIA	Labridi
GENERE	<i>Thalassoma</i>
SPECIE	<i>Thalassoma pavo</i>

Tab.3.1. Sistemica di *Thalassoma pavo* (Mitchell *et al.*, 1991)

3.2 Geonemia

Negli ultimi decenni l'innalzamento della temperatura del Mar Mediterraneo, già caratterizzato da un'abbondantissima biodiversità ha agevolato l'immigrazione di nuove specie prima tipicamente confinante alle fasce tropicali. Una di queste specie è *T.pavo* che oggi popola la fascia tropicale e subtropicale dell'Atlantico orientale e appunto tutto il Mediterraneo. In particolare nei mari italiani è abbastanza comune nel Basso Tirreno e nello Ionio. Poco frequente nell'Alto Adriatico e nel Mar Ligure (Costa, 2000).

3.3 Morfologia

Thalassoma pavo ha corpo fusiforme e compresso lateralmente, testa ovale a punta con muso corto e bocca piccola con labbra carnose assai sviluppate. Di qui appunto il nome con cui è contraddistinta la famiglia. L'occhio è piccolo e circolare, sulle mascelle sono inseriti denti appuntiti, a uncino, disposti su una sola fila. La pinna dorsale è unica con la porzione anteriore sorretta da raggi spinosi. Il profilo superiore dal muso alla base

della pinna dorsale è convesso. La pinna caudale è tronca negli esemplari giovani, con i lobi allungati ed appuntiti negli adulti. La pinna anale è allungata ma con raggi corti mentre quelle ventrali in posizione toracica sono piccole poste sotto le pettorali di dimensioni maggiori (Brunelli *et al.*, 2004).

Il corpo, ad eccezione della testa, è ricoperto di piccole squame il cui numero, sulla linea laterale, varia da 26 a 31. L'animale presenta scaglie cicloidi.

Si tratta senza dubbio di uno fra i pesci più colorati dei nostri mari, presenta infatti livree estremamente varie a dai colori vivaci.



Fig. 3.1 Foto rappresentativa di un esemplare femmina di *Thalassoma pavo*

Le femmine (Fig.3.1) hanno una colorazione di fondo verdastra con sei fasce verticali, che arrivano quasi al ventre, di colore violaceo con striature terminali rosse. La testa è generalmente violacea. Le pinne, dorsale e anale, presentano colori verdi, ciclamino e blu. La coda è variamente colorata con dominanza di toni violacei. All'apice delle pinne pettorali c'è una debole macchia brunastra. Caratteristica costante è la presenza sul dorso di una grossa macchia blu violetto molto intenso, a circa metà lunghezza dell'animale.



Fig 3.2. Foto rappresentativa di un esemplare maschio di *Thalassoma pavo*

I maschi (Fig 3.2), invece, si presentano con colori di fondo tendenti sempre al verdastro ma la testa è a chiazze rosse e blu. Una fascia azzurro, bordata da un'altra di colore rosso scarlatto circonda tutto il corpo all'altezza delle pinne pettorali. La pinna dorsale, superiormente, ha un bordo azzurro pallido seguito da una fascia longitudinale violacea, con sfumature rosse. La pinna pettorale ha all'apice una macchia nerastra. La coda ha i raggi esterni di colore rosso più o meno intenso. Da adulti gli esemplari di questa specie raggiungono una lunghezza massima di 20-25 cm (Brunelli *et al.*, 2004).

3.4 Riproduzione e sviluppo

Conformemente alle caratteristiche tipiche della sua famiglia, *T. pavo* è una specie ermafrodita proteroginica in cui cioè la gonade femminile si sviluppa e funziona prima di quella maschile. In un primo tempo la maggior parte degli individui si sviluppano come femmine ed in età avanzata possono mutare il loro assetto sessuale da femminile a maschile. L'inversione sessuale non è sempre contemporanea al cambiamento di livrea e dipende generalmente da fattori ambientali, sembra infatti che addirittura la temperatura dell'acqua partecipi a processo d'inversione. La

strategia riproduttiva è associata al territorialismo e alla difesa da parte del maschio dominante di un harem composto da un certo numero di femmine. In caso di morte del maschio o rimozione del maschio dominante, la femmina di maggiori dimensioni, cambia sesso nell'arco di alcuni giorni fino alla totale inversione sessuale e conseguente sostituzione del maschio. La riproduzione avviene tra giugno e luglio e porta alla produzione di un numero molto elevato di uova galleggianti che favoriscono la vita pelagica. Manca quindi ogni sorta di cura parentale (Costa, 2000; Mojetta & Ghisotti, 2000).

3.5 Habitat e biologia

Thalassoma pavo vive in habitat che spaziano dai fondali rocciosi ai fondali sabbiosi di mari e oceani temperati e tropicali. Le specie mediterranee vivono in acque costiere su fondi rocciosi e praterie di Posidonia. Può spingersi fino a 150 metri di profondità. Si alimenta di molluschi gasteropodi e crostacei. Si pesca occasionalmente con nasse e tramagli. Abbonca di rado alle lenze per via sia della bocca piccola e sia perché rosicchia l'esca fino a mettere a nudo l'amo. Gli esemplari di questa specie sono molto attivi durante il giorno, mentre nelle ore notturne, restano adagiati su un fianco o affonda nel substrato molle (Mojetta & Ghisotti, 2000).

CAPITOLO 4

Materiali e metodi

4.1 Provenienza del materiale e mantenimento in laboratorio

La specie scelta per il nostro studio è *Thalassoma pavo* un labride ampiamente diffuso nel Mediterraneo meridionale. Esso risulta un buon modello sperimentale perché potenzialmente soggetto agli agenti inquinanti che tendono ad accumularsi lungo le scogliere frangiflutti prossime alla riva, habitat ideale per questa specie. *Thalassoma pavo* ha inoltre dimensioni idonee al mantenimento in laboratorio e la sua ampia distribuzione lungo le coste calabresi riduce al minimo il rischio di incidere negativamente sull'andamento numerico delle popolazioni locali.

Gli animali utilizzati per lo studio sono stati prelevati in natura in località San Lucido, in provincia di Cosenza.

La qualità dell'acqua del sito di prelievo è stata più volte testata mediante analisi chimico-fisiche (Tab.4.1). La cattura è stata effettuata in diversi periodi dell'anno mediante retini a maglie strette ed utilizzando un'esca attrattiva. Gli animali catturati, tutti di dimensioni simili e allo stadio adulto, sono stati posti in vasche per il trasporto munite di ossigenatori e mantenuti ad una temperatura costante.

In laboratorio gli animali sono stati trasferiti in acquari da 80 litri precedentemente allestiti con acqua proveniente dal sito di prelievo.

Al fine di garantire una giusta procedura di acclimatazione, secondo quanto suggerito da Sprague (1969), gli acquari sono stati muniti di sistemi di filtraggio ed aerazione.

Per evitare l'insorgere di eventuali squilibri o alterazioni dovuti a fluttuazioni dei parametri chimico fisici dell'acqua, abbiamo mantenuto costanti per tutta la durata degli esperimenti gas disciolti, salinità, sali nutritivi, fotoperiodo e temperatura.

<i>Parametro</i>	<i>Valore</i>
pH	7,84
Conducibilità	80,01 ms/cm
Salinità	36/37‰
Temperatura	18-23 °C
Ossigeno disciolto	6,97 mg O ₂ /l
Durezza	32,8 °F
Tensione superficiale	66,2 din/cm
Inquinanti rinvenuti	Nessuno
Microrganismi patogeni	Assenti

Tab.4.1 Caratteristiche chimico fisiche delle acque prelevate nel sito di cattura dei pesci

4.2 Test tossicologici

Dopo un periodo di acclimatazione della durata di 5 giorni si è dato inizio alla fase sperimentale. Abbiamo effettuato due tipologie di esperimenti, una prima serie al fine di valutare l'LC50 del cadmio per *Thalassoma pavo*, una seconda serie al fine di valutare gli effetti morfologici e funzionali di 5 diverse concentrazioni subletali di cadmio sull'apparato branchiale di *Thalassoma pavo*.

4.2.1 Determinazione dell'LC50

Per testare la tossicità del cadmio su *T. pavo* abbiamo determinato la concentrazione letale media (LC50) a 96h, ossia la concentrazione che determina la morte del 50% degli individui dopo 96h di esposizione all'inquinante.

Gli esperimenti sono stati effettuati in acquari da 150 litri contenenti 15 pesci ciascuno. In questo caso le vasche utilizzate sono state private del sistema di filtraggio.

Si è quindi proceduto seguendo la modalità dei test tossicologici a rinnovo periodico come consigliato dall'EPA (2002) e la soluzione è stata sostituita con cadenza giornaliera. Il calcolo dell'LC50 è stato effettuato con il metodo di Finney (1971), utilizzando la versione 1.00 del software Probit Analysis sviluppato dall'EPA (1999). Il Probit è un metodo statistico standard per determinare l'LC50 associato ad un livello di confidenza del 95%. Tramite questo metodo è possibile verificare l'ipotesi di una relazione approssimativamente lineare tra la mortalità e il logaritmo delle concentrazioni dell'inquinante.

I test di tossicità sono stati effettuati esponendo 10 gruppi di animali (15 individui per ciascun gruppo) alle seguenti concentrazioni di CdCl₂*2H₂O (Sigma) (Tab. 4.2) :

Sostanza	Concentrazione
CdCl ₂ *2H ₂ O	20µM
CdCl ₂ *2H ₂ O	40 µM,
CdCl ₂ *2H ₂ O	60 µM,
CdCl ₂ *2H ₂ O	80 µM
CdCl ₂ *2H ₂ O	110 µM
CdCl ₂ *2H ₂ O	120 µM,
CdCl ₂ *2H ₂ O	130 µM,
CdCl ₂ *2H ₂ O	150 µM
CdCl ₂ *2H ₂ O	200 µM,
CdCl ₂ *2H ₂ O	300 µM.

Tab.4.2. Concentrazioni di cadmio testate.

Abbiamo inoltre considerato un gruppo di animali di controllo.

Al fine di valutare gli effetti del cadmio sull'apparato branchiale di *Thalassoma pavo*, alcuni esemplari sono stati esposti alle concentrazioni subletali di cadmio indicate in tabella (Tab.4.3)

Concentrazione di Cd	Tempi di esposizione
10 μ M	48, 96, 192h
20 μ M	48, 96, 192h
40 μ M	48, 96, 192h
60 μ M	48, 96, 192h
120 μ M	48, 96, 192h

Tab.4.3 Concentrazioni subletali di cadmio e relativi tempi di esposizione

Il prelievo delle branchie è stato effettuato dopo 48, 96, 192h di trattamento e parallelamente sono state prelevate le branchie degli animali di controllo per l'indispensabile confronto tra condizioni basali e condizioni sperimentali. Gli animali sono stati anestetizzati con 2-4 g/l di MS 222 (Sandoz, Sigma, St. Louis, Mo) e sacrificati per decapitazione. I campioni di tessuto sono stati successivamente processati per l'osservazione al M.O. ed al microscopio elettronico a scansione e a trasmissione.

4.3 Allestimento dei preparati per l'osservazione al microscopio ottico ed ai microscopi elettronici a scansione ed a trasmissione

4.3.1 Prelievo

Il prelievo delle branchie è stato eseguito prestando la massima attenzione per evitare traumi meccanici ai tessuti. L'operazione è stata effettuata mediante bisturi e forbici sterili. Per allontanare dalla superficie del campione eventuali tracce di materiale extracellulare, questi sono stati

puliti con una soluzione tampone utilizzata anche durante la successiva fase di fissazione. I campioni destinati all'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione sono stati ridotti alle dimensioni di circa 1 mm³, per garantire una migliore penetrazione del fissativo, degli agenti disidratanti e della resina. Ogni singolo arco branchiale è stato quindi ridotto in porzioni più piccole e immerso nel fissativo.

4.3.2 Fissazione

La fissazione è la prima tappa di modificazione artificiale dell'ambiente cellulare ed è finalizzata alla immobilizzazione istantanea di tutte le componenti molecolari e macromolecolari della cellula. I campioni sono stati sottoposti a fissazione chimica per immersione. Abbiamo effettuato una fissazione primaria aldeidi (in liquido di Karnovsky veicolato da tampone cacodilato) e una post-fissazione in tetrossido di osmio all'1% in tampone cacodilato. Tra la fissazione aldeidica e quella in osmio si è proceduto con un lavaggio in tampone per allontanare dal campione il fissativo primario in eccesso (Tab.4.4)

Schema di fissazione

Fissazione primaria	2 ore in fissativo di Karnovsky
Lavaggio	5 minuti in tampone cacodilato
Post-fissazione	2 ore in tetrossido di osmio
Lavaggio	5 minuti in tampone cacodilato

Tab.4.4 Schema di fissazione

4.3.3 Disidratazione

Lo scopo della disidratazione è quello di allontanare dal campione i liquidi presenti. L'agente disidratante da noi utilizzato è l'acetone. Per evitare fenomeni di estrazione cellulare l'allontanamento dei liquidi dal

tessuto è stato effettuato in modo graduale, immergendo i campioni in acetone a concentrazione crescente per pochi minuti (Tab. 4.5).

Schema di disidratazione

Acetone al 30%	5 minuti a 4°C
Acetone al 50%	5 minuti a 4°C
Acetone al 70%	5 minuti a 4°C
Acetone al 90%	5 minuti a 4°C
Acetone assoluto	3 passaggi da 10 minuti a 4°C

Tab.4.5 Schema di disidratazione

Le fasi di prelievo fissazione e disidratazione sono comuni sia al protocollo per il TEM che per il SEM. Le fasi successive sono invece specifiche per ciascuna delle due tecniche.

4.3.4 Essiccamento (solo per SEM)

L'essiccamento consiste nell'allontanamento dei fluidi residui presenti nel campione (acqua o solventi utilizzati durante la disidratazione), per preparare il campione alle fasi di ricopertura e di osservazione. Abbiamo utilizzato una metodica fisica realizzata mediante il CPD (critical point dryer).

4.3.5 Montaggio (solo per SEM)

I campioni essiccati vengono poi montati su appositi supporti detti stub, in modo da assicurare 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.

4.3.6 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 e favorire 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 effettuata mediante l'utilizzo del microscopio elettronico a scansione Stereoscan Zeiss DSM 940.

4.3.7 Contrastazione (solo per TEM)

Per aumentare il fenomeno di scattering a cui si deve la formazione dell'immagine al TEM, è necessario aggiungere al campione atomi ad alto peso atomico. Questa operazione è definita contrastazione e può essere effettuata in due momenti diversi: durante la disidratazione o dopo il sezionamento. Gli agenti contrastanti utilizzati sono l'acetato di uranile ed il citrato di piombo. Il primo viene utilizzato durante la disidratazione in soluzione satura con acetone al 70%; il secondo viene utilizzato direttamente sulle sezioni.

4.3.8 Inclusione (solo per TEM)

Dopo la disidratazione si procede alla progressiva sostituzione del solvente con la resina utilizzata come mezzo di inclusione. Il nostro protocollo prevede l'utilizzo di una resina epossidica, l'epon araldite. Dopo più di dodici ore di permanenza dei campioni nella resina pura, essi vengono posti nelle formine per l'inclusione, ricoperti con la resina ed orientati. Per ottenere la completa policondensazione della resina si

pongono i campioni in stufa per 3 giorni a 60°. Il protocollo da noi seguito è riportato nello schema sottostante (Tab.4.6)

Schema di inclusione

50% acetone assoluto-50% resina	4-8 ore a 4°C
Resina pura	12 ore o più a temperatura ambiente
Policondensazione	Tre giorni in stufa a 60°C

Tab.4.6 Schema di inclusione

I blocchetti così ottenuti verranno sottoposti a taglio.

4.3.9 Sezionamento

Il taglio viene effettuato mediante l'ultramicrotomo. La resina in eccesso viene eliminata dal campione per mezzo di una lametta (trimming). Successivamente il campione viene posto sul braccio dell'ultramicrotomo. Vengono effettuati 2 tipi di sezione: le sezioni semifini (spessore 1-2 μ) destinate alla microscopia ottica e le sezioni ultrasottili (spessore 60-90 nm) destinate alla microscopia elettronica a trasmissione. Le sezioni semifini necessarie per l'orientamento, sono state colorate utilizzando la metodica secondo Humphrey-Pittman che consente una buona distinzione del nucleo e facilita il riconoscimento delle diverse tipologie cellulari. Le sezioni ultrasottili vengono invece raccolte su un retino di rame contrastate e metallizzate.

4.3.10 Metallizzazione

La metallizzazione consiste nella deposizione di un sottile film di carbone. E' un'operazione che ha il fine di proteggere le sezioni dall'aumento di temperatura generato dal fascio di elettroni. Dopo la metallizzazione le sezioni sono state osservate al microscopio elettronico a trasmissione Zeiss EM 900.

4.4 Allestimento dei preparati per l'analisi istologica ed immunoistochimica.

L'analisi morfologica ed ultrastrutturale è stata integrata con uno studio funzionale volto a testare le alterazioni indotte dal cadmio sul pattern di immunomarcatura di alcuni anticorpi.

I campioni prelevati secondo le metodiche già descritte sono stati processati secondo un protocollo adatto a preservare al massimo l'integrità dei siti antigenici.

4.4.1 Fissazione

Il fissativo utilizzato è la paraformaldeide al 4% veicolata da tampone fosfato. I campioni permangono nel fissativo per 3 ore.

4.4.2 Disidratazione

Dopo 3 lavaggi in tampone fosfato, si procede all'allontanamento dei liquidi in eccesso mediante alcool a concentrazione crescente (Tab.4.7)

Schema di disidratazione

Elanolo 50%	30 min.
Elanolo 50%	30 min.
Elanolo 70%	di soggiorno
Elanolo 80%	45 min.
Elanolo 95%	30 min.
Elanolo 100%	15 min.
Elanolo 100%	10 min.

Tab.4.7 Schema di disidratazione

4.4.3 Inclusione

Alla disidratazione segue una fase di preparazione all'inclusione in cui l'agente disidratante (etanolo) viene gradualmente sostituito dallo xilolo, solvente del mezzo di inclusione da noi usato (paraffina).

Schema di inclusione

Etanolo 100% + Xilolo (1:1)	30 min.
Xilolo puro	20 min.
Paraffina + xilolo (1:1)	45 min. in stufa a 60°C
Paraffina	45 min. in stufa a 60°C
Paraffina	1 ora in stufa a 60°C
Inclusione in paraffina	preparazione del blocchetto

Tab.4.8 Schema di inclusione

4.4.4 Taglio o sezionamento

I campioni inclusi in blocchetti di paraffina vengono tagliati mediante il microtomo. Prima del sezionamento, il blocchetto deve essere sottoposto all'operazione di sgrossatura. Essa consiste nel fissare il blocchetto su un supporto e nel rimuovere tramite una lametta parte della paraffina che ricopre il campione. Il blocchetto fissato al supporto, dopo la sgrossatura viene montato sul braccio di un microtomo (Leica RM2125RT) orientato in modo che la superficie di taglio risulti parallela alla lama.

Le sezioni dello spessore di 8-10 μm 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 circa 20°C per permettere la distensione delle sezioni e l'adesione delle stesse al vetrino.

4.4.5 Sparaffinatura

Prima di essere osservati i vetrini devono essere sottoposti al processo di “sparaffinatura” ossia all’eliminazione della paraffina dal campione, avvenuta secondo lo schema seguente:

Xilolo	5 min
Etanolo assoluto	2 min
Etanolo assoluto	2 min
Etanolo 95%	2 min
Acqua distillata	2 min

Tab.4.9 Schema sparaffinatura

4.5 Colorazione Alcian blu/P.A.S.

La reazione alcian blu pH 2,5 P.A.S è un metodo combinato per la differenziazione di mucine acide, mucine neutre e carboidrati su sezioni di tessuto. Trattando le sezioni con blu Alcian si colorano le mucine acide che, formando con il colorante il complesso “Monastal blu”insolubile, non reagiranno più con la seguente reazione P.A.S. che colorerà solo le mucine neutre ed il glicogeno. Dopo aver portato le sezioni all’acqua distillata si segue il seguente protocollo (Tab 4.10)

10 gocce di Alcian blu pH 4.5 sec. Mowry	30 min
15 gocce di soluzione di sodio tetraborato	10 min
Acqua corrente	5 min
10 gocce di Acido periodico in soluzione	10 min
Reattivo di Schiff sec.Hotchkiss	20 min
Lavare in acqua distillata	
10 gocce di soluzione di potassio metabisolfito	2 min
10 gocce di soluzione di fissaggio	3 min
Lavare in acqua distillata	
10 gocce di Emallume sec.Mayer	2 min
Far virare in acqua corrente	5 min
Disidratare nella serie crescente di etanolo	
Diafanizzare in xilolo	

Tab.4.10 Colorazione AB/P.A.S

Le sostanze P.A.S. positive appariranno rosso magenta, i mucopolissaccaridi acidi blu-turchese.

4.6 Tecniche di immunomarcatura

Per gli studi sulla funzionalità branchiale le sezioni ottenute sono state sparaffinate e processate applicando tecniche di immunoistochimica e immunofluorescenza. Gli anticorpi primari da noi utilizzati sono riportati in tabella

ANTICORPI TESTATI			
Anticorpo	Diluizione	Specie	Fornitori
Serotonina (5-HT)	1:50	Mouse	Bio-Optica
Ossido nitrico Sintasi neuronale (nNOS)	1:100	Rabbit	Biomol
Peptide Vaso Intestinale (VIP)	1:100	Rabbit	Biomeda
Na ⁺ /K ⁺ ATPasi	1:100	Mouse	Developmental Studies Hybridoma Bank
Aquaporina (AQ3)	1:200	Rabbit	Sigma
Ossido nitrico Sintasi inducibile (iNOS)	1:100	Rabbit	Biomol
Metallotioneine (MT)	1:100	Rabbit	Sigma
Caspasi 3	1:100	Rabbit	Sigma

Tab. 4.11 Anticorpi testati**4.6.1 Serotonina**

La serotonina (5-idrossitriptamina o 5HT) è un'ammina biogena che gioca un ruolo molto importante nella regolazione della motilità delle branchie e nella circolazione branchiale.

La somministrazione di serotonina esogena, determina la vasocostrizione nelle branchie (Sundin & Nilsson, 1992). Dunel-Erb e

collaboratori (1989) hanno evidenziato l'aumento del rilascio di serotonina nelle cellule neuroepiteliali della trota in condizioni di ipossia. Questo fenomeno potrebbe avere un vantaggio adattativo se si fa riferimento ad un'altra funzione della serotonina. Essa infatti determina iperventilazione branchiale e aumento del rilascio delle catecolammine circolanti. Elevati livelli di catecolammine nel sangue determinano vasodilatazione ed aumento immediato della pressione nell'arteria dorsale nella trota arcobaleno (Fritsche *et al.*, 1992).

4.6.2 Ossido nitrico

L'ossido di azoto (NO), impropriamente chiamato ossido nitrico, è una specie chimica reattiva di natura radicalica centrata sull'azoto (Brennan & Moncada 2002).

L'NO è un composto ubiquitario prodotto a partire dall'amminoacido L-arginina in una reazione multi-step catalizzata dall'enzima ossido nitrico sintasi (NOS) NADPH-dipendente. La NOS esiste in numerose isoforme, alcune costitutive (eNOS, nNOS) ed altre inducibili (iNOS.) (Förstermann *et al.*, 1998).

Nei sistemi biologici, l'NO agisce come un importante messaggero intra- ed inter-cellulare regolando numerosissime funzioni, tra cui quella dell'endotelio vascolare. Infatti, in seguito ad adeguata stimolazione (meccanica o chimica), le cellule endoteliali producono l'NO che in parte, diffonde nel compartimento ematico, riducendo l'aggregabilità delle piastrine e l'adesività dei leucociti alle pareti dei vasi sanguigni e in parte raggiunge la sottostante muscolatura liscia vascolare inducendone il rilasciamento (Brennan & Moncada 2002). Schoor & Plumb nel 1994 hanno scoperto che l'ossido nitrico nei pesci svolge un ruolo importante nell'osmoregolazione.

Di conseguenza esso viene sintetizzato in organi coinvolti in questo processo quali branchie e reni. L'ossido nitrico interviene anche nella

regolazione del tono vascolare (Gibbins *et al.*, 1995). Da studi condotti da Ebbesson e collaboratori (2005) è emerso che l'isoforma nNOS ed eNOS sono espresse nelle chloride cells, lungo il filamento primario e negli spazi interlamellari; la iNOS, invece, è stata ritrovata in piccole cellule site in fondo al filamento principale. L'ossido nitrico nei pesci agisce da vasodilatatore (Fritsche *et al.*, 2000; Haraldsen *et al.*, 2002).

4.6.3 Peptide vasoattivo intestinale (VIP)

Il peptide vasoattivo intestinale (VIP) è un neuropeptide che ha numerose funzioni fisiologiche ed è largamente distribuito in tutto il corpo (Chow, 1997); è caratterizzato da 28 amminoacidi ed è sintetizzato dal sistema gastro-intestinale (Said et Mutt 1970).

Nell'uomo il VIP attiva le secrezioni intestinali, del pancreas e degli enzimi digestivi (Said, 1982) e probabilmente responsabile del controllo nervoso non-colinergico e non-adrenergico delle funzioni gastro-intestinali (Chow, 1997). A livello del sistema nervoso il VIP regola il flusso di sangue cerebrale e la secrezione di prolattina dalla ghiandola pituitaria (Rostene, 1984). Inoltre influenza la vasodilatazione polmonare e dei vasi sanguigni periferici, il rilassamento della muscolatura liscia delle pareti bronchiale e uterina, ed influenza anche lo sviluppo embrionale (Said, 1982; Gressens *et al.*, 1993).

Nei pesci è stata dimostrata la presenza di VIP nel cervello, ipofisi, vescica biliare, fegato, branchie, nell'intestino superiore ed inferiore, cuore, muscolo e milza (Chow, 1997). La presenza del recettore VIP nell'intestino di "goldfish" ha dimostrato il suo ruolo nel sistema gastrointestinale, ovvero influenza la motilità, secrezione e inibizione degli acidi gastrici (Jensen & Holmgren, 1985). Inoltre il VIP regola altre funzioni fisiologiche nei pesci : ha un ruolo nella regolazione osmotica branchiale (Mainoya & Bern 1984), nel rilassamento della vescica biliare (Aldam & Holmgren

1992), regolazione dell'attività del sistema digestivo (Lundin & Holmegren 1984; Holstein 1983).

4.6.4 Le metallothioneine

Le metallothioneine (MT) sono delle proteine a basso peso molecolare ricche in cisterna caratterizzate da un'elevata capacità di legare metalli. Le MTs funzionano come una sorta di "tampone cellulare" dei metalli, e la loro abbondanza nella cellula dipende dal contenuto di metalli nell'organismo e nella cellula stessa: se la concentrazione intracellulare di metallo è alta, viene indotta la sintesi di nuove molecole di metallothioneine; se il contenuto di metallo diminuisce, la sintesi di metallothioneine viene rallentata. Gli organismi viventi possono sfruttare questo meccanismo di sintesi regolata per diminuire gli effetti dannosi dei metalli tossici come cadmio e mercurio (Dang *et al.*, 1999)

Nei pesci, l'espressione e il ruolo delle MT sono stati studiati negli organi in cui si evidenzia maggiormente accumulo di metalli, ovvero branchie, fegato e reni (De Boeck *et al.*, 2003).

4.6.5 Caspasi3

Le caspasi sono proteasi coinvolte nei processi di morte programmata della cellula e in quelli infiammatori (Eckhart *et al.*, 2005). L'apoptosi o morte cellulare programmata avviene in risposta a specifici segnali. Essa è coinvolta in vari processi biologici quali lo sviluppo, la risposta immunitaria, l'omeostasi dei tessuti (Wyllie *et al.*, 1980). L'apoptosi è considerata anche una innata risposta alle infezioni virali (Miller & White, 1998; Everett & MaFadden, 1999).

L'apoptosi si espleta attraverso diversi meccanismi di cui i più importanti sono quello mediato dai recettori e quello mitocondriale. L'apoptosi viene modulata da una categoria di molecole: le caspasi

(cysteinyll aspartate-specific proteases) (Sangsuriya *et al.*, 2007). La caspasi 3 è coinvolta sia nella modalità mitocondriale sia in quella dei recettori.

4.6.6 Aquaporina 3

Le acquaporine sono una famiglia di proteine di membrana con funzione di canali selettivi per l'acqua ed hanno un ruolo importante nel trasporto di fluidi in vari organi del corpo (Agre *et al.*, 2002; King *et al.*, 2004). Le acquaporine sono proteine altamente conservate. Tra le varie isoforme di acquaporina le AQP 0,1, 2, 4 e 5 sono considerate selettive per l'acqua (Agre *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 1994; Raina *et al.*, 1995; Yang & Verkman, 1997) mentre le acquaporine 3, 7, 9, e 10 sono anche permeabili al glicerolo ed altri piccoli soluti e spesso vengono chiamate acquagliceroloproteine. (Ishibashi *et al.*, 1994, 1997, 1998, 2002; Echevarria *et al.*, 1996). L' AQP6 nel fegato sembra essere invece un canale anionico (Yasui *et al.*, 1999a,b). L'isoforma più diffusa è l'AQP3. Nell'epitelio branchiale dei pesci è localizzata a livello delle CCs e sembra sia coinvolta nella regolazione del volume e nella osmoregolazione (Watanabe *et al.*, 2005).

4.6.7 Na^+/K^+ -ATPasi

La Na^+/K^+ -ATPase conosciuta anche come pompa Na^+/K^+ , è un enzima localizzato nella membrana plasmatica. Esso provvede a mantenere il potenziale e a regolare il volume cellulare. Per mantenere il potenziale cellulare le cellule devono mantenere una bassa concentrazione di ioni sodio ed un alto livello di ioni potassio a livello intracellulare. A livello extracellulare, ci sono alte concentrazioni di sodio e basse concentrazioni di potassio, la diffusione di questi ioni avviene quindi attraverso canali ionici presenti all'interno della membrana plasmatici. Per mantenere le appropriate concentrazioni la pompa sodio/potassio pompa sodio fuori e potassio dentro con un trasporto attivo.

Il meccanismo con cui opera questo enzima è il seguente:

- La pompa ATP dipendente, lega 3 ioni sodio a livello intracellulare.
- L'ATP è idrolizzata, e la fosforilazione della pompa porta alla formazione di residui di aspartato seguiti da rilascio di ADP. Un cambio conformazionale nella pompa espelle ioni sodio all'esterno. La forma fosforilata della pompa ha una bassa affinità per gli ioni sodio, che così vengono rilasciati.
- La pompa lega 2 ioni potassio extracellulare, questo comporta la defosforilazione della pompa.
- La pompa rilascia ioni potassio dentro la cellula, così essa è pronta per iniziare.

La membrana plasmatica è meno permeabile al sodio che agli ioni potassio, si viene così a creare un potenziale elettrico a livello intracellulare. Il gradiente elettrico e di concentrazione stabilito dalla sodio/potassio ATPasi supporta non solo il potenziale delle cellule a riposo, ma il potenziale d'azione dei nervi e dei muscoli.

L'uscita di sodio dalle cellule provvede a veicolare i diversi trasporti facilitati, che importano glucosio, aminoacidi e altri nutrienti dentro la cellula. La traslocazione di sodio da un lato dell'epitelio all'altro crea un gradiente osmotico che guida l'assorbimento dell'acqua. Un altro importante compito della pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasi}$ è di provvedere al gradiente sodio che è usato nei processi carrier. Nell'intestino, per es., il sodio è espulso fuori dalla cellula dalla pompa sodio potassio a livello del sangue, dove il simporto sodio-glucosio usa il gradiente sodio creato come fonte di energia per importare sia sodio che glucosio, che è più efficiente di una diffusione semplice. Processi simili sono localizzati nel sistema tubulare renale (Eckert, R. & Randall, 1991)

Nelle branchie dei pesci la pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasi}$ è localizzata nelle cellule a cloruro (Perry, 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Brunelli *et al.*, in

press). Queste cellule localizzate a livello dell'epitelio primario giocano un ruolo importante nell'equilibrio ionico ed osmotico (Evans, 1987).

4.6.8 Metodo indiretto di immunofluorescenza

Per le indagini funzionali abbiamo applicato la metodica dell'immunomarcatura indiretta secondo Coons (1955) (Fig.4.1).

Questa metodica prevede l'utilizzo di un anticorpo primario che si lega all'antigene in esame, ed un anticorpo secondario coniugato con il fluorocromo, FITC o TRITC, che si lega a quello primario. Questa metodica è stata applicata per l'immunolocalizzazione della Na^+/K^+ -ATPasi (FITC), della Acquaporina 3 (TRITC) e della Caspasi 3 (FITC).

Le osservazioni sono state effettuate al Microscopio motorizzato Zeiss Axio Imager Z1. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata per mezzo della videocamera AxioCam.

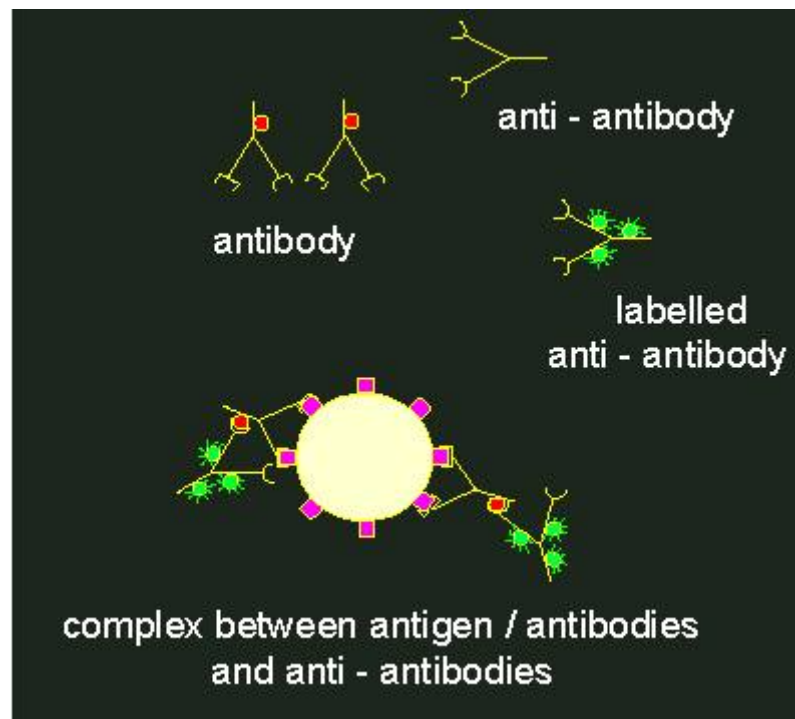


Fig.4.1 Rappresentazione schematica della tecnica di immunomarcatura indiretta

4.6.2 Metodo indiretto di immunoperossidasi

Il metodo indiretto di immunoperossidasi prevede l'utilizzo di un anticorpo primario che riconosce l'antigene in esame ed un anticorpo secondario, che riconosce come antigene quello primario. La visualizzazione del legame antigene-anticorpo è stata effettuata per mezzo dell'enzima perossidasi. La perossidasi reagendo con il suo substrato specifico

4.7 Analisi statistica dei dati

I risultati istochimici ed immunoistochimici, di un campione random di 30 sezioni per ciascuna concentrazione considerata, sono stati elaborati mediante software Axio Vision Release 4.5; tale programma ha permesso di eseguire una conta delle cellule positive ed i risultati ottenuti sono stati elaborati statisticamente con sistema ANOVA tramite il software Graph pad Instat.

CAPITOLO 5

Risultati

5.1 Determinazione dell'LC50

Il metodo di Finney (1971) ci ha permesso di calcolare l'LC50 del cadmio per *Thalassoma pavo*. Mediante il software EPA Probit analysis program nella versione 1.00 è stato possibile mettere in relazione le diverse concentrazioni di cadmio usate ed i dati relativi alla mortalità degli individui per ciascuna concentrazione.

La tabella 5.1 riassume i risultati degli esperimenti. Si è osservato un aumento della mortalità in relazione all'incremento della concentrazione di cadmio.

In tabella 5.2 sono riportati i valori di LC ricavati con il Probit e i corrispondenti estremi dell'intervallo di confidenza. Come è evidente il valore di LC50 è pari a 128.394 μM ossia 28,16 mg/l..

Concentrazione μM	Numero di pesci esposti	Numero di pesci morti	Mortalità osservata	Mortalità attesa	Mortalità stimata
20.0000	15	0	0.0000	0.0000	0.0000
40.0000	15	0	0.0000	0.0000	0.0004
60.0000	15	0	0.0000	0.0000	0.0140
80.0000	15	2	0.1333	0.1333	0.0859
110.0000	15	3	0.2000	0.2000	0.3275
120.0000	15	7	0.4667	0.4667	0.4226
130.0000	15	9	0.6000	0.6000	0.5143
150.0000	15	10	0.6667	0.6667	0.6734
200.0000	15	13	0.8667	0.8667	0.8998
300.0000	15	15	1.0000	1.0000	0.9929

Tab.5.1 Relazione tra concentrazione di cadmio e percentuale di mortalità in *Thalassoma pavo*

Valore di LC	Concentrazione (mg/l)	Limite di confidenza del 95%	
		Inferiore	Superiore
LC 1.00	57.389	37.704	71.245
LC 5.00	72.655	53.500	85.544
LC 10.00	82.391	64.312	94.542
LC 15.00	89.690	72.684	101.333
LC 50.00	128.394	116.054	142.720
LC 85.00	183.802	161.641	230.437
LC 90.00	200.084	173.118	260.633
LC 95.00	226.896	191.195	313.525
LC 99.00	287.252	229.427	445.150

Tab.5.2 Valori di LC del cadmio per *Thalassoma pavo* calcolati con il metodo Probit

5.2 Apparto branchiale degli esemplari di controllo

Dagli studi effettuati in precedenza risulta che l'organizzazione strutturale dell'apparato branchiale di *Thalassoma pavo* è quella tipica dei Teleostei. Ciascuna branchia è costituita da 4 archi branchiali coperti da un opercolo. Da ciascun arco branchiale si dipartono i filamenti principali e perpendicolarmente ad esse si inseriscono le lamelle secondarie, che rappresentano l'area deputata agli scambi gassosi.

Dagli stessi studi è emerso che l'epitelio primario, che ricopre il filamento principale, è costituito dalle seguenti tipologie cellulari: cellule pavimentose (PVC), cellule mucose o goblet cells (GC), chloride cells (CC) associate a cellule accessorie, ed infine cellule basali.

Tipologie cellulari	Filamento principale	Lamelle secondarie
Cellule pavimentose (PVCs)	X	X
Chloride Cells (CCs)	X	
Goblet Cells (GCs)	X	
Cellule basali	X	X

L'epitelio lamellare ha un'organizzazione molto semplice: uno strato esterno di cellule pavimentose che poggia sullo strato più interno di cellule basali.

Le goblet cells sono messe in evidenza per mezzo della reazione AB/P.A.S. Come è evidente in figura (5.2a) negli individui di controllo sono presenti solo cellule AB-positive, quindi cellule acidofile.

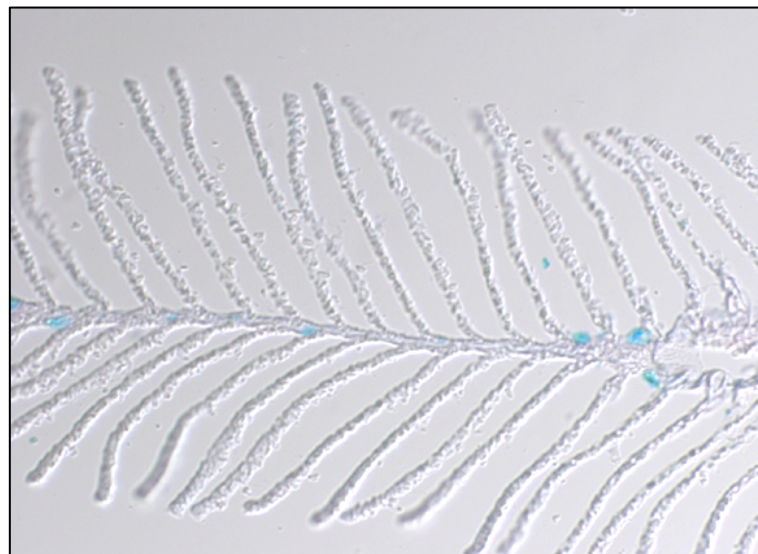


Fig. 5.2 a Reazione AB/PAS nelle branchie degli individui di controllo. Sono evidenti solo cellule acidofile.10x

Dal punto di vista funzionale possiamo osservare cellule positive alla serotonina all' apice del filamento. Il peptide intestinale vasoattivo (VIP), e l'isoforma neuronale della NOS, sono localizzati lungo tutto il filamento principale (5.2b-c).



Fig. 5.2b Immunolocalizzazione del VIP nelle branchie degli individui di controllo. Sono evidenti cellule immunoreattive all'apice del filamento.25x

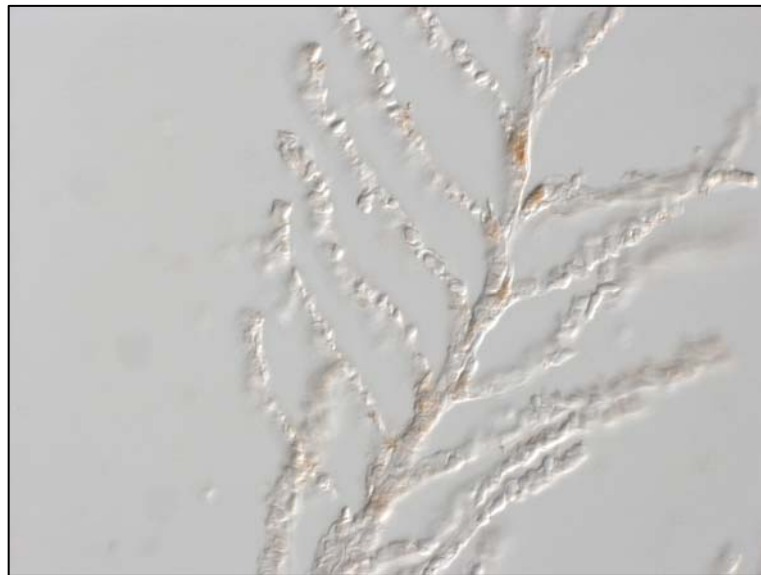


Fig. 5.2c Immunolocalizzazione della n-NOS nelle branchie degli individui di controllo. Sono evidenti cellule immunoreattive lungo il filamento.10x

Il pattern di immunomarcatura di Na^+/K^+ -ATPasi e dell'AQP3 rivela che le chloride cells sono abbondanti e localizzate nella porzione mediana del filamento principale (Fig. 5.2d).

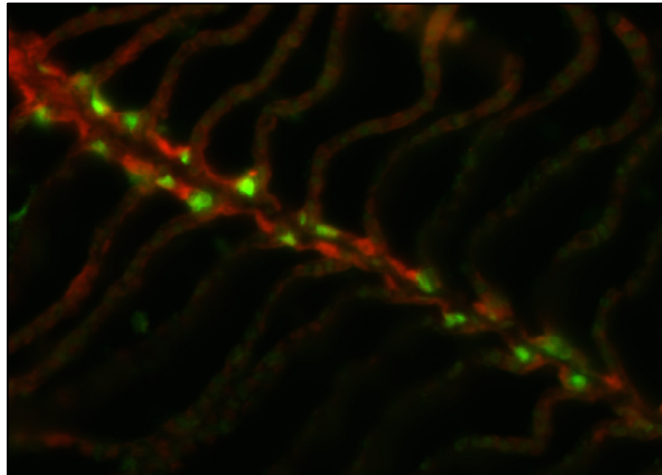


Fig. 5.2d Immunolocalizzazione Na^+/K^+ -ATPasi (verde) e dell'AQP3 (rosso) nelle branchie degli individui di controllo. Sono evidenti cellule immunoreattive lungo il filamento.10x

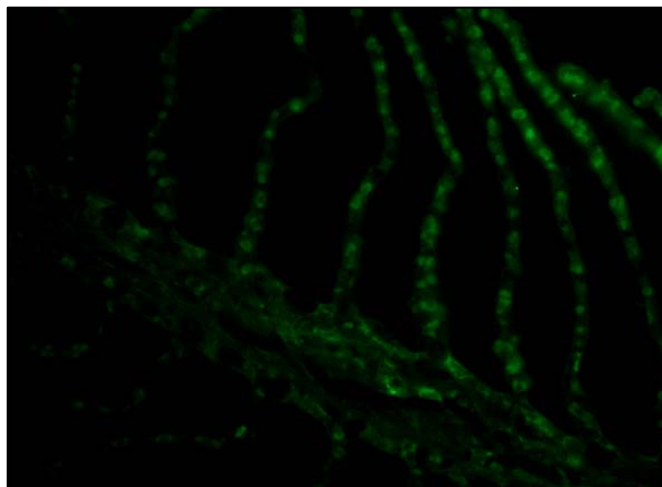


Fig. 5.2e Immunolocalizzazione della caspasi 3 nelle branchie degli individui di controllo.25x

L'anticorpo rivolto contro la caspasi 3 ha evidenziato la presenza di poche cellule positive sia a livello del filamento principale che delle lamelle (5.2e)

Non sono state, invece, riscontrate cellule positive alle methallotioneine ed alla isoforma inducibile della NOS.

5.3 Apparto branchiale degli esemplari esposti per 48h a cadmio

5.3.1 Morfologia ed ultrastruttura

Dopo 48 h di esposizione sono evidenti alterazioni a tutte le concentrazioni e l'intensità dei fenomeni degenerativi è strettamente correlata alla concentrazione di inquinante. A basse concentrazioni, come è evidente dalle immagini al SEM (Fig.5.3a-b,) osserviamo un inizio di degenerazione a carico delle cellule pavimentose. Esse mostrano in più punti la parziale alterazione delle microcreste superficiali.

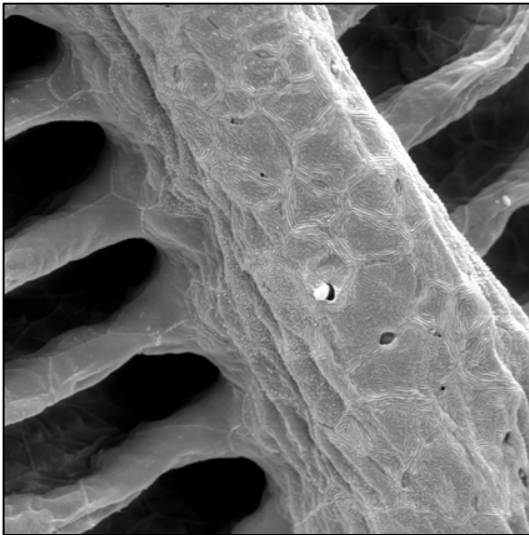
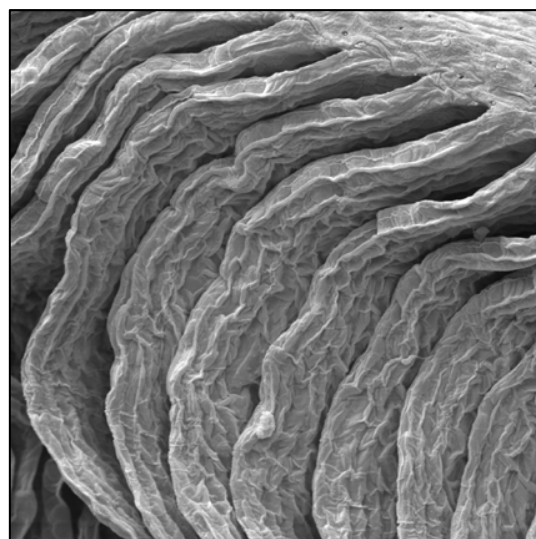


Fig. 5.3a Microfotografia al SEM delle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a $10\mu\text{M}$ di cadmio per 48h. Osserviamo la degenerazione delle microcreste delle PVCs.1000x

Fig. 5.3b Microfotografia al SEM delle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a $10\mu\text{M}$ di cadmio per 48h. Osserviamo la degenerazione delle microcreste delle PVCs lungo le lamelle .500x



Questi fenomeni possono essere osservati anche alle concentrazioni intermedie e interessano principalmente la regione prossimale delle lamelle e i margini delle stesse. Queste si ripiegano e cominciano a perdere il loro tipico assetto (Fig.5.3c-d).

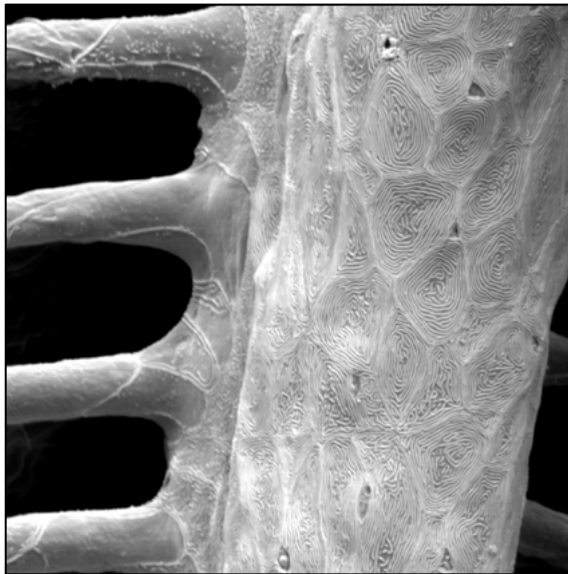


Fig. 5.3c Microfotografia al SEM delle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 40 μ M di cadmio per 48h. Osserviamo la degenerazione delle microcreste delle PVCs.1000x

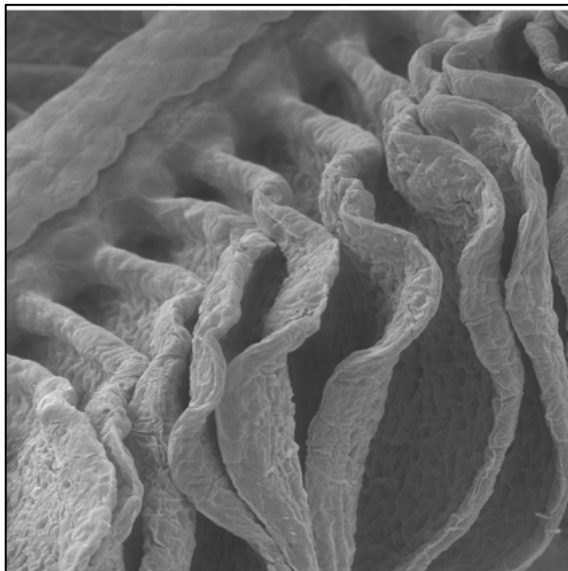


Fig. 5.3d Microfotografia al SEM delle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 60 μ M di cadmio per 48h. Le lamelle appaiono danneggiate e ripiegate nella porzione distale.500x

Alla concentrazione più alta ($120\mu\text{M}$) il filamento principale appare danneggiato. Si assiste alla retrazione dello strato superficiale di cellule pavimentose e questo porta all'ampliamento dello sbocco in superficie delle cellule degli strati sottostanti. Le lamelle secondarie appaiono assottigliate e ripiegate nella porzione distale (Fig. 5.3 e-f).

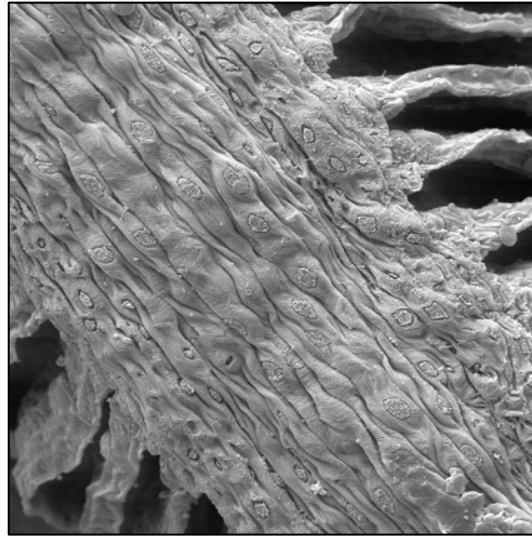


Fig. 5.3e Microfotografia al SEM delle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a $120\mu\text{M}$ di cadmio per 48h. Lungo il filamento principale osserviamo gli ampi sbocchi delle cellule degli strati sottostanti.500x

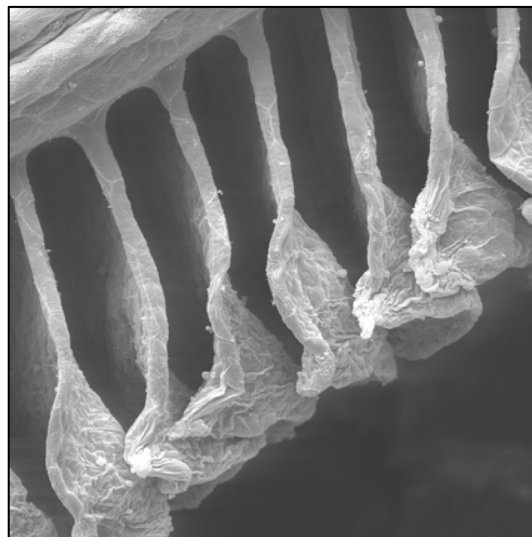


Fig. 5.3f Microfotografia al SEM delle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a $120\mu\text{M}$ di cadmio per 48h. Le lamelle perdono il loro assetto e si ripiegano distalmente.500x

Le osservazioni al microscopio ottico delle branchie dopo 48h di esposizione a cadmio mostrano il distacco dell'epitelio dalla lamina propria a tutte le concentrazioni. A partire dalla concentrazione di $40\mu\text{M}$ notiamo, inoltre, l'assottigliamento dell'epitelio sia a livello del filamento principale che delle lamelle secondarie (Fig.5.3g-h)



Fig. 5.3g Immagine al M.O. delle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a $20\mu\text{M}$ di cadmio per 48h. Osserviamo in più punti il distacco dell'epitelio dalla lamina basale. 25x



Fig. 5.3h Immagine al M.O. delle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a $60\mu\text{M}$ di cadmio per 48h. Osserviamo l'assottigliamento dell'epitelio. 40x

La reazione AB/P.A.S ha evidenziato un aumento dei mucopolisaccaridi acidi alle concentrazioni di 10, 20 e 40 μM ed a 60 e 120 μM sono evidenti cellule AB e P.A.S. positive (Fig. 5.3i-l).



Fig. 5.3i Reazione AB/PAS sulle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 10 μM di cadmio per 48h. Sono presenti solo cellule acidofile. 25x

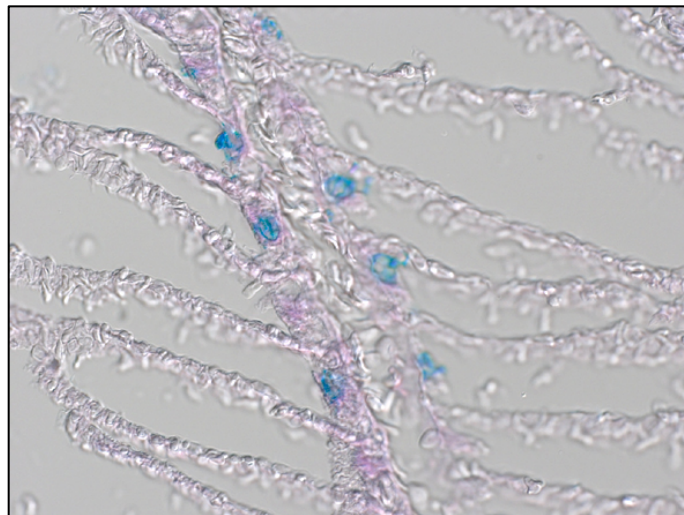


Fig. 5.3l Reazione AB/PAS sulle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 60 μM di cadmio per 48h. Sono presenti cellule AB/PAS positive. 40x

L'analisi ultrastrutturale conferma quanto già osservato al SEM. Le chloride cell e le goblet cells appaiono integre, ma lo strato di cellule pavimentose che normalmente le ricopre si presenta danneggiato in più punti

ampliandone la superficie di contatto con il mezzo esterno.(Fig.5.3m-n)A livello dell'epitelio secondario possiamo osservare cellule pavimentose ipertrofiche che presentano lunghi processi citoplasmatici e sono prive di microcreste.(Fig.5.3o)

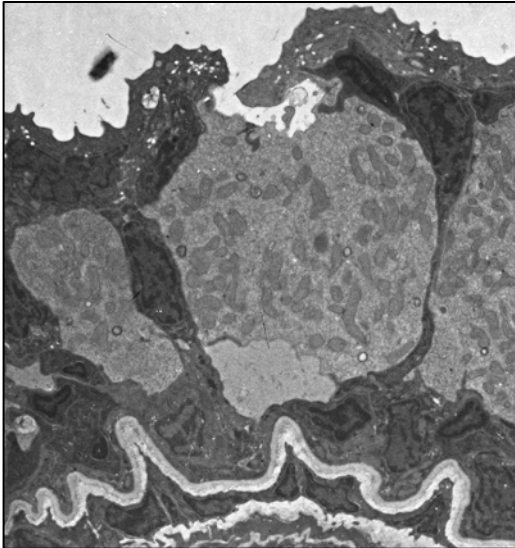


Fig. 5.3m Microfotografia al TEM di una CC dopo esposizione a 40µM di cadmio per 48h. E' evidente la retrazione dello strato superficiale.3000x

Fig. 5.3n Microfotografia al TEM di una GC dopo esposizione a 120µM di cadmio per 48h. E' evidente la retrazione dello strato superficiale.7000x

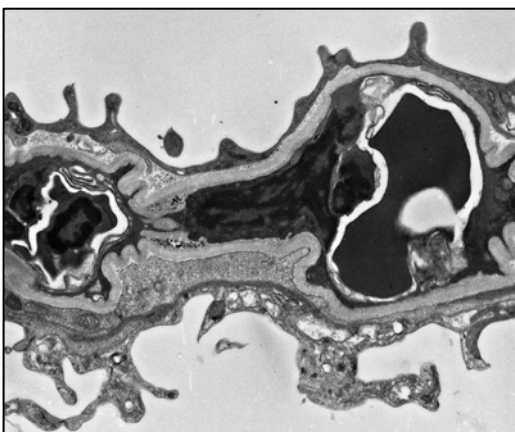
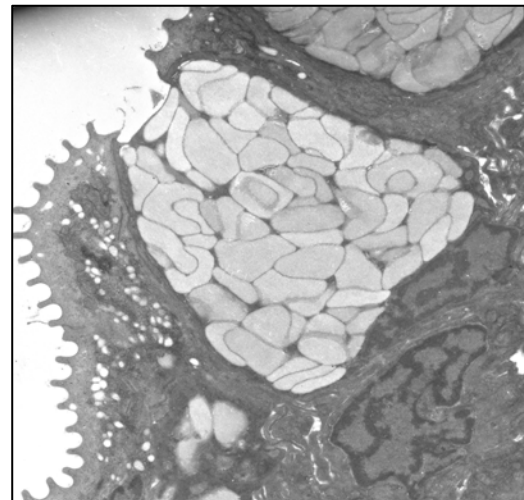


Fig. 5.3o Microfotografia al TEM di una lamella secondaria dopo esposizione a 120µM di cadmio per 48h. Si osserva la degenerazione delle PVCs. 7000x

5.3.2 Analisi funzionale e statistica

Dal punto di vista funzionale si osservano risposte già a basse concentrazioni. La serotonina dopo un'inibizione alla concentrazione più bassa, aumenta con un picco di espressione alla concentrazione di 20 μ M (Fig.5.3.2a-b).

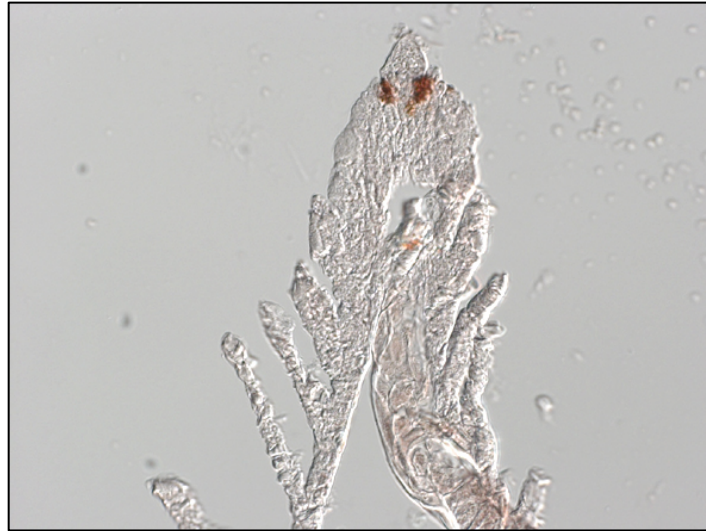


Fig. 5.3.2a Immunolocalizzazione della serotonina nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 20 μ M di cadmio per 48h. 25x

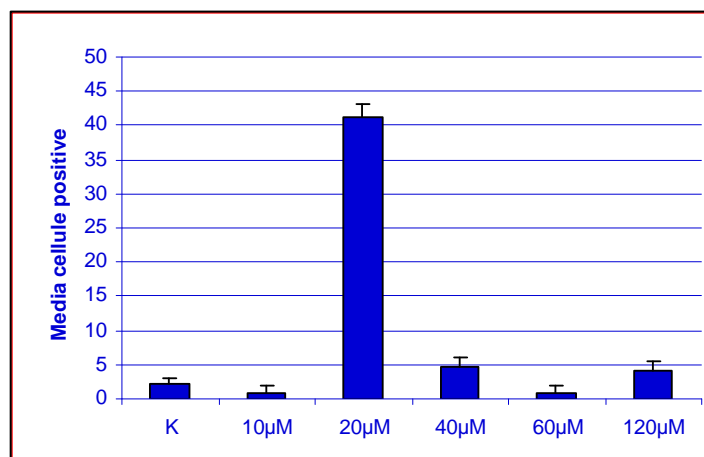


Fig. 5.3.2b Grafico che esprime l'andamento dell'immunoreattività alla serotonina dopo 48h di esposizione a Cadmio. Si osserva un picco di reattività a 20 μ M

E' presente una leggera immunopositività al VIP a tutte le concentrazioni, con un picco di espressione a 40 μ M.

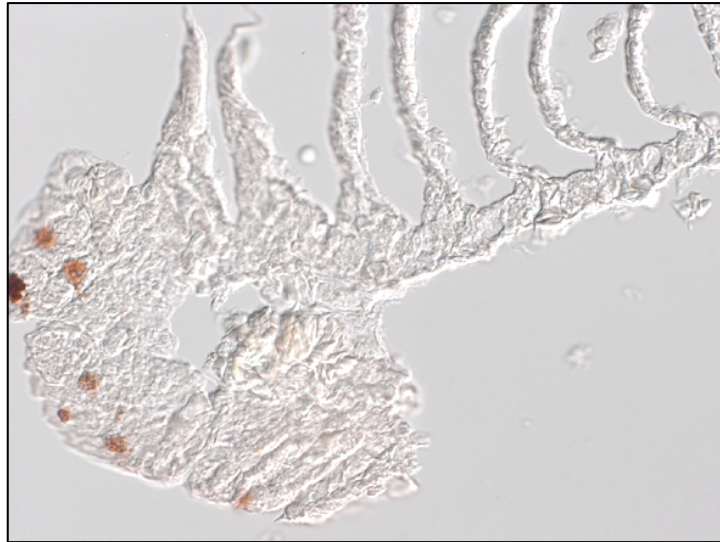


Fig. 5.3.2c Immunolocalizzazione del VIP nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 20 μ M di cadmio per 48h. 25x

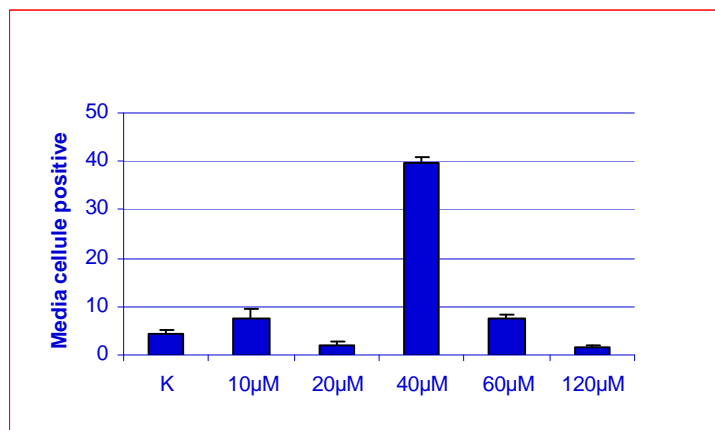


Fig. 5.3.2d Grafico che esprime l'andamento dell'immunoreattività al VIP dopo 48h di esposizione a Cadmio. Si osserva un picco di reattività a 40 μ M.

La i-NOS è espressa a tutte le concentrazioni testate, mentre la n-NOS dopo un incremento alle basse concentrazioni diminuisce fino a scomparire alla concentrazione massima



Fig. 5.3.2e Immunolocalizzazione del i-NOS nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 20 μ Mdi cadmio per 48h. 10x



Fig. 5.3.2f Immunolocalizzazione del i-NOS nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60 μ Mdi cadmio per 48h. 10x

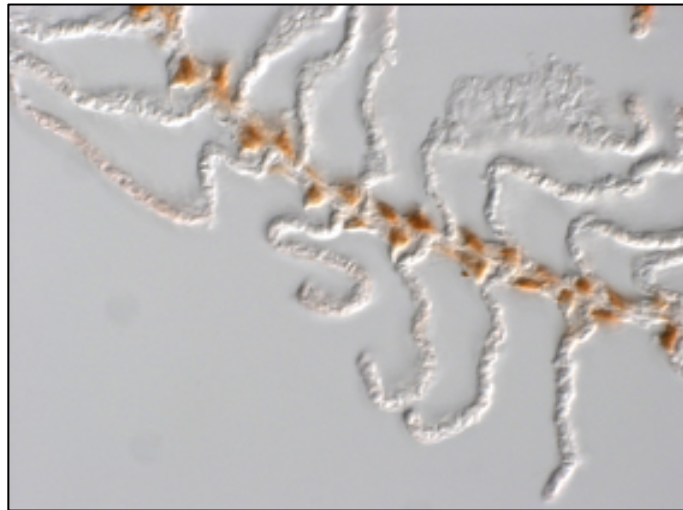


Fig. 5.3.2g Immunolocalizzazione del n-NOS nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 10 μ M di cadmio per 48h. Numerose cellule positive sono localizzate lungo il filamento principale. 10x



Fig. 5.3.2h Immunolocalizzazione del n-NOS nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 120 μ M di cadmio per 48h. Non sono presenti cellule immunoreattive 10x

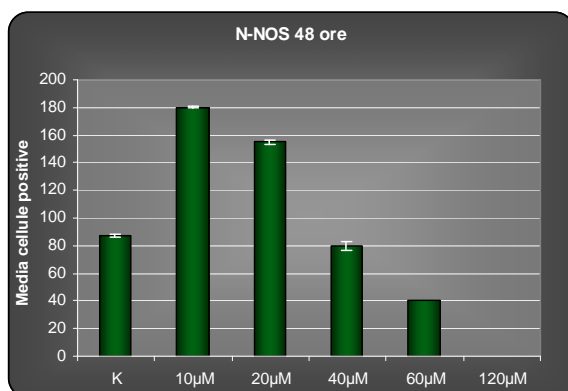


Fig. 5.3.2i Grafico che esprime l'andamento dell'immunoreattività alla n-NOS dopo 48h di esposizione a cadmio. Alla concentrazione massima l'enzima risulta inibito.

Non sono state osservate cellule positive alle metallotioneine (Fig.5.3.2l). La pompa sodio-potassio non subisce variazioni nell'espressione, (Fig.5.3.2m) mentre a partire dalla concentrazione di 40 μ M subisce un'inibizione l'acquaporina 3(5.3.2n). Per quanto riguarda l'attività apoptotica, il numero di cellule positive alla caspasi 3 aumenta in modo significativo all'aumentare della concentrazione di inquinante (Fig.5.3.2o-p)



Fig. 5.3.2l Immunolocalizzazione delle MT nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 20 μ M di cadmio per 48h. Non sono presenti cellule immunoreattive 10x

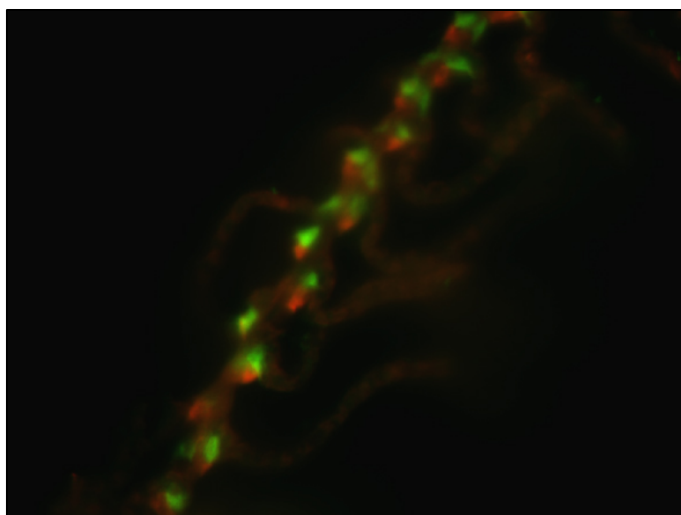


Fig.5.3.2m Immunolocalizzazione delle Na⁺K⁺ATPase (verde)-AQP3 (rosso) nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 10 μ M di cadmio per 48h. 10x

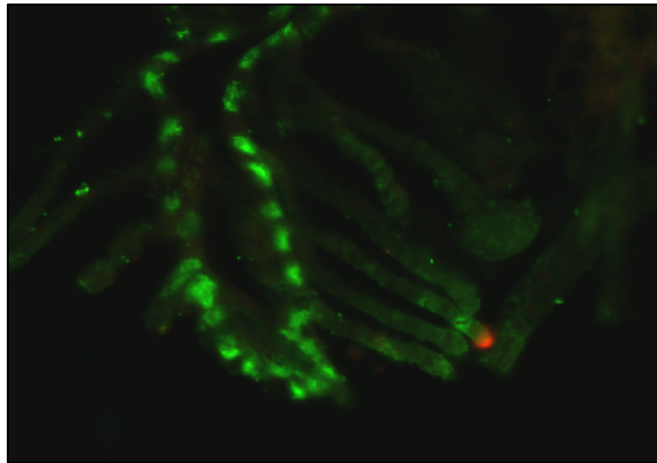


Fig.5.3.2n Immunolocalizzazione delle Na⁺K⁺ATPase (verde)-AQP3 (rosso) nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 40 μM di cadmio per 48h. L'AQP3 risulta inibita. 25x

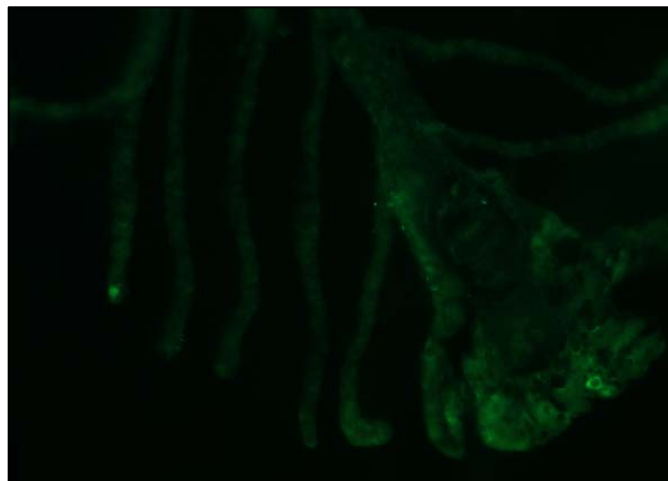


Fig.5.3.2o Immunolocalizzazione della caspasi 3 nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60 μM di cadmio per 48h. 25x

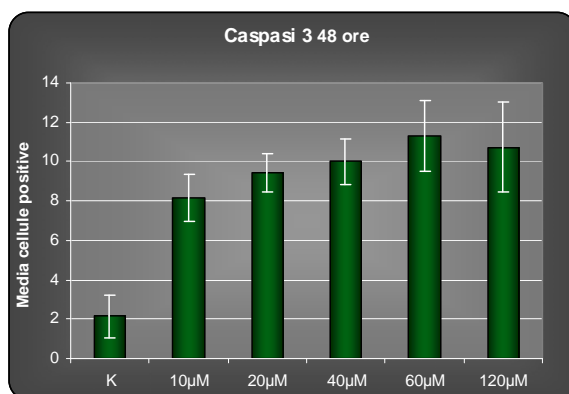


Fig. 5.3.2p Grafico che esprime l'andamento dell'immunoreattività alla caspasi3 dopo 48h di esposizione a cadmio. L'espressione aumenta con la concentrazione

5.4 Apparto branchiale degli esemplari esposti per 96h a Cadmio

5.4.1 Morfologia ed ultrastruttura

Dopo 96h di esposizione a cadmio le alterazioni a carico delle branchie sono più cospicue ed interessano particolarmente le lamelle secondarie, che già a basse concentrazioni appaiono rivestite da una coltre mucosa. Alla concentrazione di $40\mu\text{M}$ a livello del filamento principale è evidente la degenerazione delle microcreste delle cellule pavimentose mentre le lamelle assumono un aspetto irregolare e “rugoso”(Fig.5.4.a-b-c).

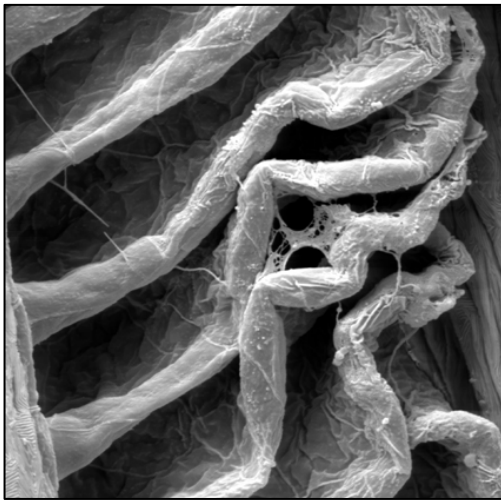


Fig.5.4a Microfotografia al SEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $20\mu\text{M}$ di cadmio per 96h. 1000x

Fig.5.4b Microfotografia al SEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $40\mu\text{M}$ di cadmio per 96h. Notiamo la degenerazione delle microcreste delle cellule pavimentose. 1000x

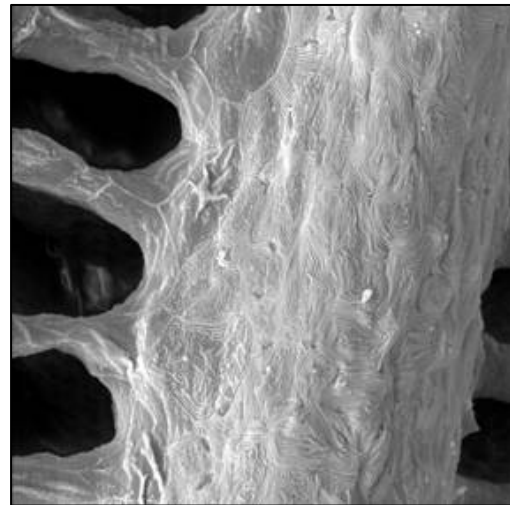
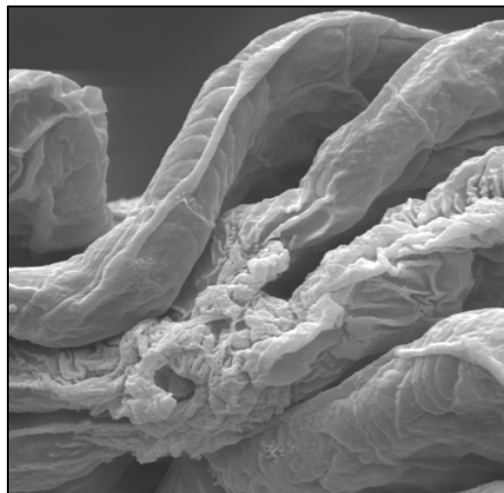


Fig.5.4c Microfotografia al SEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $40\mu\text{M}$ di cadmio per 96h. Le lamelle secondarie appaiono fortemente danneggiate. 2002x



Dopo esposizione alla concentrazione di 60 μM , come mostrano le immagini al SEM, anche il filamento principale appare ricoperto da una coltre mucosa e le lamelle appaiono notevolmente assottigliate (Fig.5.4d-e).

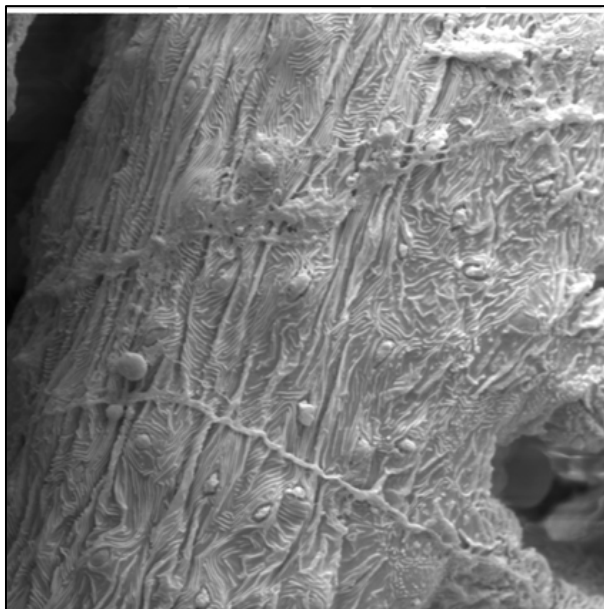


Fig.5.4d Microfotografia al SEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60 μM di cadmio per 96h. Il filamento è ricoperto da un lungo cordone mucoso.1039x

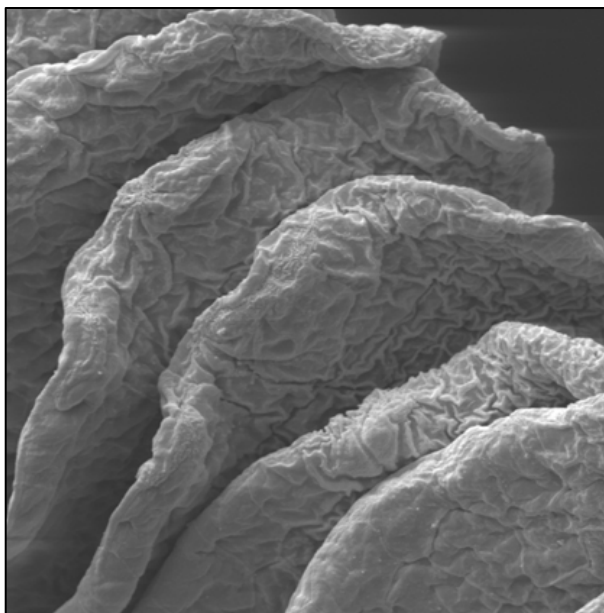


Fig.5.4e Microfotografia al SEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60 μM di cadmio per 96h. Le lamelle secondarie appaiono fortemente assottigliate.2000x

Alla concentrazione massima si osserva il sollevamento dell'epitelio a livello del filamento principale, mentre le lamelle sono interessate da fenomeni di rigonfiamento nella porzione distale (Fig.5.4f-g).

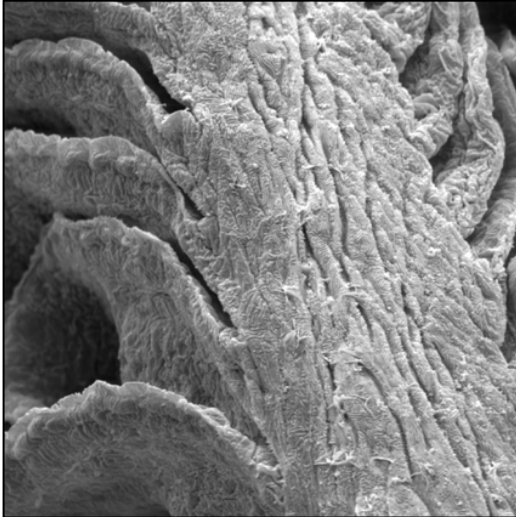


Fig.5.4f Microfotografia al SEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $120\mu\text{M}$ di cadmio per 96h. L'epitelio primario appare sollevato dagli strati sottostanti. 784x



Fig.5.4g Microfotografia al SEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $120\mu\text{M}$ di cadmio per 96h. Sono evidenti rigonfiamenti nella porzione distale delle lamelle secondarie. 472x

Le indagini al microscopio ottico mostrano che i rigonfiamenti sono dovuti a telengectasia lamellare con infiltrazione di eritrociti (Fig.5.4h)

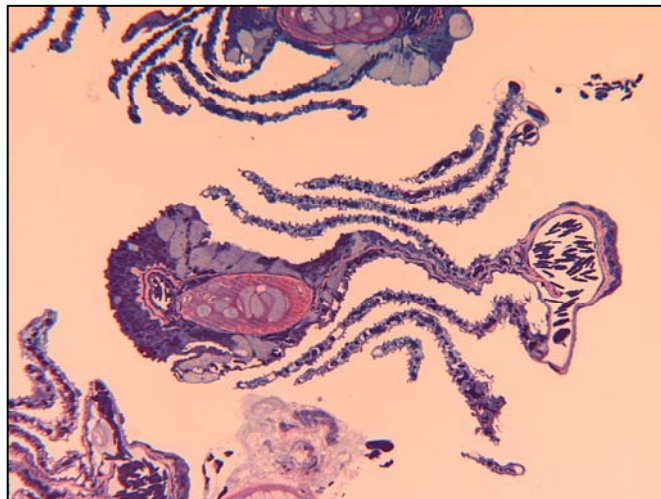


Fig.5.4h Immagine delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $60\mu\text{M}$ di cadmio per 96h. Sono evidenti rigonfiamenti nella porzione distale delle lamelle secondarie. 25x

La reazione Alcian/P.A.S. ha evidenziato un aumento di cellule acidofile ed alle concentrazioni più alte (60-120 μM) sono presenti cellule AB e P.A.S. positive (Fig.5.4 i-l)



Fig. 5.4i Reazione AB/PAS delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60 μM di cadmio per 96h. Sono evidenti cellule AB-PAS positive. 10x

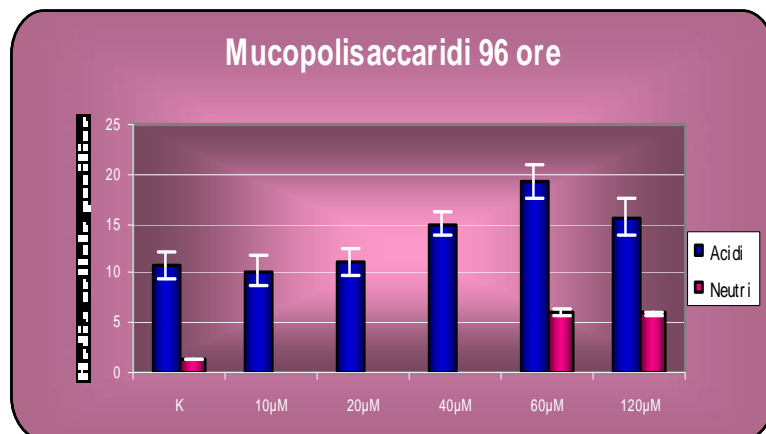


Fig. 5.4.l Grafico che esprime l'andamento dei mucopolisaccaridi dopo 96h di esposizione a cadmio. Alle concentrazioni più alte sono presenti mucosostanze di tipo misto.

Le osservazioni al TEM hanno rivelato un esteso e frequente fenomeno degenerativo a carico delle pillar cells a tutte le concentrazioni testate, mentre a partire dalla concentrazione di $40\mu\text{M}$ osserviamo qualche cellula pavimentosa in apoptosi.(Fig.5.4.m-n)

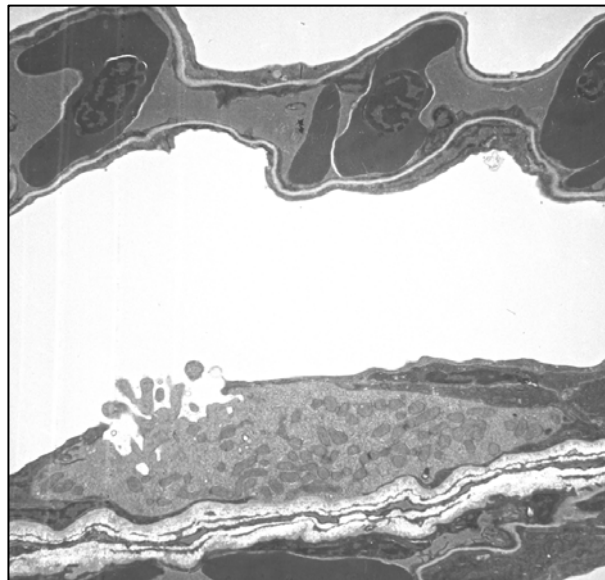


Fig.5.4m Microfotografia al TEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $40\mu\text{M}$ di cadmio per 96h. E' evidente la degenerazione delle pillar cells.3000x

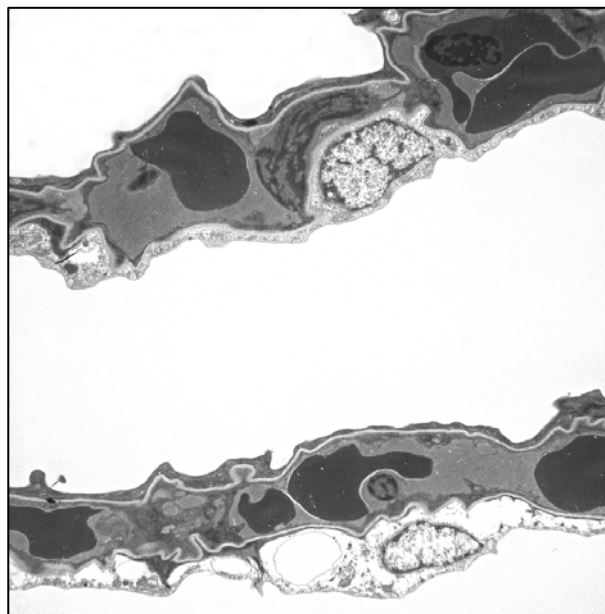


Fig.5.4n Microfotografia al TEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $40\mu\text{M}$ di cadmio per 96h. In particolare osserviamo PVCs in apoptosi.3000x

5.4.2 Analisi funzionale e statistica

La reazione di immunoperossidasi ha messo in evidenza un incremento delle cellule reattive alla serotonina alla concentrazione di 60 μ M, a 120 μ M sono evidenti solo fibre serotoninergiche. (Fig.5.4.2a-b)

Anche le cellule immunopositive al VIP aumentano con un'intensa espressione alla massima concentrazione (Fig.5.4.2c-d)

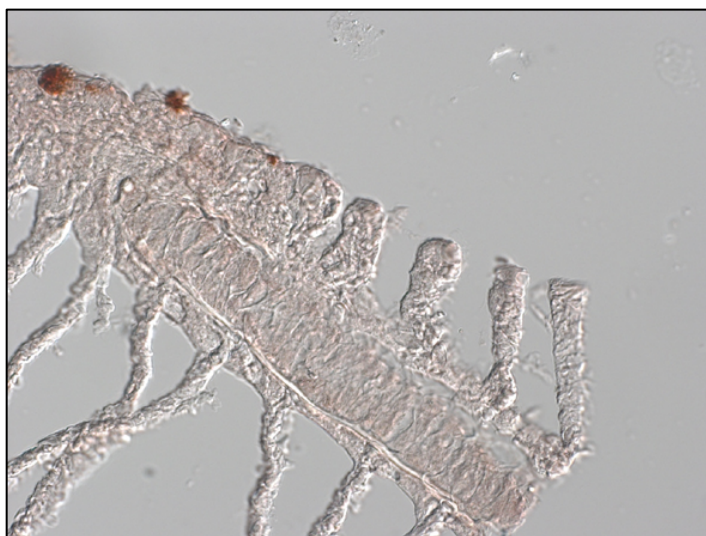


Fig.5.4.2a Immunolocalizzazione della 5-HT nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60 μ M di cadmio per 96h. 40x

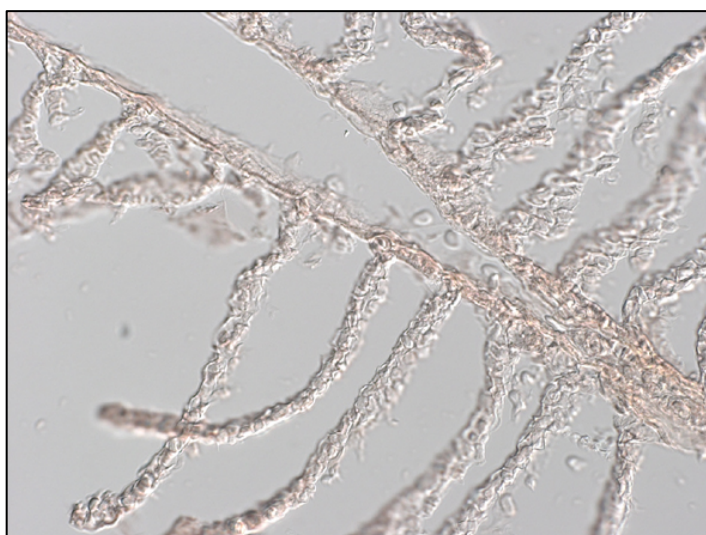


Fig.5.4.2b Immunolocalizzazione della 5-HT nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 120 μ M di cadmio per 96h. 25x



Fig.5.4.2c Immunolocalizzazione del VIP nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60 μ Mdi cadmio per 96h. 40x

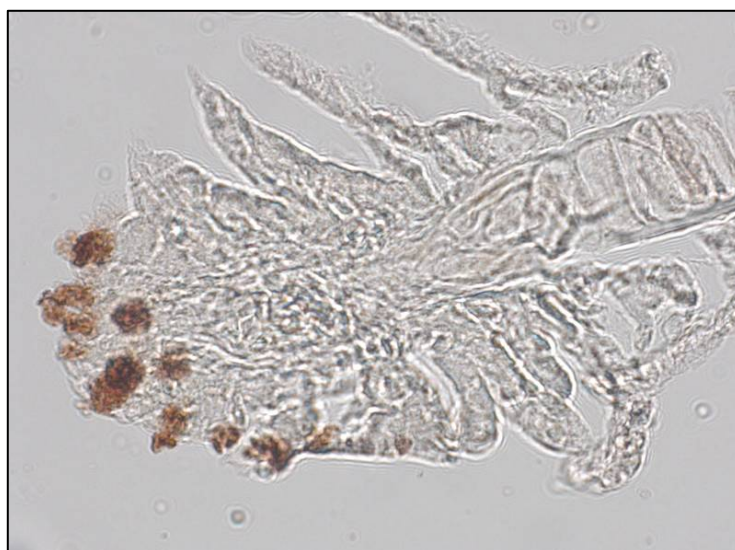


Fig.5.4.2d Immunolocalizzazione del VIP nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 120 μ Mdi cadmio per 96h. 40x

La i-NOS è sempre espressa, mentre è sempre negativa la n-NOS. Dopo 96h di trattamento sono espresse anche le metallotioneine, assenti negli esemplari di controllo e dopo 48h di esposizione a cadmio (Fig.5.4.2e-f)

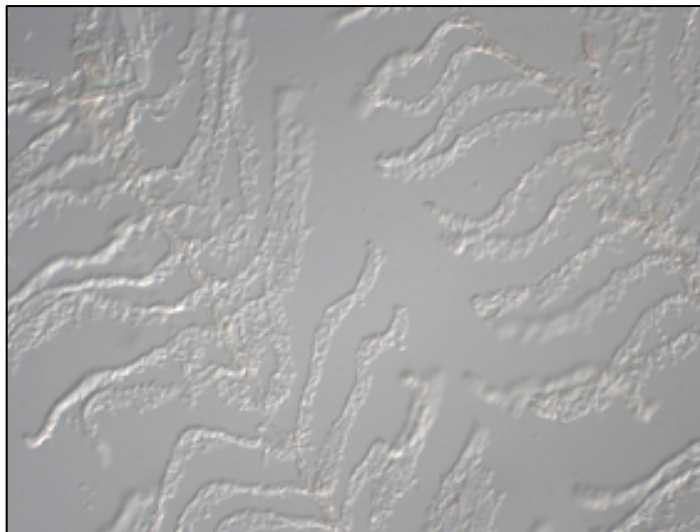


Fig.5.4.2e Immunolocalizzazione della n-NOS nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 120 μ M di cadmio per 96h. Non si osservano cellule immunoreattive. 25x

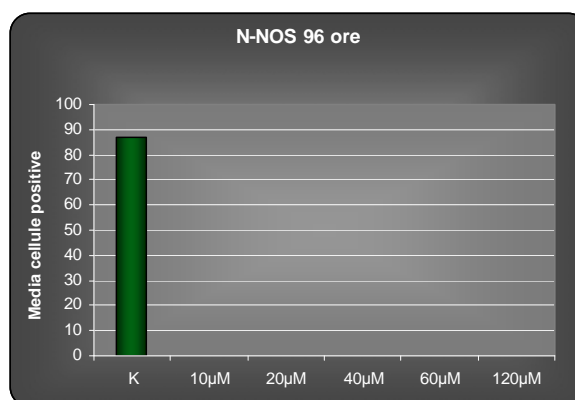


Fig. 5.4.2f Grafico che esprime l'andamento della N-NOS dopo 96 di esposizione a cadmio. E' assente a tutte le concentrazioni.

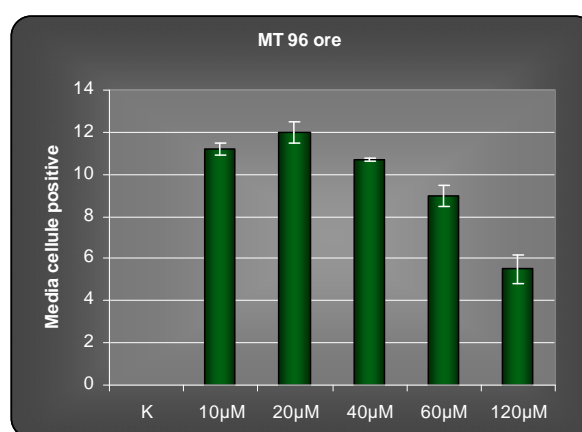
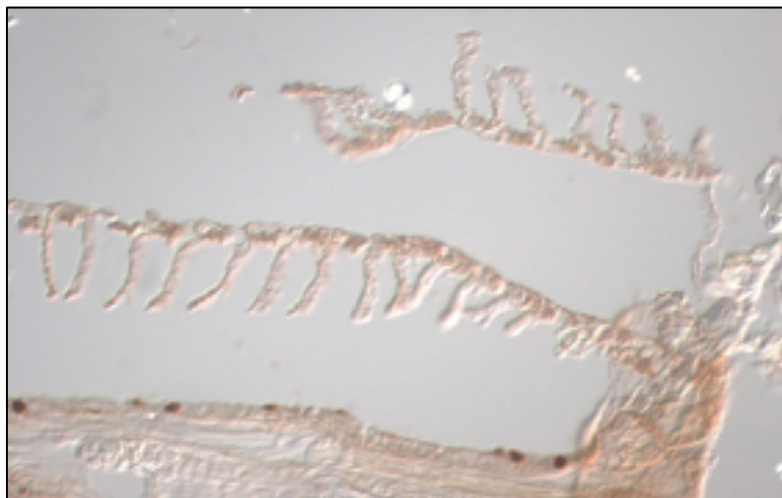


Fig. 5.4.2h Grafico che esprime l'andamento delle MT dopo 96 di esposizione a cadmio.

Si assiste inoltre ad una ripresa dell'attività dell'acquaporina 3 e non cambia il pattern di immunomarcatura della pompa sodio-potassio.(Fig.5.4.2i-l)

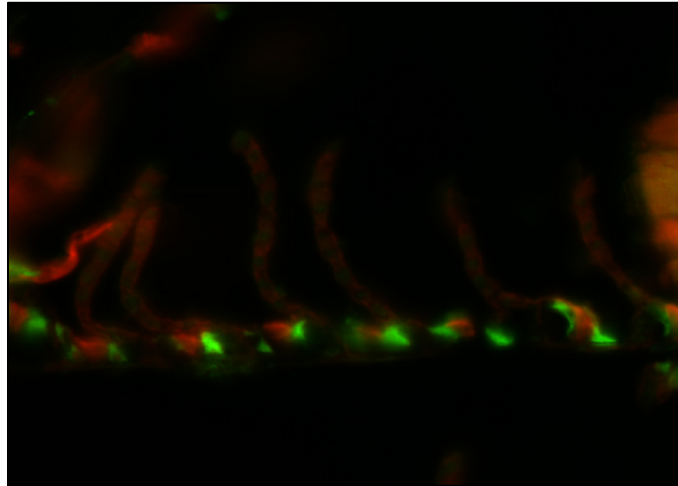


Fig.5.4.2i Immunolocalizzazione della Na⁺K⁺-ATPasi (verde) e dell'AQP3(rosso) nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60µMdi cadmio per 96h. 25x

Il numero di cellule positive alla caspasi 3 aumenta con la concentrazione (Fig.5.4.2.l)

Fig.5.4.2l Grafico che esprime l'andamento Na⁺K⁺-ATPasi e dell'AQP3 dopo 96 di esposizione a cadmio.

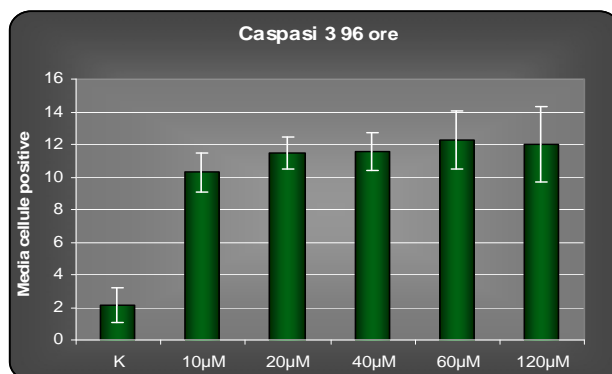
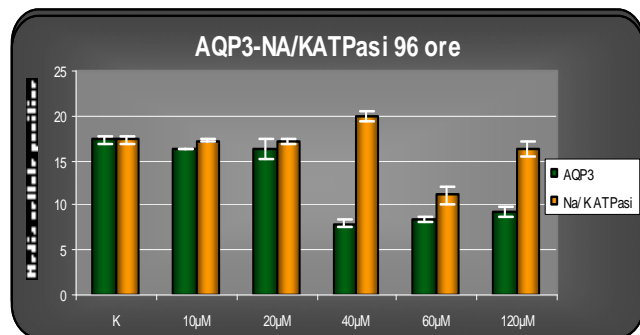


Fig.5.4.2m Grafico che esprime l'andamento della caspasi3 dopo 96 di esposizione a cadmio.

5.5 Apparto branchiale degli esemplari esposti per 192h a Cadmio

5.5.1 Morfologia ed ultrastruttura

Le alterazioni indotte dal cadmio dopo 192h si manifestano già alle basse concentrazioni ed interessano sia il filamento principale che le lamelle secondarie. Al SEM possiamo osservare come l'epitelio primario risulta sollevato e una fitta coltre di muco ricopre il filamento (Fig.5.5.a-b).

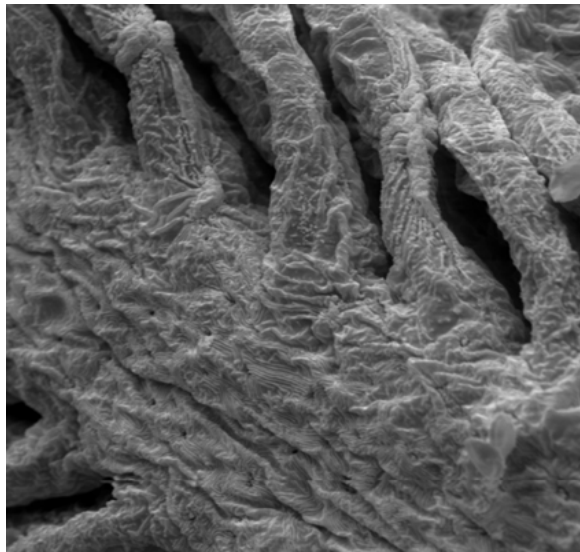


Fig.5.5.a Microfotografia al SEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 20μM di cadmio per 192h. L'epitelio primario appare sollevato dagli strati sottostanti. 1000x

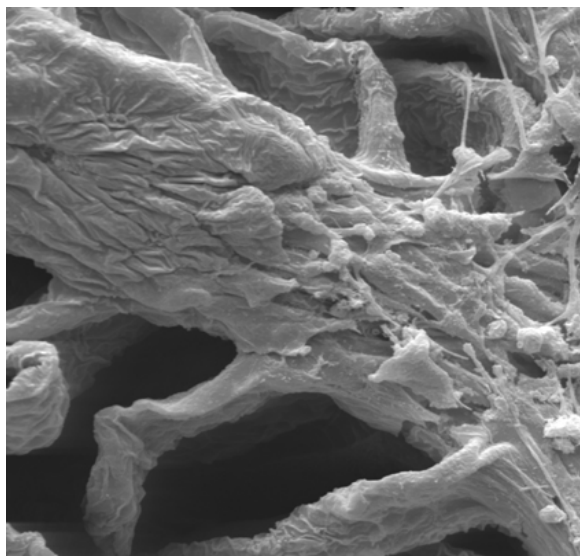


Fig.5.5.b Microfotografia al SEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 40μM di cadmio per 192h. L'epitelio primario appare ricoperto da una fitta coltre di muco. 1000x

Le lamelle assumono un aspetto “spugnoso” ed alla massima concentrazione l’architettura branchiale è ormai persa per la presenza in più punti di ipertrofia epiteliale (Fig.5.5.c-d).

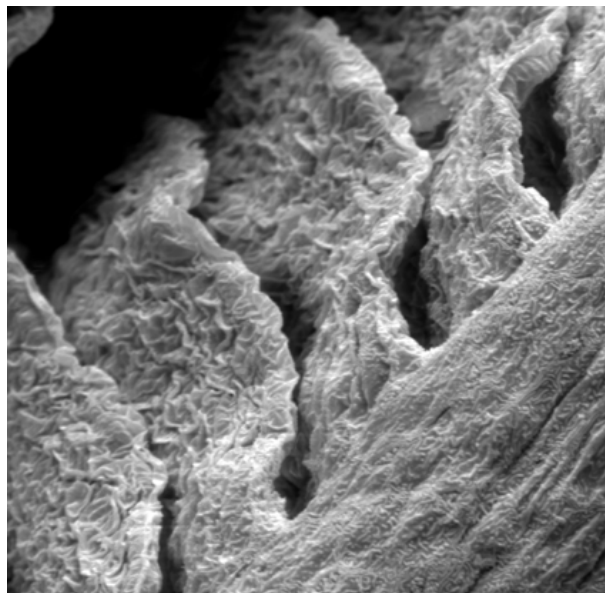


Fig.5.5.c Microfotografia al SEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60µM di cadmio per 192h.Le lamelle assumono un aspetto spugnoso.1000x

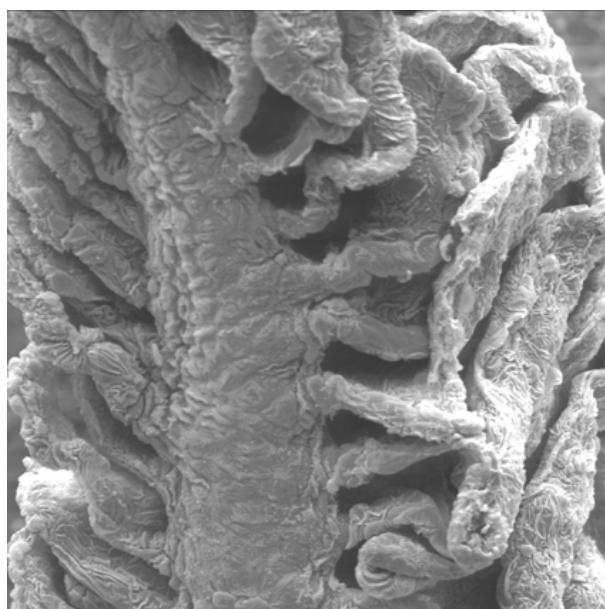


Fig.5.5.d Microfotografia al SEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 120µM di cadmio per 192h. Possiamo osservare l’ipertrofia epiteliale.500x

Al microscopio ottico è evidente la degenerazione dell'epitelio lamellare e in più punti notiamo l'iperplasia delle CCs (Fig.5.5.e) La reazione AB/ P.A.S. evidenzia la presenza di mucosostanze di tipo misto a tutte le concentrazioni testate (Fig.5.5.f-g).

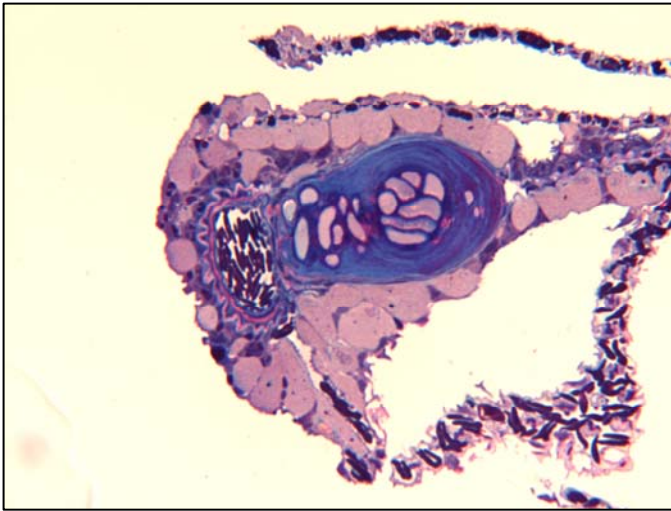


Fig.5.5.e Immagine al M.O. delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60 μ M di cadmio per 192h. Osserviamo iperplasia delle CCs. 40x.

Fig.5.5.f Reazione AB/PAS sulle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 10 μ M di cadmio per 192h. Sono presenti mucosostanze di tipo misto. 25x.

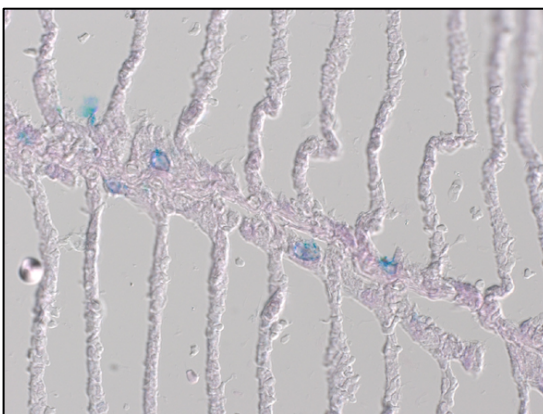
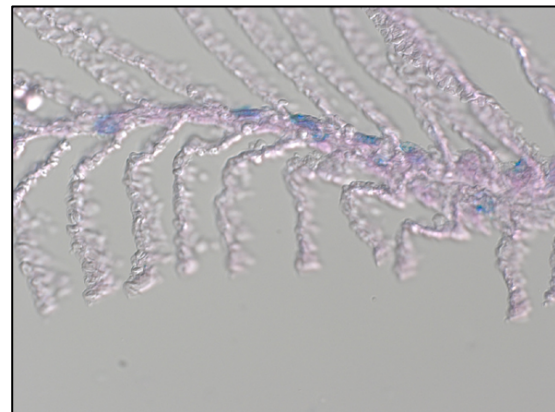


Fig.5.5.g Reazione AB/PAS sulle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 120 μ M di cadmio per 192h. Sono presenti mucosostanze di tipo misto. 25x.

Il sollevamento dell'epitelio è confermato anche dalle immagini al TEM. Sono evidenti numerose invaginazioni che circondano goblet cells e chloride cells. Queste appaiono numerose, ravvicinate tra loro ma ancora integre (Fig.5.5.h-i).

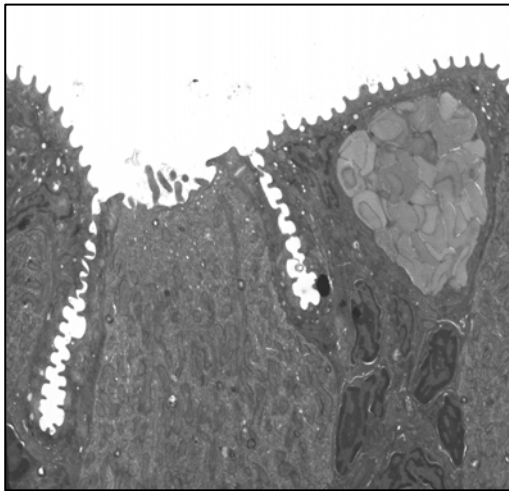


Fig.5.5.h Microfotografia al TEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 20μM di cadmio per 192h.Osserviamo le profonde invaginazioni a livello dell'epitelio primario.4400x

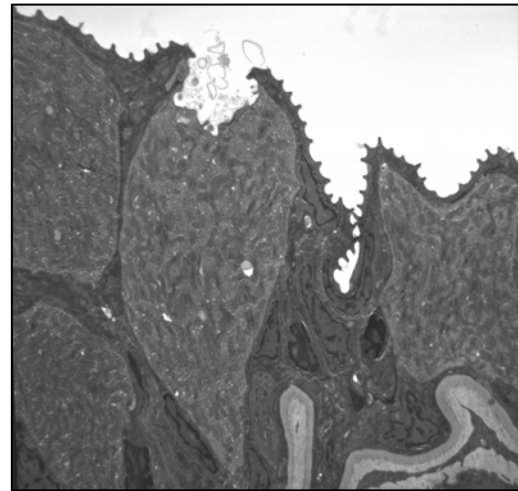


Fig.5.5.i Microfotografia al TEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 20μM di cadmio per 192h.Le CCs sono numerose ma ancora integre.3000x

Le lamelle secondarie appaiono danneggiate e la componente vascolare risulta compromessa per la degenerazione delle pillar cells (5.5.1).

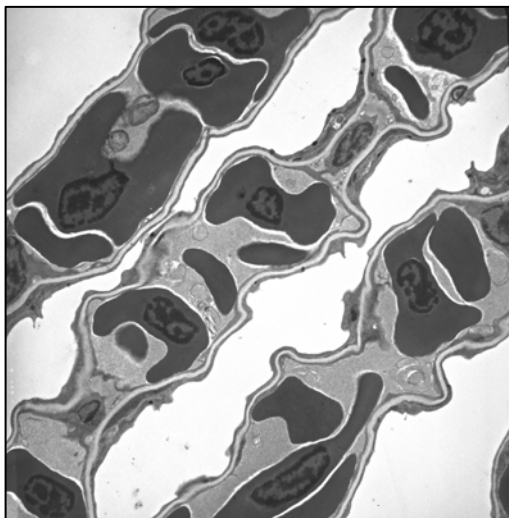


Fig.5.5.l Microfotografia al TEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 20μM di cadmio per 192h. E' evidente il danno alle pillar cells ed alla componente vascolare.3000x

A partire dalla concentrazione di $60\mu\text{M}$ gli strati epiteliali a livello del filamento principale appaiono completamente disorganizzati ed a livello delle lamelle secondarie lo strato superficiale ha ormai perso le sue tipiche caratteristiche (Fig.5.5.m-n).

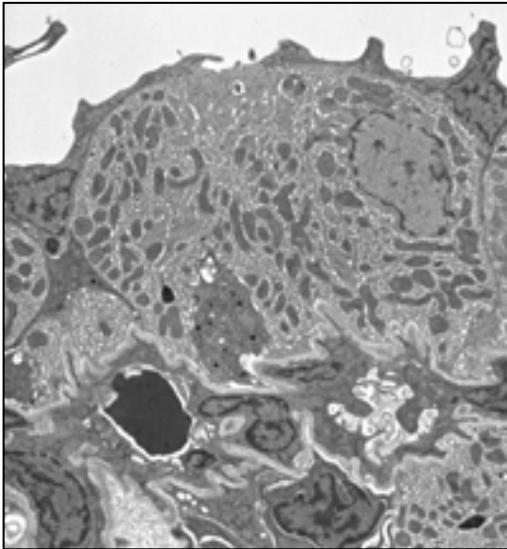


Fig.5.5.m Microfotografia al TEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $60\mu\text{M}$ di cadmio per 192h. E' evidente la disorganizzazione degli strati epiteliali a livello del filamento principale.4400x

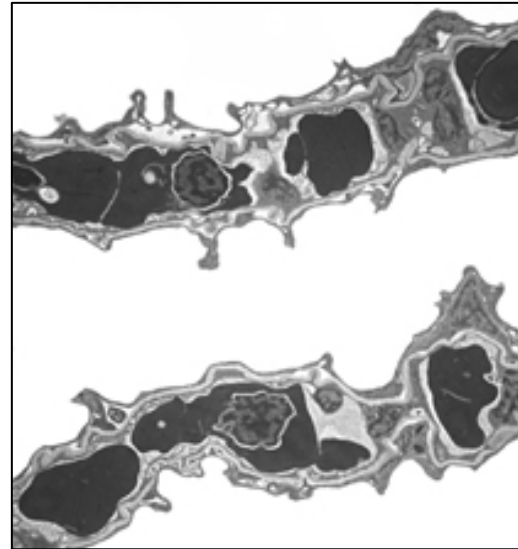


Fig.5.5.n Microfotografia al TEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $60\mu\text{M}$ di cadmio per 192h. E' evidente la disorganizzazione degli strati epiteliali a livello delle lamelle secondarie.3000x

Alla massima concentrazione lungo il filamento principale sono presenti numerose cellule pavimentose in apoptosi con citoplasma elettronchiaro e privo di organuli.

Anche le chloride cells risultano alterate e mostrano in più punti lacune che interrompono il sistema tubulo vescicolare (5.5.o-p-q)

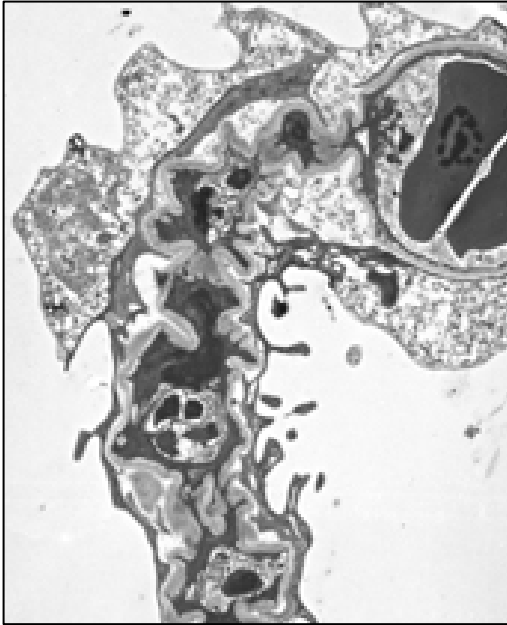


Fig.5.5.o Microfotografia al TEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $60\mu\text{M}$ di cadmio per 192h. Cellule pavimentose in apoptosi.4400x

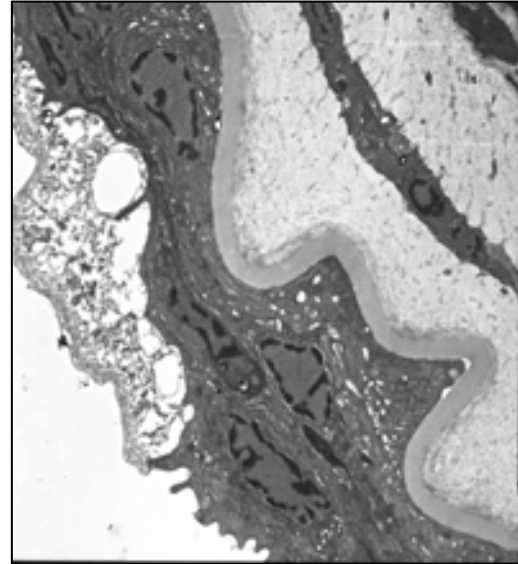


Fig.5.5.p Microfotografia al TEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $60\mu\text{M}$ di cadmio per 192h. Cellule pavimentose in apoptosi lungo il filamento principale.4400x

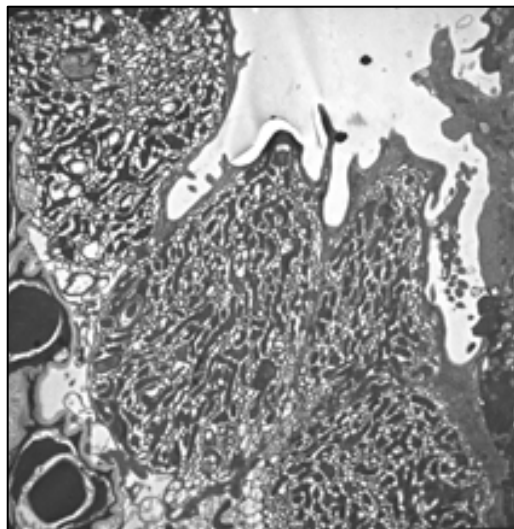


Fig.5.5.q Microfotografia al TEM delle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a $60\mu\text{M}$ di cadmio per 192h. CCs degenerate.3000x

5.5.2 Analisi funzionale e statistica

Dopo 192h di esposizione l'analisi funzionale mostra la presenza di numerose cellule reattive alla serotonina a tutte le concentrazioni testate (Fig.5.5.2a-b); il VIP risulta inibito alle basse concentrazioni mentre è espresso a 60 e 120 μ M (Fig.5.5.2c-d).



Fig.5.5.2a Immunolocalizzazione della serotonina nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60 μ M di cadmio per 192h. 40x

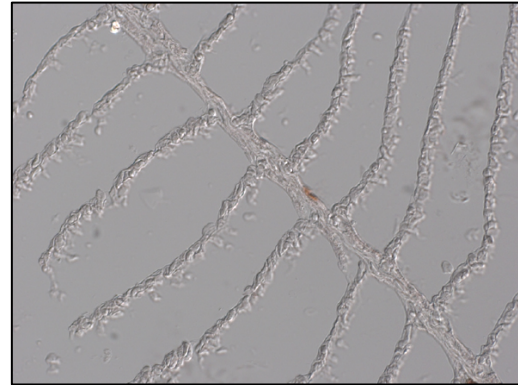


Fig.5.5.2b Immunolocalizzazione della serotonina nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 120 μ M di cadmio per 192h. 25x

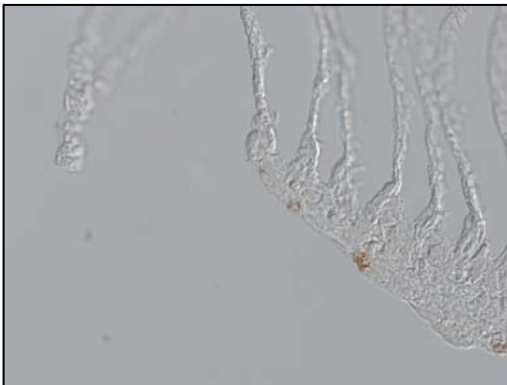


Fig.5.5.2c Immunolocalizzazione del VIP nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 60 μ M di cadmio per 192h. 40x

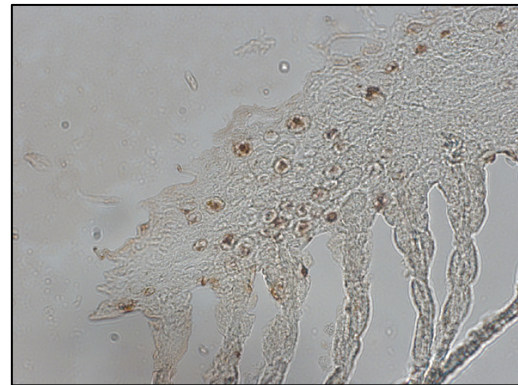


Fig.5.5.2d Immunolocalizzazione del VIP nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 120 μ M di cadmio per 192h. 40x

La i-NOS è sempre espressa mentre la n-NOS è assente.(Fig.5.5.e-f-g)



Fig.5.5.2e Immunolocalizzazione della n-NOS nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 120μM di cadmio per 192h. 25x

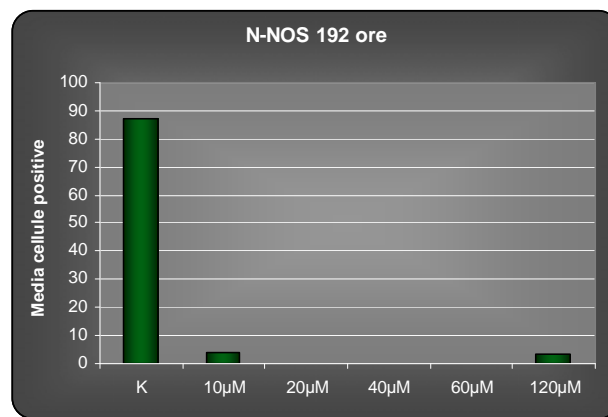


Fig. 5.5.2f Grafico che esprime l'andamento della n-NOS dopo 192h di esposizione a cadmio.

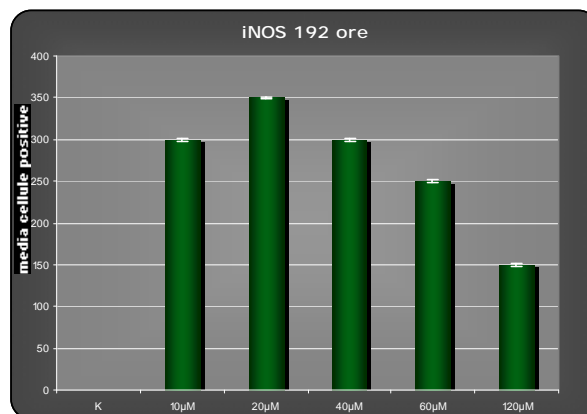


Fig. 5.5.2g Grafico che esprime l'andamento della i-NOS dopo 192h di esposizione a cadmio.

Sono state riscontrate cellule reattive alle metallotioneine solo alle concentrazioni di 60 e 120 μM (Fig.5.5.2.h).

Il pattern di immunomarcatura della Na^+/K^+ -ATPasi non cambia rispetto alle 96h (Fig.5.5.2.i).

Le cellule positive alla caspasi 3 sono numerose e localizzate lungo il filamento principale (Fig.5.5.2.l-m)



Fig.5.5.2h Immunolocalizzazione delle MT nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 120 μM di cadmio per 192h. 25x

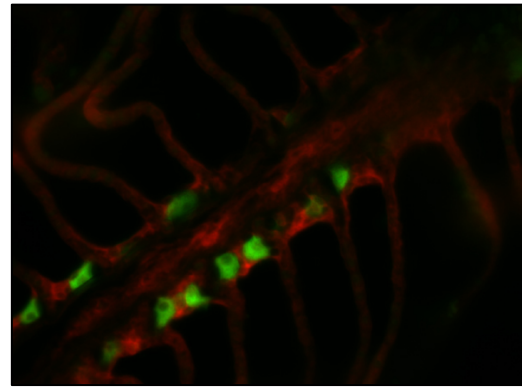


Fig.5.5.2i Immunolocalizzazione della Na^+/K^+ ATPasi (verde) e dell'AQP3 (rosso) nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 120 μM di cadmio per 192h. 40x

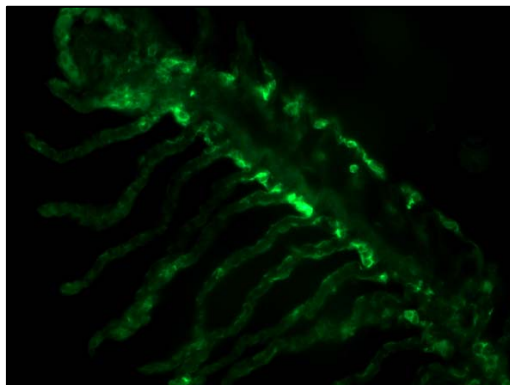


Fig.5.5.2l Immunolocalizzazione della caspasi 3 nelle branchie di *T.pavo* dopo esposizione a 10 μM di cadmio per 192h. 40x

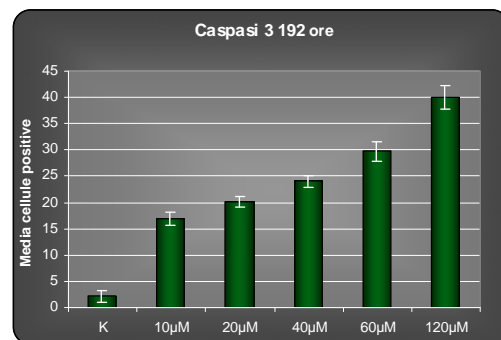


Fig. 5.5.2m Grafico che esprime l'andamento della caspasi 3 dopo 192h di esposizione a cadmio.

CAPITOLO 6

Discussioni e conclusioni

6.1 Concentrazione letale

Le ricerche relative al cadmio ed alla sua tossicità negli ambienti acquatici sono molteplici e molte di queste hanno avuto lo scopo di determinarne la concentrazione letale media per diversi gruppi animali (Holcombe *et al.*, 1976; Spehar, 1976; Robohm, 1986; Lin *et al.*, 1993; Oryan *et al.*, 1997; Gelli *et al.*, 1999; Hollis *et al.*, 1999; Muley *et al.*, 2000; Dutta & Kaviray 2001; Mungkung *et al.*, 2001; Szebedinsky *et al.*, 2001; Yilmaz *et al.*, 2004). La tossicità del cadmio è dunque ben riconosciuta ed infatti esso è stato classificato come nocivo per la vita acquatica in accordo con le linee guida dell'OECD (1992).

La maggior parte dei dati bibliografici disponibili, tuttavia, si riferisce a specie dulciacquicole e le informazioni sui pesci di acqua salata o salmastra sono poche e frammentarie. In tabella 6.1 sono schematizzati i dati presenti in letteratura.

E' documentato che la tolleranza al cadmio è specie-specifica (WHO, 1992; USEPA, 2001) ma dall'analisi dei dati appare altresì evidente come autori diversi abbiano individuato, in alcuni casi valori di LC50-96h differenti per la stessa specie.

LC50 96h	Bibliografia	Ambiente
0.022 mg/l	Hollis <i>et al.</i> , 1999	FW
0.45 mg/l	Oryan <i>et al.</i> , 1997	FW
0.018 mg/l	Szebedinsky <i>et al.</i> , 2001	FW
3.362 mg/l	Holcombe <i>et al.</i> , 1976	FW
2.30 mg/l	Mungkung <i>et al.</i> , 2001	FW
30.4 mg/l	Yilmaz <i>et al.</i> , 2004	FW
121.8 mg/l	Muley <i>et al.</i> , 2000	FW
20 mg/l	Robohm, 1986	FW
2,500 µg/l	Spehar, 1976	estuarine
89.5 mg/l	Dutta & Kaviray, 2001	estuarine
24.48 mg/l	Lin <i>et al.</i> , 1993	estuarine
6,17 mg/l (24h)	Gelli <i>et al.</i> , 1999	SW
26 mg/l	Robohm, 1986	SW

Tab.6.1 LC50 del cadmio su alcune specie di pesci . La maggior-parte dei dati si riferiscono a specie dulciacquicole (FW), pochi sono i dati relativi a specie marine (SW).

La disomogeneità dei dati e le differenze di valori di LC50 riportati per una stessa specie possono essere legati a differenze nelle proprietà chimiche del mezzo acquatico utilizzato nell'esperimento, all'età degli animali ed alla loro taglia (Garcia-Santos *et al.*, 2005). La tossicità dei metalli infatti varia in base alla durezza dell'acqua ed a parità di concentrazione dell'inquinante l'effetto dei metalli si risente maggiormente in acque più povere di CaCO₃ (Carrol *et al.*, 1979; Calamari *et al.*, 1980; Pascoe *et al.*, 1986).

I risultati ottenuti nel presente lavoro per *Thalassoma pavo* rientrano nel range di valori riportati in letteratura; bisogna però sottolineare che il protocollo utilizzato per la sperimentazione in altri studi non è sempre in

accordo con le linee guida dell'EPA e questo rende difficoltoso un confronto reale dei risultati sperimentali.

Il valore di LC50 da noi ottenuto è molto simile a quello riportato per un altro labride marino *Tautogolabrus adspersus* (Robohm, 1986); anche in questo caso era stata utilizzata la metodica consigliata dall'EPA.

Appare dunque evidente che negli studi di tossicità, per poter realizzare un confronto nella risposta ad un inquinante da parte di specie differenti, è cruciale l'applicazione di metodiche standard che garantendo l'uniformità del modello consentono valutazioni eco-tossicologiche e l'estrapolazione di dati comparativi.

6.2 Concentrazioni subletali

6.2.1 Analisi morfologica

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 & Perry 1991, Au *et al.*, 2004).

L'apparato branchiale dei pesci è estremamente complesso ed è un organo deputato a svolgere molteplici funzioni. Esso infatti gioca un ruolo importante nell'equilibrio ionico ed osmotico, rappresenta uno dei principali siti di ingresso dei metalli pesanti ed inoltre rappresenta un importante organo bersaglio di questo metallo (Evans, 1987; Olsson *et al.*, 1998; Alvarado *et al.*, 2006).

Per valutare gli effetti del cadmio sull'apparato branchiale di *Thalassoma pavo* abbiamo analizzato e confrontato i dati disponibili in letteratura per altre specie di pesci con i risultati emersi dal presente lavoro con la finalità di individuare le risposte specifiche dell'apparato branchiale dei teleostei da quelle aspecifiche.

Infatti è noto che gli effetti del cadmio sull'apparato branchiale dei pesci sono molteplici, ma risulta difficile individuare una risposta specifica dell'epitelio branchiale all'inquinamento da tale sostanza. Alcune delle alterazioni istopatologiche osservate in seguito ad esposizione al cadmio, quali iperplasia lamellare con fusione delle lamelle, ipertrofia dell'epitelio, teleangectasia, formazione di edemi, sollevamento epiteliale, sono state riscontrate in risposta a diverse sostanze inquinanti tra le quali composti organoclorurati, petrolio, metalli pesanti (Randi *et al.*, 1996; Heath, 1997; Au *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2004). Tra le risposte specifiche ricordiamo l'iperplasia delle choride cells riscontrata da Pratap e Wendellar Bonga 1993 in *Oreocromis mossambicus* esposta a cadmio.

Gli altri fattori di cruciale importanza sono il tempo di esposizione e la concentrazione del metallo.

In *Thalassoma pavo* è stato riscontrato che l'esposizione a concentrazioni subletali di cadmio induce alterazioni a livello branchiale anche dopo trattamento a breve termine e l'intensità dei fenomeni patologici appare strettamente correlata alla concentrazione dell'inquinante ed al tempo di esposizione.

La risposta precoce dell'epitelio è rappresentata dalla riduzione o scomparsa delle microcreste delle cellule pavimentose. Questo fenomeno è evidente dopo 48 ore di esposizione alla concentrazione massima da noi utilizzata, prossima a quella letale; dopo 96 ore il fenomeno è invece presente a tutte le concentrazioni testate. Esso si associa ad un fenomeno di retrazione dei lembi cellulari delle cellule pavimentose. La degenerazione delle cellule pavimentose è da considerarsi una risposta aspecifica, riscontrata anche in presenza di altri inquinanti (Brunelli *et al.*, in press)

In condizioni basali le PVC creano uno strato pressoché continuo e rivestono con lunghi prolungamenti le cellule degli strati sottostanti; la riduzione di tali prolungamenti provoca il notevole ampliamento dello sbocco in superficie delle goblet cells e delle chloride cells.

Le cellule pavimentose hanno un ruolo importante negli scambi gassosi e le microcreste di cui sono dotate servono ad aumentare la superficie di scambio (Evans *et al.*, 2005); la riduzione della superficie apicale ed ancor più della superficie respiratoria disponibile fornita dalle microcreste potrebbe essere interpretata come un tentativo di ridurre il contatto con il mezzo esterno ed il conseguente ingresso dell'inquinante. La diminuita una risposta aspecifica dell'epitelio branchiale.

Sanchez e collaboratori (1997) hanno dimostrato che la pellicola mucosa aumenta la funzione protettiva del muco. E' interessante osservare che in *Thalassoma pavo* esposto superficie tuttavia potrebbe compromettere l'efficienza respiratoria della branchia determinando, unitamente agli altri processi che descriveremo a breve, un deficit d'ossigeno.

Con l'aumentare della concentrazione e dei tempi di esposizione le alterazioni si estendono alla componente vasale; dopo 96 ore di esposizione infatti si osservano alterazione delle pillar cells e delle cellule dell'endotelio a partire dalla concentrazione di 40 μ M. Questo fenomeno è stato in precedenza riscontrato da altri autori in seguito a somministrazione di sostanze tossiche di diversa natura (Mallatt 1985) ed è quindi da considerarsi una risposta aspecifica.

Il primo meccanismo di difesa messo in atto dai pesci dopo esposizione a cadmio (McDonald & Wood, 1993) è l'aumentata secrezione di muco a livello branchiale riscontrabile anche dopo esposizione a breve termine. L'aumentato numero di cellule mucose è riportato in letteratura come un fenomeno correlato alla concentrazione del cadmio a cui l'animale è esposto (Wu *et al.*, 2007).

Il muco gioca un ruolo importante nella protezione delle branchie impedendo l'ingresso a nuovi ioni metallici (Jagoe *et al.*, 1993; Pawert *et al.*, 1998). Per alcuni autori questa strategia è estremamente utile nei casi di esposizione acuta (Jezierska & Witeska, 2004).

Tuttavia questo tipo di risposta è stata riscontrata anche in presenza di altri tipi di inquinanti (Zaccone, *et al.*, 1986; Talarico *et al.*, 2003; Brunelli *et al.*, in press), e può quindi essere considerata come a cadmio indipendentemente dal numero di cellule mucose, si ha un decremento della quantità di mucosostanze neutre ed un incremento del muco acido.

Tuttavia dopo tempi di esposizione più lunghi, l'intensa copertura di muco potrebbe contribuire alla compromissione degli scambi gassosi (Pawert *et al.*, 1998).

La cospicua copertura mucosa, la degenerazione delle pillar cells e i danni alle cellule pavimentose, possono quindi alterare la funzionalità della branchia determinando nell'animale un deficit d'ossigeno.

Tra le alterazioni morfologiche da noi riscontrate quella che potremmo definire specifica è l'iperplasia delle chloride cells (CCs). Queste cellule mantengono la loro integrità ultrastrutturale anche dopo 192 ore di esposizione a cadmio e risultano più numerose e ravvicinate a partire da 96 ore di esposizione.

Un analogo incremento numerico è riportato per la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) e sembra essere una risposta immediata dopo esposizione a cadmio (Pratap e Wendellar Bonga 1993).

Gli stessi autori ipotizzano per le branchie della stessa specie l'esistenza di un fenomeno generalizzato di iperplasia mirato ad accrescere il numero di strati cellulari e rendere quindi maggiormente difficoltosa la penetrazione dell'inquinante.

Altri autori ipotizzano invece un aumento specifico delle CC e suggeriscono un possibile ruolo di questa tipologia cellulare nell'escrezione del cadmio dalle branchie (Wong & Wong, 2000)

6.2.2 Analisi funzionale

Una delle risposte maggiormente significative dell'apparato branchiale all'esposizione al cadmio è l'aumento delle cellule 5HT-positive. Questo fenomeno è riscontrabile a tutti i tempi di esposizione ed è stato precedentemente descritto da Franchini e collaboratori (1999) in *Carassius auratus* dopo esposizione a piombo.

Inoltre pesce zebra (*Danio rerio*) Jonz e collaboratori (2004) hanno riscontrato un aumento delle cellule positive alla serotonina in risposta ad ipossia.

Probabilmente quindi l'aumento dell'espressione di questo neurotrasmettitore rappresenta una rapida e locale risposta a differenti condizioni ambientali (Franchini *et.al.*, 1999).

La reazione locale all'ipossia coinvolge anche l'espressione di altri due sostanze vasoregolatrici il peptide intestinale vasoattivo (VIP) e l'ossido nitrico (NO).

In *Thalassoma pavo* si è osservato un progressivo incremento delle cellule VIP immunoreattive con l'aumento dei tempi di esposizione e delle concentrazioni di cadmio utilizzate.

Fibre immunoreattive al peptide intestinale vasoattivo sono state descritte nelle branchie di altre specie di pesci (Nilsson & Holmgren, 1992.) ed è stato dimostrato che nelle branchie perfuse di trota il VIP produce una dilatazione concentrazione-dipendente (Budu *et al.*, 2002). Inoltre è stato verificato che questo peptide svolge un ruolo prioritario nella regolazione della secrezione del NaCl (Silva *et al.*, 1996) ed è dunque coinvolto nell'osmoregolazione (Mainoya & Bern 1984).

In *Thalassoma pavo* si è osservato un progressivo incremento delle cellule VIP immunoreattive con l'aumento dei tempi e delle concentrazioni, in risposta all'ipossia determinata dalle alterazioni morfologiche descritte. Il pattern di immunomarcatura del VIP può essere interpretato come una

risposta adattativa dell'epitelio all'ipossia più che come un effetto diretto del metallo.

Diverso è invece il pattern di immunomarcatura della n-NOS. Abbiamo infatti osservato un iniziale incremento a basse concentrazioni e per breve tempo di esposizione (48 ore) ed un successivo decremento alle concentrazioni più alte. L'enzima è completamente assente dopo 96 ore di esposizione all'inquinante.

L'NO nei pesci può agire da vasodilatatore (Fritsche *et al.*, 2000; Haraldsen *et al.*, 2002) ed è coinvolto nel mantenimento dell'integrità epiteliale, della secrezione mucosa e dell'equilibrio idro-salino (Calabrò *et al.*, 2005).

Negli animali di controllo sono state osservate cellule immunoreattive all'isoforma neuronale della NOS localizzate lungo il filamento principale e nella regione interlamellare. Dopo 96 ore di esposizione assistiamo ad una completa inibizione della n-NOS, determinata probabilmente dalle alterazioni morfologiche indotte dal cadmio.

La completa inibizione della n-NOS è accompagnata, dal progressivo aumento delle cellule immunoreattive alla i-NOS. L'isoforma inducibile determina un abbondante rilascio di ossido nitrico e questa isoforma aumenta in condizioni di ipossia (Dimmeler & Zeiher, 1997; Sollid *et al.*, 2006).

La produzione di NO potrebbe essere una risposta adattativa dell'epitelio alla condizione di ipossia determinata dalle alterazioni morfologiche insorte dopo trattamento con cadmio.

Inoltre la sua funzione citoprotettiva potrebbe rappresentare un primo tentativo dell'epitelio di recuperare la sua funzionalità.

I meccanismi di detossificazione dai metalli coinvolgono anche alcune proteine chelanti, le metallotioneine. Molti autori hanno riscontrato in diverse specie di pesci un incremento della sintesi di metallotioneine

dopo esposizione a metalli (Kito *et al.*, 1982; Roesijadi, 1996). Queste proteine reagendo con il cadmio e con altre molecole presenti nella cellula proteggono la cellula stessa dall'effetto tossico dei metalli (Klaverkamp, 1984; Roesijadi, 1992). In accordo con quanto riportato in letteratura l'esposizione prolungata a cadmio induce la sintesi di metallotioneine nell'epitelio branchiale di *T. pavo*. Negli animali di controllo e negli animali trattati con cadmio per 48ore non sono state riscontrate cellule MT-immunoreattive, ad indicare che queste proteine intervengono dopo esposizione a lungo termine.

La pompa Na^+/K^+ -ATPasi e l'AQP3 nelle branchie dei teleostei sono localizzate a livello delle CCs. Dal nostro studio è emerso che le due proteine sono colocalizzate. A conferma che in *Thalassoma pavo* si può osservare una sola tipologia di CCs le *achloride cells* tipiche dei teleostei marini (Brunelli *et al.*, in press). L'esposizione a cadmio non comporta alterazioni significative del pattern di immunomarcatura della pompa sodio-potassio. Possiamo solo notare un leggero aumento delle cellule Na^+/K^+ -ATPasi immunoreattive in funzione della concentrazione. Questo risultato rappresenta una conferma dell'iperplasia delle CCs, osservata da altri autori (Pratap & Wendellar Bonga, 1993) nelle branchie dei teleostei dopo esposizione a cadmio.

La presenza costante della pompa Na^+/K^+ -ATPasi indica il mantenimento della funzionalità delle CCs, che come testimoniato dalle immagini al TEM, rimangono integre fino alle 192h.

L'AQP3 è responsabile dell'equilibrio osmotico e della permeabilità all'acqua nelle branchie dei pesci (Isaia, 1984). Nelle branchie è localizzata a livello della porzione apicale delle CCs (Lignot *et al.*, 2002)

Dopo 48 ore di esposizione a cadmio, assistiamo ad una leggera inibizione dell'AQP3 nelle branchie di *T.pavo*. Questo potrebbe determinare uno squilibrio osmotico .successivamente compensato. Dopo 96h infatti si assiste ad una ripresa dell'attività dell'AQP3. La ripresa dell'attività e

quindi il ripristino dell'equilibrio osmotico potrebbero essere legati all'instaurarsi di meccanismi di detossificazione che coinvolgono le metallotioneine, espresse proprio a partire dalle 96 ore di trattamento.

L'effetto tossico del cadmio sui pesci si manifesta con danni cellulari che portano alla morte della cellula stessa per necrosi o per apoptosi. Studi effettuati su colture cellulari umane hanno dimostrato che il cadmio induce la sintesi di varie categorie di caspasi. (Kondoh *et al.*, 2002). Nei testicoli del teleosteo marino *Gobius niger*, il cadmio determina un aumento della caspasi3 e quindi dell'apoptosi (Migliarini *et al.*, 2005)

L'indagine ultrastrutturale delle branchie di *Thalassoma pavo* esposte a cadmio ha messo in evidenza la presenza di cellule pavimentose in apoptosi prima sulle lamelle, dopo 192 ore anche lungo il filamento principale.

L'analisi funzionale conferma quanto riscontrato dal punto di vista ultrastrutturale. Assistiamo ad un progressivo aumento delle cellule reattive alla caspasi 3 con l'aumentare della concentrazione e dei tempi di esposizione, prova questa di una induzione dell'apoptosi.

6.3 Considerazioni conclusive

Nel monitoraggio delle contaminazioni ambientali, gli indicatori biologici (biomarkers) sono considerati molto importanti per le indagini sugli effetti degli inquinanti chimici (McCarthy & Shugart, 1990; Peakall, 1994).

E' stato proposto di considerare le metallotioneine indicatori di esposizione a concentrazioni sub-letali di metalli pesanti (Langston *et al.*, 2002). Il dato significativo emerso da questo lavoro è l'induzione delle metallotioneine a partire dalle 96ore di trattamento.

In accordo con quanto riportato in letteratura possiamo affermare che queste proteine rappresentano un buon indicatore dello stress da metalli pesanti. Possiamo inoltre aggiungere che mentre la i-NOS, espressa nelle

branchie di *Thalassoma pavo* per tutta la durata del trattamento, può essere considerata un marker precoce di inquinamento da cadmio, le metallotioneine possono essere considerate indicatori di esposizione a lungo termine.

Le alterazioni morfologiche indotte da esposizione a cadmio possono determinare una condizione di ipossia, a cui l'animale tenta di sopperire sintetizzando alcune sostanze che hanno attività sul tono vasale quali la serotonina, il peptide intestinale vasoattivo e l'ossido nitrico. Questo metallo non influenza in maniera significativa l'equilibrio ionico come testimoniato dalla integrità delle chloride cells e dal pattern di immunomarcatura della pompa Na^+/K^+ -ATPasi.

I cambiamenti morfo-funzionali osservati durante il nostro studio confermano che cadmio è da considerarsi una sostanza estremamente pericolosa (OECD, 1992). Sarebbe quindi necessario stabilire limiti per il suo utilizzo e per l'immissione in ambiente acquatico al fine di preservare le comunità biologiche dai danni che questa sostanza può provocare.

Bibliografia

- Agre, P., Preston, G. M., Smith, B. L., Jung, J. S., Raina, S., Moon, C., Guggino, W. B., Nielsen, S.,** 1993. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *American Journal of Physiology* **265**: 463-476.
- Agre, P., King, L. S., Yasui, M., Guggino, W. B., Ottersen, O. P., Fujiyoshi, Y., Engel, A. , Nielsen, S.** 2002. Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. *The Journal of Physiology* **542**: 3-16.
- Ahuja, S.K.,** 1970. Chloride cell and mucous cell response to chloride and sulphate enriched media in the gills of *Gambusia affinis* and *Catla catla*. *Journal of Experimental Biology* **173**: 231-250.
- Aldman, G., Holmgren, S.,** 1992. VIP inhibits CCK-induced gall bladder contraction involving a beta-adrenoreceptor mediated pathway in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in vivo. *General and Comparative Endocrinology* **88**: 287-291.
- Alvarado , N. E., Quesada, I. , . Hylland, K , Marigómez, I. , Soto , M.,** **2006.** 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. *Aquatic Toxicology* **77** : 64–77
- Ardalı, Y.,** 1990. Endüstriyel atık sulardan ağır metallerin adsorpsiyon ile uzaklaştırılması heavy metal expurgation from industrial waters by absorption. M.S. Thesis, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Samsun, Turkey.

- Au D.W.T.** 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* **48**:817-834.
- Budu, C.E., Efendiev, R., Cinelli, A.M., Bertorello, A.M., Pedemonte, C.H.,** 2002. Hormonal-dependent recruitment of Na⁺,K⁺-ATPase to the plasmalemma is mediated by PKC beta and modulated by [Na⁺]_i. *British Journal of Pharmacology* **137**: 1380–1386.
- Blaise, G.A., Gauvin, D., Gangal, M., Authier, S.,** 2005. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* **208**: 177–192.
- Brennan, P.A. & Moncada, S.,** 2002. From pollutant gas to biological messenger: the diverse actions of nitric oxide in cancer. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **84**(2): 75-78.
- Brunelli, E., Sesso, F., Tripepi S.** 2004. “Flora e fauna dei mari di Calabria”. La provincia di Cosenza- Assessorato all’ambiente.
- Brunelli, E., Talarico, E., Corapi, B., Perrotta, I., Tripepi, S.,** in press. Effects of sodium lauryl sulphate non-lethal concentration on morphology and Na⁺/K⁺ATPase activity in the gill of the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Bullini, L., Pignatti, S., Virzo De Santo, A.,** 1998. *Ecologia generale*. Ed. UTET. Torino.
- Calabrò, C., Albanese, M.P., Lauriano, E.R., Martella, S., Licata, A.,** 2005. Morphological, histochemical and immunohistochemical study of the gill epithelium in the abyssal teleost fish *Coelorhynchus coelorhyncus*. *Folia Histochemica et Cytobiologica* , **43** (1): 51-56.

- Calamari, D., Marchetti, R., Vailati, G.,** 1980. Influence of water hardness on cadmium toxicity on *Salmo giardneri*. *Richardson Water Research* **14**:1421.
- Carroll, J.J., Ellis, S.J. and Oliver, W.S.,** 1979. Influence of hardness constituents on the acute toxicity of cadmium to brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **22**: 575.
- Chow, B. K. C.,** 1997. The goldfish vasoactive intestinal polypeptide receptor: functional studies and tissue distribution. *Fish physiology and Biochemistry* **17**: 213-222.
- Cognetti, G., Sarà M., Magazzù G.,** 2004. *Biologia marina*. Ed. Calderini, Bologna.
- Coons, A.H., Leduc, E.H., Connolly, J.M.,** 1955. Studies on antibody. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *Journal of Experimental Medicine* **102**:49-59.
- Costa F.** 2000. *Atlante dei pesci dei mari italiani*. Ed. Mursia, Milano.
- Dang, Z., Lock, R. A. C., Flik, G., Wendelaar Bonga, S. E.,** 1999, "Metallothionein response in gill of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water". *American Journal of Physiology* **277**: 320-331.
- De Boeck, G., Ngo, T. T. H., Van Campenhout, K., Blust, R.** 2003. Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. *Aquatic Toxicology* **65**: 413-424.
- Della Croce, N., Cattaneo Vietti, R., Danovaro, R.,** 2001. *Ecologia e protezione dell'ambiente marino costiero*. Ed. UTET, Torino.

- Dimmeler, S & Zeiher, A.M.**, 1997. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide Biological Chemistry* **1(4)**:275–281.
- Dunel-Erb, S., Bailly, Y. , Laurent, P.**, 1989. Neurons controlling the gill vasculature in five species of teleosts. *Cell Tissue Research* **255**: 567-573.
- Dutta, T. K.& Kaviray, A.**, 2001. Acute toxicity of cadmium to fish *Labeo rohita* and copepod *Diaptomus forbesi* pre-exposed to CaO and KMnO₄. *Chemosphere* **42(8)**: 955-958.
- Ebbesson, L. O. E., Tipsmark, C. K., Holmqvist, B., Nilsen, T., Andersson, E., Stefansson S. O., Madsen, S. S.**, 2005. “Nitric oxide synthase in the gill of Atlantic salmon: colocalization with and inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase”. *Journal of Experimental Biology* **208**: 1011-1017.
- Echevarria, M., Windhager, E. E., Frindt, G.** 1996. Selectivity of the renal collecting duct water channel aquaporin-3. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 79-82.
- Eckhart, L., Ballaun, C., Uthman, A., Kittel, C., Stichenwirth, M., Buchberger, M., Fischer, H., Sipos, W., Tschachler, E.**, 2005. Identification and Characterization of a Novel Mammalian Caspase with Proapoptotic Activity. *The Journal of Biological Chemistry* **280(42)**:35077–35080.
- Eckert, R. & Randall, D.** 1991. Fisiologia animale: meccanismi e adattamenti. *Zanichelli Ed.*, Bologna.
- EIFAC** ,1983. Working party on toxic testing procedures on fish toxicity testing procedures. *EIFAC Technical Paper*, **24**: 1–37.

- EPA**, 1999. LC50 Software Program, Version 1.00. Center for Exposure Assessment Modeling (CEAM) Distribution Center.
- EPA**, 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, Fifth Edition. Office of Water, Washington, D.C. EPA-821-R-02-012.
- Evans, D.H.**, 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* **71**: 47–58.
- Evans, D.H., Piermarini, P. M., Choe K.**, 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews* **85**: 97-177.
- Everett, H., MaFadden, G.**, 1999. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends in Microbiology* **7**:160-5.
- FAO**, 1981 Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4: bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. *FAO Documentos Técnicos de Pesca* **164**: 1–34.
- Finney, D.J.**, 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press, New York, 337.
- Fletcher, T.C.**, 1978. Defence mechanism in fish. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **32**: 681-689.
- Förstermann, U, Boissel, J-P, Kleinert, H.** 1998. Expressional control of the ‘constitutive’ isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB Journal* **12**:773–790.
- Franchini, A., Rebecchi, B., Bolognani Fantin, AM.** 1999. Gill endocrine cells in the goldfish *Carassius carassius* var. *auratus* and their

impairment following experimental lead intoxication. *The Histochemical Journal* **31**: 559-564

- Fritsche, R., Thomas, S., Perry, S.F., 1992.** Effects of serotonin on circulation and respiration in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology* **173**, 59-73
- Fritsche, R., Schwerte, T., Pelster, B., 2000.** Nitric oxide and vascular reactivity in developing zebrafish, *Danio rerio*. *Am. J. Physiol.* **279**, 2200-2207
- Garcia-Santos, S., Fontainhas-Fernandes, A., Wilson, J. M., 2005.** Cadmium Tolerance in the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Following Acute Exposure: Assessment of Some Ionoregulatory Parameters. *Environmental Toxicology*, DOI 10/1002/tox: 33-45
- Gelli, F., Cicero, A. M., Melotti, P., Roncarati, A., Pregnolato, L., Savorelli, F., Palazzi, D., Mariani, L., Casazza, G., 2003.** Monitoraggio di acque marino-costiere secondo il D. L.vo 152/99 (aggiornato dal D. L.vo 258/00): messa a punto di saggi biologici acuti, prolungati, cronici e di bioaccumulo con la specie ittica branzino (*Dicentrarchus labrax L.*) *ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI -XXI GIORNATA DELL'AMBIENTE AREE COSTIERE- 5 GIUGNO 2003.*
- Gibbins, I. L., Olsson, C. and Holmgren, S. 1995.** Distribution of neurons reactive for NADPH-diaphorase in the branchial nerves of a teleost fish, *Gadus morhua*. *Neurosci. Lett.* **193**, 113-116
- Gressens, P., Hill, J. M., Gozes, I., Fridkin, M., Brenneman, D.E. 1993.** Growth factor function of vasoactive intestinal polypeptide in whole cultured mouse embryo. *Nature London* **362**: 155-157.

- Griffin DE, Hardwick JM.** 1997. Regulators of apoptosis on the road to persistent alphavirus infection. *Annual Review of Microbiology* **51**:565e92.
- Haraldsen, L., Soderstrom-Lauritzsen, V., Nilsson, G. E.** ,2002. Oxytocin stimulates cerebral blood flow in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through a nitric oxide dependent mechanism. *Brain Research* **929**, 10-14.
- Hasegawa, H., Ma, T., Skach, W., Matthay, M. A., Verkman, A. S.,** 1994. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 5497-5500.
- Heath A. G.** 1987. Water pollution and fish physiology. CRC press, Boca Raton, FL.
- Haraldsen, L., Soderstrom-Lauritzsen, V. and Nilsson, G. E.,** 2002. Oxytocin stimulates cerebral blood flow in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through a nitric oxide dependent mechanism. *Brain Research* **929**, 10-14.
- Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.R., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano R. A., O kihiro, M. S.,** 1992, Histopathological biomarkers. In: R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle-Jr. & H. L. Bergman (eds.), *Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl.
- Hollis, L., McGeer, J.C, McDonald, D.G., Wood, C.M.,** 199. Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* **46** : 101–119.

- Holstein B.**, 1983. Effect of vasoactive intestinal polipeptide on gastric acid secretion and mucosal blood flow in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *General and Comparative Endocrinology* **52**: 471-473.
- Hootman, S. R., Philpott, C. W.**,1979. Ultracytochemical localization of Na⁺, K⁺-activated ATPase in chloride cells from gills of euryhaline teleost. *The Anatomical Record* **193**: 99-130.
- Hughes, G.M.**, 1979. Scanning electron microscopy of the respiratory surface of trout gills. *Journal of Zoology*.
- Isaia, J.**, 1984. Water and Nonelectrolyte permeation. *In Fish Physiology. Volume X. Gills. Part B. Ion and water transfer* (W.S. Hoar and D.J. Randall eds.) Academic press. London. 1-138.
- Ishibashi, K., Sasaki, S., Fushimi, K., Uchida, S., Kuwahara, M., Saito, H., Furukawa, T., Nakajima, K., Yamaguchi, Y., Gojobori, T., Marumo, F.**, 1994. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 6269-6273.
- Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Kageyama, Y., Tohsaka, A., Suzuki, F., Marumo, F. and Sasaki, S.** 1997. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 20782-20786.
- Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Tanaka, Y., Marumo, F. and Sasaki, S.**,1998. Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* **244**: 268-274.

- Ishibashi, K., Morinaga, T., Kuwahara, M., Sasaki, S. and Imai, M., 2002.** Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as aquaglyceroporin. *Biochimica and Biophysica Acta* **1576**:335-340.
- Jagoe, C.H., Matey, V.E., Haines, T.A., Komov, V.T., 1993.** Effect of beryllium on fish in acid water is analogous to aluminum toxicity. *Aquatic Toxicology* **24**: 241–256.
- Jensen, J., Holmgren, S., 1985.** Neurotransmitters in the intestine of the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **82**: 81-89.
- Jeziarska, B., Witeska, M., 2004.** The effect of metals on fish gill functions-Gas and ion exchange (review). *Fresenius Environmental Bulletin* **13**: 1370– 1378.
- Jürss,K. & Bastrop R., 1995.** The function of mitochondria-rich cells (chloride cells) in teleost gills. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **5**: 235-255.
- Karnaky, K. J. Jr., 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.
- Kendall, M. W., & Dale., J.E., 1979.** Scanning and transmission electron microscopic observations of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gill. *Journal of Fish Research. Bosrd Can.*, **36**: 1072-1079.
- King, L. S., Kozono, D. and Agre, P., 2004.** From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 687-698.

- Kito, H., Ose, Y., Mizuhira, V., Sato, T., Ishikawa, T., Tazawa, T.** 1982. Separation and purification of (Cd, Cu, Zn)-metallothionein in carp hepato-pancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology* **73**: 121-127
- Klaverkamp, J. F., Macdonald, W. A., Duncan, D. A., Wagemann, R.,** 1984. Metallothionein and acclimation to heavy metals in "sh: A review. *In* &&Contaminant Effects on Fisheries" (V. W. Cairns, P. V. Hodson, and J. O. Niagru, Eds.), pp. 100}113. Wiley, New York.
- Kondoh, M., Araragi, S., Sato, K., Higashimoto, M., Takiguchi, M., Sato, M.,** 2002. Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells. *Toxicology* **170**: 111–117.
- Langston, W. J, Chesman, B. S., Burt, G. R., Pope, N.D., McEvoy, J.,** 2002. Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? **53** (3):263-293
- Laurent P., Dunel S.,**1980. *Morphology of gill epithelia in fish. American Journal of Physiology*, 238 (Regulatory Integrative Comparative Physiology 7), R147-R159.
- Laurent. P., Perry, S.F.,** 1991. Environmental effects on fish gill morphology, *Physiol. Zool.*, **64**: 4-25.
- Laurent, P.** 1984. Gill internal morphology. *Fish Phisiology* **XA**, 73 - 183.
- Lignot, J.H., Cutler, C. P., Hazon, N., Cramb, G.,** 2002. Immunolocalisation of aquaporin 3 in the gill and the gastrointestinal tract of the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *The Journal of Experimental Biology* **205**: 2653–2663 .

- Lin, H.P. , Thuet, P., Thrilles, J.P., Mounet-Guillaume, Charmantier, G.,** 1993. Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various development stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Marine Biology* **117**:591–598
- Lundin, K., Holmegren, S.,** 1984. Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity and effects of VIP in the Swim-bladder of the cod, *Gadus morhua*. *Journal of Comparative Physiology B* **154**: 627-633.
- Mainoya, J.R.& Bern, H.A.,** 1984. Influence of vasoactive intestinal polypeptide urotensin II on the absorption of water and NaCl by the anterior intestine of the tilapia, *Sarotherodon mossambicus*. *Zoological Science* **1**: 100–105.
- Mallatt J.,** 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **42**: 630-648.
- Martinez,C. B. R., Nagae, M. Y., Zaia, C. T. B. V., Zaia, D. A. M.,** 1994. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazilian Journal of Biology* **64 (4)**: 797-807.
- Mauceri, A., Fasulo, S., Ainis, L., Licata, A., Lauriano, E. R., Martinez, A., Mayer, B., Zaccone, G.,** 1999. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression in the epithelial neuroendocrine cell system and nerve fibers in the gill of the catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Acta Histochemica* **101**: 437-448.
- McCarthy F. & Shugart, L. R.,** 1990. Biomarkers of environmental contamination. *Lewis Pub.* Chelsea USA.

- McDonald, D. G., Wood, C. M.**, 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin J. C., Jensen F. B. (eds), Fish ecophysiol. Chapman and Hall, London, 297-321.
- Migliarini B., Campisi, A.M., Maradonna, F., Truzzi, C., Annibaldi, A., Scarponi, G.,Carnevali, O.**, 2005. Effects of cadmium exposure on testis apoptosis in the marine teleost *Gobius niger*. *General and Comparative Endocrinology* **142** : 241–247
- Miller, L.K. & White, E.**, 1998. Introduction apoptosis in virus infection. *Seminars in Virology* **8**: 443-444.
- Mitchell, L. G., Mutchmor, J. A., Dolphin, W. D.** 1991. Zoologia. Ed. Zanichelli, Bologna
- Mojetta, A., Ghisotti, A.**, 2000. Flora e fauna del Mediterraneo. Ed. Mondadori, Milano.
- Morgan, M.**, 1974. Development of secondary lamellae of the gills of the trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Cell Tissue Research* **151**:509-523.
- Mungkung, R., Upatham, E. S , Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Panichajakul C.**,2001. Effects of Humic Acid and Water Hardness on Acute Toxicity and Accumulation of Cadmium in the Freshwater Fish (*Puntius gonionotus* Bleeker). *Science Asia* **27**: 157-164.
- Murty, A.S.**,1986. *Toxicity of Pesticides to Fish*, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nilsson, S., & Holmgren, S.**, 1992. Cardiovascular control by purines, 5-hydroxytryptamine, and neuropeptides. In: *Fish Physiology*, edited by Hoar WS, Randall DJ, and Farrell AP. Orlando, FL: Academic, 301–341

- Nonnotte, G. & Kirsch R.**, 1978. Cutaneous respiration in seven seawater teleosts. *Respiration Physiology* **35**: 111-118.
- Nordberg, M.**, 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* **46**, 243- 254.
- Novelli, E. L. B., Vieira, E. P., Rodrigues, N. L., Ribas, B. O.**1998. Risk assessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissue of rats. *Environmental Research* **79**(2): 102-105.
- Oryan, S. & Nejatkhah, P.**, 1997. Effects of cadmium on plasma cortisol and prolactin levels in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Faculty of Veterinary Meicine of University of Tehran* **51**: 39–53.
- OECD**, **1992**. Chemical Group and Management Committee: Harmonization of Classification Systems for Chemicals. 18th joint meeting, 1992. ENV/MC/CHEM (92) 6.
- Olsson, P.E., Kling, P., Hogstrand, C.**, 1998. Mechanism of heavy metal accumulation and toxicity in fish. In: Langston, W.J., Bebianno, M.J(Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London, 321–350.
- Pascoe D., Evans' S. A., Woodworth, J.**,1986. Heavy metal toxicity to fish and the influence of water hardness. [*Archives of Environmental Contamination and Toxicology*](#) **15** (5):481-487.
- Pawert, M., Müller, E., Tribskorn, R.**, 1998. Ultrastructural changes in fish gills as biomarkers to assess small stream pollution. *Tissue Cell* **30**, 617–626.
- Peakall, D.B.**, 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). *Introduction to Ecotoxicology* **3**: 157–160.

- Perry, S. F.** (1997). The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology* **59**: 325- 347.
- Pisam, M. & Rambourg, A.**, 1991. Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of Teleost fishes: an ultrastructural approach. *International Review of Cytology* **130**: 191-232.
- Pratap, H. B. & Wendellar Bonga, S. E.** 1993. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gills of freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. *Aquatic Toxicology* **26**: 133-150.
- Provini, A., Galassi, S., Marchetti, R.**, 1998. *Ecologia Applicata. Città Studi Ed.*, Milano
- Raina, S., Preston, G. M., Guggino, W. B., Agre, P.** 1995. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 1908-1912.
- Randi, A. S., Monserrat, J. M., Rodriguez, E M., Romano, L. A.**, 1996. Histopathological effects of cadmium on the gill of the freshwater fish, *Macropsobrycon Uruguayanae* Eigemann (Pisces, Atherinidae). *Journal of Fish Diseases* **19**: 311-322.
- Richard, D., Anselme, B., Baehr, J.C., Chaffard, J., Méreaux, J., Périlleux, E., Valet, P.**, 2001. *Fisiologia degli animali*. Zanichelli Ed. S.p.A., Bologna.
- Robohm, R. A.**, 1986. Paradoxical effects of cadmium on antibacterial antibody responses in two fish species: inhibition in cunners (*Tautogolabrus adspersus*) and enhancement in striped bass (*Morone saxatilis*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **12**:251-262.

- Roesijadi, G.**, 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative Biochememistry and Physiology C* 113, 117-123
- Rostene, W. H.**, 1984. Neurobiological and neuroendocrine fuctions of the vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Progress in Neurobiology* **22**: 103-129.
- Said, S. I., Mutt, V.**, 1970, "Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine". *Nature, London* **225**: 863-864.
- Said, S. I.**, 1982. *Advance in Peptide Hormone Research*. Raven. Press., New York.
- Sanchez, J.G, Speare,D.J, Johnson, G. J. ,** 1997. Morphometric and histochemical assessment of the branchial tissue response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), associated with chloramine-T treatment. *Journal of Fish Diseases* **20**: 375-381.
- Sangsuriya, P., Rojtinnakorn, J, Senapin, S., Flegel, T.W.**, 2007. Characterization and tissue expression of apoptosis-related ALG-2 interacting protein Alix/AIP1 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 23 485- 492.
- Schoor, W.P., Plumb, J. A.**, 1994. Induction of nitric oxide syntase in channel catfish, *Ictalurus punctatus* by *Edwarsiella ictaluri*". *Disease of Acquatic Organism* **19**: 153-155.
- Sollid, J., Rissanen, E., . Tranberg, H. K, Thorstensen, T., Vuori, K. A. M., Nikinma M.**,
- Nilsson, G. E.**, 2006. HIF-1 α and iNOS levels in crucian carp gills during hypoxia-induced Transformation. *Journal of Comparative Physiology B*.**176**: 359–369

- Spehar, R.L.**, 1976. Cadmium and zinc toxicity to flagfish, *Jordanella floridae*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **33**: 1939–1945.
- Sprague, J. B.**, 1969. Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water research* **3**:793-821.
- Sundin, L. & Nilsson, S.**, 1992. Arterio-venous branchial blood flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *The Journal of Experimental Biology*. **165**: 73-84
- Szebedinsky, C., McGeer, J. C., McDonald, D. G. and Wood, C. M.**,2001. Effects of chronic Cd exposure via the diet or water on internal organspecific distribution and subsequent gill Cd uptake kinetics in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 597- 607
- Talarico, E., Perrotta, I., Brunelli, E., Tripepi, S.** ,2003 Modificazioni ultrastrutturali dell'apparato branchiale di *Thalassoma pavo* (Labridae) in seguito ad esposizione a petrolio greggio."Contributo a 64° Congresso U.Z.I., Riassunti, 136-137, Varese, 21-25 settembre.
- Tripepi, S., Mauceri, A., Brunelli, E., Corapi, B., Limetti, F., Fasulo, S.** 2006. Tolleranza al Cadmio in *Thalassoma pavo*: valutazione di alcuni parametri morfo-funzionali dell'apparato branchiale. 67° Congresso Nazionale UZI. Napoli 12-15 Settembre 2006.
- Yang, B. & Verkman, A. S.**, 1997. Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 16140-16146.

- Yasui, M., Hazama, A., Kwon, T. H., Nielsen, S., Guggino, W. B., Agre, P.,** 1999a. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* **402**, 184-187.
- Yasui, M., Kwon, T. H., Knepper, M. A., Nielsen, S. and Agre, P.** 1999b. Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 5808-5813
- Yılmaz, M., Gül, A., Karaköse, E.,** 2004. Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere* **56** (4):375-380
- USEPA. 2001.** Update of ambient water quality criteria for cadmium. EPA-822-R-01-001. United States Environmental Protection Agency (USEPA). Washington, DC, USA.
- Watanabe ,S., Kaneko, T., Aida.,K.,** 2005. Aquaporin-3 expressed in the basolateral membrane of gill chloride cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* adapted to freshwater and seawater *The Journal of Experimental Biology* **208**: 2673-2682
- Virabhadrachari, V.,**1961. Structural changes in the gills, intestine and kidney of *Etroplus maculatus* (Teleostei) adapted to different salinities. *Journal Microscopic Science* **102**:361-369.
- Wyllie AH, Kerr J, Currie AR.,** 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* **68**:251e305.
- WHO. 1992.** Cadmium—Environmental aspects. Environmental Health Criteria No. 135. World Health Organisation (WHO), The International Programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva.

- Wong, C. K.C. & Wong, M.H.**, 2000. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquatic Toxicology* **48**: 517–527.
- Wu, S. M., Chou Y. Y., Deng A. N.**, 2002. Effects of exogenous cortisol and progesterone on metallothionein expression and tolerance to waterborne cadmium in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Zoological Studies*, **41(1)**, 111-118.
- Zaccone, G., Fasulo, S., Lo Cascio, P., Licata, A.**, 1986. Effect of sublethal concentrations of zwitterionic detergent on oxidative enzymes in the gills of the fresh catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Archives de Biologie (Bruxelles)* **97**: 93-105.
- Zhang,L., Wang, W.X.**, 2005. Effects of Zn pre-exposure on Cd and Zn bioaccumulation and metallothionein levels in two species of marine fish. *Aquatic Toxicology* **73**: 353–369.