



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

TESI DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

**Contenuto di metallotioneine nel teleosteo antartico *Trematomus eulepidotus*
esposto a rame**

**Metallothioneins content in the antartich teleost *Trematomus eulepidotus*
exposed to copper**

Relatore: Prof. Paola Irato

Laureando/a: Riccardo Trapasso

1224693

Anno Accademico 2021/2022

Indice

1. Introduzione.....	3
1.1 Continente Antartico	3
1.2 Inquinamento delle acque Antartiche	4
1.3 Inquinamento dei metalli	4
1.3.1 Rame: effetti in relazione alla concentrazione.....	5
1.3.2 Impatto delle specie metalliche nel continente Antartico	5
1.4 Inquinamento nelle specie marine antartiche	6
1.4.1 <i>Trematomus eulepidotus</i>	7
1.5 Le Metallotioneine.....	8
1.5.1 Metallotioneine come biomarcatori.....	9
2. Scopo della Tesi	10
3. Materiali e Metodi	11
3.1 Campioni utilizzati per l'analisi	11
3.2 Trattamento dei campioni.....	11
3.3 Dosaggio Metallotioneine	11
3.4 Determinazione del Contenuto di Proteine Totali	13
4. Risultati.....	15
4.1 Contenuto metallotioneine rispetto alle proteine totali.....	15
4.2 Indagini statistiche.....	15
4.2.1 test di Student	15
4.2.2 Analisi varianza ad una via.....	16
5. Discussione e Conclusioni.....	18
6. Bibliografia.....	22

1. Introduzione

1.1 Continente Antartico

Il continente Antartico (Figura 1) si estende per 13.8 milioni di km² (Danovaro, 2019) la cui area è coperta perennemente per il 99,7% da ghiaccio e neve (Convey *et al*, 2008). È il quinto continente per estensione in termini di superficie e il suo volume rappresenta l'80% dell'acqua dolce totale della Terra. È presente nella sua totalità oltre il 60° parallelo di latitudine sud, ed è bagnato dagli oceani Atlantico, Pacifico e Indiano, le cui acque rappresentano un'area oceanica continua, impropriamente chiamata Oceano Meridionale o Oceano Antartico (Danovaro, 2019). Questo continente rappresenta il più grande deserto incontaminato del globo, rimasto isolato dal resto del mondo grazie alla presenza di circolazioni atmosferiche e oceaniche (Hwengwere *et al*, 2022).

Tra queste ultime, la principale, che circonda l'Antartide prende il nome di Corrente Circumpolare Antartica (ACC). La potente ACC collega gli oceani Pacifico, Atlantico e Indiano; pertanto, questa corrente svolge un ruolo essenziale nel trasporto globale di biomassa, nutrienti e inquinanti (Inoue *et al*, 2022). È presente in maniera costante ed è in grado di isolare fisicamente il continente, le cui acque presentano così caratteristiche termolinee differenti da quelle circostanti. Questo porta ad un isolamento totale dei popolamenti in tutti i comparti, poiché la presenza della ACC ne impedisce la migrazione (Danovaro, 2019). La caratteristica principale dell'acqua marina antartica è la sua bassa temperatura costante di circa -1,8 °C, la quale comporta un'elevata concentrazione di gas disciolti, in particolare di O₂. Questa condizione può però comportare un aumento del tasso di formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), molecole che normalmente vengono sintetizzate all'interno delle cellule dalla parziale riduzione di O₂ (Santovito *et al*, 2012).



Figura 1 - Dimensione e posizionamento dell'Antartide.

1.2 Inquinamento delle acque Antartiche

Per la sua collocazione geografica, l'Antartide è un ambiente tendenzialmente meno contaminato rispetto agli altri. Nonostante ciò, l'aumento delle attività antropiche ha colpito anche gli ecosistemi terrestri e acquatici più remoti, attraverso lo scarico di rifiuti solidi e liquidi, il trasporto marittimo, le fuoriuscite accidentali di petrolio e la combustione di carburante (Motta *et al*, 2021). Oltre alle fonti locali di contaminazione, gli inquinanti sono entrati nell'ecosistema antartico anche attraverso il trasporto atmosferico e la deposizione a lungo raggio (Marina-Montes *et al*, 2020). È stato stabilito che vari contaminanti antropogenici hanno già raggiunto tutte le località del mondo, comprese anche le più incontaminate come le regioni polari (Materić *et al*, 2022). Tra i vari inquinanti antropogenici, quelli a base metallica rappresentano una considerevole criticità, principalmente a causa della loro persistenza nell'ambiente. Questo determina squilibri nell'ecosistema, che possono causare tossicità e problematiche per il biota, con conseguenze dirette sui processi biologici (Buono *et al*, 2018).

1.3 Inquinamento dei metalli

Un'ampia varietà di inquinanti antropogenici, comprese specie metalliche altamente tossiche, disturba l'ambiente marino (Motta *et al*, 2021). Pertanto, è fondamentale stabilire criteri precisi per la qualità dell'acqua del sito al fine di comprendere la tossicologia ambientale di questi composti. Negli ambienti naturali, gli organismi acquatici sono costantemente esposti a una varietà di metalli attraverso la dieta e l'approvvigionamento idrico. Alcuni dei metalli in traccia, come il Rame (Cu), il Ferro (Fe) e lo Zinco (Zn), sono essenziali per la salute della maggior parte degli organismi in quanto sono componenti integrali di enzimi e altri complessi molecolari.

Le concentrazioni intracellulari di questi metalli sono strettamente regolate da complessi meccanismi di assorbimento/escrezione. Altri metalli, come il Cadmio (Cd) e il Piombo (Pb), non sono essenziali e generalmente sono tossici per gli organismi viventi anche a basse concentrazioni di esposizione e tendono ad accumularsi nell'organismo (Komjarova e Bury, 2014.). Una volta assorbiti dalla dieta, dalla pelle e/o dalle branchie (Komjarova e Bury, 2014), i metalli si diffondono nei tessuti interferendo sia con gli organi bersaglio convenzionali come reni e fegato (Avallone *et al*, 2017) che con quelli non convenzionali come, ad esempio i muscoli (Hernandez *et al*, 2006).

Gli effetti tossici sono esercitati attraverso molteplici meccanismi, ma principalmente attraverso una marcata attività perossidante (Craig *et al*, 2007; Motta *et al*, 2021) con conseguente danno al metabolismo proteico e lipidico e all'integrità del DNA (Nawaz *et al*, 2005). La tossicità dei metalli è estesa anche agli organi riproduttivi e allo sviluppo embrionale e larvale (Henson e Chedrese, 2004).

L'impatto negativo dovuto all'aumento delle concentrazioni delle specie metalliche nell'ambiente è ulteriormente accresciuto dalla loro scarsa degradabilità, che può provocare bioaccumulo e biomagnificazione lungo gli anelli successivi della catena trofica. Infatti, negli ecosistemi acquatici, i metalli in traccia possono essere mobilitati sia dai sedimenti che dall'acqua e trasferiti attraverso la rete alimentare acquatica a macroinvertebrati, pesci, animali piscivori e, infine, all'uomo (Ciesielski *et al*, 2010).

1.3.1 Rame: effetti in relazione alla concentrazione

Tra le specie metalliche presenti nell'ambiente marino, i composti a base di Cu sono tra i più presenti (Brooks e Waldock, 2009). A causa dei comuni processi di rilascio naturali e antropogenici il Cu spesso si trova a concentrazioni elevate nelle acque naturali contaminate (Driessnack *et al*, 2016). In particolare, le acque marine antartiche sono caratterizzate da una presenza naturale di elevati livelli di Cu, con una concentrazione di circa 150 ng/L (Motta *et al*, 2021).

Sebbene la concentrazione di nutrienti essenziali nei pesci sia bassa, svolgono un ruolo molto importante nella nutrizione, nella fisiologia e sono anche componenti importanti della struttura cellulare e dei composti enzimatici (Zhu *et al*, 2021). Sono anche componenti importanti delle metalloproteine (ad esempio, Fe nell'emoglobina, Cu nell'emocianina) (Zhu *et al*, 2021).

I metalli traccia essenziali, come il Cu, diventano però tossici a concentrazioni superiori a quelle fisiologiche (Santovito *et al*, 2012). Per esempio, l'esposizione cronica o subletale a concentrazioni elevate di Cu nei pesci provoca il suo accumulo nei tessuti bersaglio, come branchie, fegato e reni (Handy, 2003), insieme ad un'ampia gamma di effetti tossicologici, tra cui per esempio la compromissione di crescita e sopravvivenza, interruzione dell'omeostasi ionica (Na^+ e Cl^-), diminuzione del metabolismo e dell'escrezione di azoto, riduzione delle prestazioni di nuoto, inibizione della risposta allo stress e stress ossidativo (Driessnack *et al*, 2016).

Infatti, il Cu è un metallo redox attivo e può fungere da catalizzatore facilitando la conversione dell'anione superossido e del perossido di idrogeno in radicale idrossile, il più reattivo tra le ROS e principale responsabile dello "stress ossidativo" (Santovito *et al*, 2012).

1.3.2 Impatto delle specie metalliche nel continente Antartico

Relativamente pochi studi hanno analizzato l'impatto dell'inquinamento da metalli nelle zone antartiche, nonostante la crescente evidenza che la contaminazione da tracce di metalli negli organismi dell'Oceano Antartico potrebbe essere maggiore di quella in altri oceani del mondo (Bargagli, 2000). Inoltre, le condizioni ambientali all'interno del continente antartico e nei suoi

intorni, hanno prodotto un ecosistema unico, il che implica che le osservazioni ottenute dalle regioni più temperate potrebbero non essere comparabili (Roche *et al*, 2019). L'Antartide è per questo, infatti, considerata un ottimo laboratorio naturale di ricerca (Motta *et al*, 2021).

L'accumulo nel ghiaccio, l'assorbimento da parte delle alghe ghiacciate e le fioriture estive di fitoplancton influenzano la presenza e la disponibilità di metalli traccia disciolti nelle acque superficiali dell'Antartide (Beltcheva *et al*, 2010) e nei sedimenti (Deheyn *et al*, 2005), così come i fattori ambientali naturali come il vulcanismo locale e la risalita (Bustamante *et al*, 2003).

Sono stati condotti diversi studi per valutare le contaminazioni da metalli in campioni ambientali abiotici/biotici prelevati dall'Antartide; nonostante ciò, esistono però studi limitati sulle concentrazioni di metalli nell'acqua di mare/oceano (Gösterişli *et al*, 2022).

La valutazione dell'entità dell'inquinamento in Antartide è di grande importanza per l'adozione di ulteriori precauzioni e per un'efficace regolamentazione dell'Antartide (Gösterişli *et al*, 2022), infatti essa, come cita l'articolo 2 del Protocollo di Madrid (Meloni e Zucchelli, 2001), è stata dedicata alla scienza e alla pace. Questo protocollo presenta inoltre 6 allegati relativi alla protezione ambientale dell'Antartide riguardante la conservazione della fauna e della flora, la gestione dei rifiuti, la protezione dell'area e la prevenzione dell'inquinamento marino (Padeiro *et al*, 2016).

1.4 Inquinamento nelle specie marine antartiche

La fauna ittica dell'Oceano Antartico è tassonomicamente limitata, altamente endemica e fortemente dominata da un unico gruppo tassonomico a crescita lenta e longevo, ovvero i pesci del sottordine Notothenioidei (Eastman, 2004).

Sebbene ci siano stati studi precedenti sulla contaminazione da metalli traccia nei pesci nototenioidei, questi hanno avuto luogo principalmente in regioni collegate alla pesca commerciale intensiva di acque profonde (Bustamante *et al*, 2003) o in siti direttamente interessati dalle attività antropogeniche (Sures e Reimann, 2003). Al contrario, sono disponibili relativamente poche informazioni sulla contaminazione da metalli traccia nei pesci delle acque costiere antartiche nonostante la loro importanza come zone di alimentazione e di riproduzione (Roche *et al*, 2019).

Le nostre attuali conoscenze sulle implicazioni tossicologiche dell'esposizione ai metalli nei pesci si basano principalmente su studi condotti con singoli metalli, anche se nel mondo reale gli organismi che abitano ambienti naturali contaminati da metalli sono quasi sempre esposti ai metalli in miscele (Driessnack *et al*, 2016).

1.4.1 *Trematomus eulepidotus*

Trematomus eulepidotus (Figura 2) è uno dei pesci endemici (Eastman e Hubold, 2004) ed epibentonici più comuni nelle acque della piattaforma continentale dell'Alto Antartide (La Mesa *et al.*, 2008). È un pesce appartenente al subordine dei Nototenioidei, teleostei di piccole dimensioni che si sono specializzati per la sopravvivenza alle basse temperature (Danovaro, 2019).

Essi si sono diversificati da un singolo antenato comune circa 22 miliardi di anni fa. Sono presenti tra le 120 e le 140 specie e oggi rappresentano circa il 90% della biomassa ittica della piattaforma continentale dell'Antartide (Daane e Detrich III, 2022). Le specie più abbondanti sono *Trematomus scotti* (29,7%), *Batidraco marri* (10,4%), *Trematomus eulepidotus* (8,7%) e *Dolloidraco longedorsalis* (6,1%) (Eastman e Hubold, 2004). Sebbene la fauna ittica antartica sia solitamente povera in termini di specie, questo non vale per il gruppo dei Nototenioidei: di 174 specie bentoniche o demersali conosciute nell'Oceano Meridionale, il 55% sono Nototenioidei. Il genere *Trematomus* (sottordine Notothenioidei) è considerato principalmente un gruppo ad alta latitudine a causa della sua abbondanza in quelle zone (Fields e Devries, 2015).



Figura 2- *Trematomus eulepidotus*

Durante gli eventi geologici di glaciazione e raffreddamento, è probabile che questa specie abbia subito una pressione selettiva tremenda per evitare le condizioni progressivamente più fredde. Il loro ampio successo ecologico è legato prettamente alla sopravvivenza, garantita dalla presenza di speciali glicoproteine antigelo trasportate dal sangue (AFGPs) (Danovaro, 2019).

Questi alti livelli di AFGPs nel sangue evitano il congelamento, permettendo così la sopravvivenza della fauna ittica endemica (Praebel *et al.*, 2009). Le AFGPs ostacolano il congelamento dei fluidi corporei nei teleostei, il cui punto di equilibrio di congelamento (-0.7 a -1 °C) è significativamente

superiore a quello dell'acqua di mare ($-1.9\text{ }^{\circ}\text{C}$), assorbendo i piccoli cristalli di ghiaccio nel corpo e inibendo il loro sviluppo. Legandosi alla superficie di un cristallo di ghiaccio, le AFGPs prevengono l'aggiunta di molecole di acqua al cristallo e quindi la futura crescita dello stesso (Danovaro, 2019). Se non fosse per le AFGPs, il ghiaccio ambientale che entra nel pesce attraverso l'ingestione, le lesioni della pelle o dalle branchie si propagherebbe con conseguente morte per congelamento (Fields e DeVries, 2015).

In concomitanza con l'acquisizione della tolleranza al freddo estremo, i Nototenioidi hanno sviluppato un'elevata temperatura fisiologia stenotermica, con molte specie soggette a morte a temperature solo di pochi gradi al di sopra della loro temperatura di habitat (Bilyk e DeVries, 2011). Alla luce quindi, del riscaldamento globale, che risulta inoltre più rapido alle alte latitudini, è imperativo analizzare come i Nototenioidi risponderanno all'aumento delle temperature oceaniche nei prossimi anni (Beers e Jayasundar, 2015). Un'ulteriore peculiarità di questi organismi antartici, è la sintesi di un importante gruppo di proteine coinvolto nella protezione dagli effetti nocivi di metalli pesanti (Capasso *et al*, 2006).

1.5 Le Metallotioneine

Questo gruppo di proteine prende il nome di metallotioneine (MT). Sono proteine non enzimatiche che legano i metalli; presentano un basso peso molecolare (6–1,9 kDa) e sono caratterizzate da un contenuto insolitamente alto di cisteina (30%) (Stillman, 1995). Il legame selettivo delle MT con altri metalli pesanti essenziali e non essenziali è dovuto proprio agli attributi stechiometrici dei gruppi tiolici nei loro residui di cisteina (Samuel *et al*, 2021).

Possono essere indotte nei tessuti da vari stimoli, in particolare dalla presenza di metalli pesanti o diverse condizioni di stress. È ampiamente riconosciuto che le MT svolgano un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi dei metalli essenziali, nella disintossicazione dei metalli pesanti, riducendone così la quantità di metallo libero nei tessuti e nel fornendo protezione contro lo stress ossidativo (Lin, 2017). Inoltre, svolgono una funzione di difesa contro le radiazioni ionizzanti (Lin *et al*, 2015).

L'espressione tissutale e l'accumulo di MT nei pesci si verificano principalmente nel fegato, nei reni e nelle branchie (Santovito *et al*, 2012). Nei pesci marini, le MT sono indotte da metalli come Cu, Cd, Zn, argento (Ag) e mercurio (Hg).

Ogni mole di MT viene saturata da una quantità di moli di metallo, le quali sono dettate da specifici rapporti stechiometrici. Ad esempio, 1 mole di MT può legare 12 mol di Cu o 7 mol di Cd oppure

16 di Ag. (Samuel *et al*, 2021). Sono state identificate più isoforme di MT e osservate anche variazioni nella loro massa molecolare, suggerendo la presenza di forme monomeriche e dimeriche (Amiard *et al*, 2006).

1.5.1 Metallotioneine come biomarcatori

In molte specie (pesci, anellidi, molluschi, crostacei, ...) è stata dimostrata l'induzione della sintesi di metallotioneina da parte di contaminanti metallici (Cu, Ag, Cd, Hg, ...), suggerendo il potenziale utilizzo delle concentrazioni di MT negli organismi come biomarcatori di esposizione. Le MT fanno ora parte di una suite di base di biomarcatori riconosciuti a livello europeo ed esaminati nell'ambito della garanzia e della qualità degli effetti biologici nei programmi di monitoraggio (Amiard *et al*, 2006). Tuttavia, se le MT devono essere considerate potenziali biomarcatori nei programmi di monitoraggio, occorre ricordare che il campionamento dei pesci, sembra spesso riscontrare delle difficoltà in particolare per quanto riguarda diversi fattori, che possono influenzare sull'inducibilità delle MT, come la presenza/assenza, la selezione di dimensioni, l'età o le categorie di peso (Amiard *et al*, 2006).

2. Scopo della Tesi

Negli ultimi anni risulta essere sempre più di fondamentale importanza l'analisi degli effetti sugli ecosistemi dovuti ai cambiamenti globali.

Le acque marine antartiche sono caratterizzate da una presenza naturale di elevati livelli di Cu, con una concentrazione di circa 150 ng/L, dovuta a fattori come l'accumulo nel ghiaccio, l'assorbimento da parte delle alghe ghiacciate, le fioriture estive di fitoplancton, il vulcanismo locale e la risalita (Bustamante *et al*, 2003), influenzando la presenza e la disponibilità di metalli traccia disciolti nelle acque superficiali dell'Antartide (Beltcheva *et al*, 2010) e nei sedimenti (Deheyn *et al*, 2005). Gli organismi marini che popolano queste acque sono quindi costantemente sottoposti a questi metalli, i quali possono bioconcentrarsi negli animali che occupano le posizioni di vertice della rete trofica, come i pesci.

Per mitigare questa elevata presenza di Cu nelle acque antartiche, le specie endemiche presentano adattamenti ecofisiologici, come la presenza di speciali proteine MT che svolgono un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi dei metalli essenziali, nella disintossicazione dei metalli pesanti, riducendone così la quantità di metallo libero nei tessuti e nel fornendo protezione contro lo stress ossidativo (Lin, 2017).

Lo scopo di questo lavoro, quindi, è volto a quantificare il contenuto di MT in uno specifico organismo endemico dell'Antartide, il *Trematomus eulepidotus*, un pesce, appartenente al sottordine dei Nototenioidi, esposto ad una concentrazione specifica di Cu (sottoforma di CuCl_2) pari a 100 $\mu\text{g/l}$. Poiché la sintesi di MT può essere organo specifica, si sono presi in considerazione 4 diversi organi quali fegato, gonadi, cervello e muscolo con lo scopo di valutarne il contenuto e di determinare risposte tessuto-specifiche che possano essere correlate alla fisiologia di questi animali. Essendo le MT riconosciute a livello europeo come bioindicatori, la loro sintesi a livello cellulare nei diversi organi risulta utile nell'osservare che relazione possa sussistere con la concentrazione di inquinante in esame.

3. Materiali e Metodi

3.1 Campioni utilizzati per l'analisi

I campioni di *Trematomus eulepidotus* utilizzati provengono da campionamenti effettuati nei pressi della stazione italiana Mario Zucchelli nel Mare di Ross (74° 42'S, 164° 7'E), nel corso della XXI Spedizione Italiana in Antartide (2005-2006). Gli organismi sono stati stabulati in vasche termostate a -2°C. Sono stati allestiti due gruppi sperimentali, uno di controllo e uno di animali esposti a 100 µg/l di Cu (aggiunto come CuCl₂) per dieci giorni. Gli esemplari sono stati poi sacrificati per l'isolamento di organi e tessuti, i quali sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e stoccati a -80°C. Per questo studio, sono stati presi in considerazione quattro organi principali quali fegato, muscoli, gonadi e cervello. Per tutti e 4 gli organi sono stati esaminati 5 campioni per gruppo sperimentale.

3.2 Trattamento dei campioni

I campioni sono stati precedentemente scongelati, e mantenuti in una bacinella con del ghiaccio per prevenire lo shock termico. Successivamente i campioni sono stati pesati con l'aiuto di una bilancia tecnica. A ogni singolo campione è stato poi aggiunto un volume di tampone (Tris HCl 20 mM a pH 7,5, al quale per ogni 20 mL venivano aggiunti 60 µL di Leupeptina, 30 µL di PMSF e 2 µL di β-mercapto etanolo) pari a quattro volte il rispettivo peso.

I campioni sono stati omogeneizzati attraverso l'utilizzo del Polytron e centrifugati (con centrifuga Beckman J2-21) per 1 ora a 20.000/21.000 rpm a 4°C. Il surnatante è stato prelevato e trasferito in provette Eppendorf, le quali sono state poi conservate in freezer a -80°C, fino al loro utilizzo.

3.3 Dosaggio Metallotioneine

Il dosaggio delle metallotioneine è stato effettuato tramite la metodica di saturazione dell'argento riportata in letteratura (Scheuhammer e Cherian, 1986).

Sono state allestite una serie di provette con fondo conico contenenti i campioni e i bianchi in duplicato. All'interno di queste provette è stato inserito una quantità di campione (trattato secondo il metodo descritto nel paragrafo 3.2) pari a 100 µL (in alcune provette la quantità è stata ridotta a causa della poca quantità di campione), una quantità di glicina fino a raggiungere un volume finale di 800 µL, e infine 500 µL di Ag 20 ppm, ottenuto dissolvendo AgNO₃ in acqua deionizzata o diluendo una soluzione Ag⁺ standard (1000ppm). Per quanto riguarda i bianchi, al posto del campione, è stato

inserito un volume uguale di soluzione tampone. Le provette sono state sottoposte ad agitazione con il Vortex e lasciate sedimentare per dieci minuti. Sono stati poi aggiunti 100 μL di emoglobina e di nuovo agitate. Dopodiché le provette venivano immerse in un bagno caldo per due minuti, trascorsi i quali venivano poste in una centrifuga (modello ALC 4237R) per 10 minuti a 2500 rpm. Il processo è stato ripetuto per altre 2 volte, aggiungendo ad ogni ciclo 100 μL di emoglobina. Il surnatante veniva prelevato e trasferito in provette Eppendorf, le quali venivano poste in una centrifuga (modello 5415D) a 18.000 rpm per mezz'ora all'interno di una stanza a 5°C.

Il metodo di saturazione dell'argento (Scheuhammer e Cherian, 1986), si basa sulla maggiore affinità dell'Ag rispetto al Cu verso le MT. Inoltre, gli ioni Ag^+ , sono in grado di legarsi all'emolisato dei globuli rossi (emoglobina), inoculato nei diversi cicli all'interno delle provette campione. A seguito del riscaldamento della soluzione (100 °C), l'emolisato e altre proteine ad alto peso molecolare legate all'Ag precipitano lasciando così in soluzione il complesso MT-Ag, più stabile termicamente (Bienengraber *et.al*, 1995).

Il surnatante è quindi stato analizzato per calcolare la concentrazione di MT nei diversi campioni attraverso lo spettrofotometro di massa ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy), assumendo un rapporto molare Ag/MT pari a 17. Questo implica che ogni mole di MT è saturata da 17 moli di Ag^+ . La concentrazione di MT può essere quindi ricavata dalla seguente formula (eq. 1):

(eq. 1)

$$\text{MT}(\mu\text{g}/\text{mL})_x = \frac{(A - B) * 3,55 * V_{\text{Finale}}}{V_{\text{Campione}}}$$

Dove:

A: Concentrazione media di Ag nel campione, espressa in $\mu\text{g}/\text{mL}$.

B: Concentrazione media di Ag nei bianchi, espressa in $\mu\text{g}/\text{mL}$.

V_{Finale} : Volume finale nella provetta (1,6 mL)

V_{Campione} : Aliquota di campione utilizzata nel dosaggio

3.4 Determinazione del Contenuto di Proteine Totali

Preparazione reattivi:

- Soluzione A (per 1 L): 4 grammi di NaOH e 20 grammi di Na₂CO₃ portate a volume con acqua MilliQ;
- Soluzione B (per 100 mL): 1 g di sodio citrato (Na₃C₆H₅O₇) e 0.5 g di CuSO₄;
- Soluzione C: 25 mL di Soluzione A e 0.5 mL di Soluzione B;
- Soluzione D: 1.36 mL di acqua e 1 mL di Folin.

La determinazione del contenuto di proteine totali è stata svolta tramite il metodo di Lowry (Lowry *et al*, 1951), il quale si basa sull'utilizzo del reagente di Folin (Peterson, 1979). Le proteine, a contatto con il reagente di Folin, portano alla formazione di una o più specie ridotte che presentano una tipica colorazione bluastra (Peterson, 1979).

Il Cu, aggiunto sottoforma di CuSO₄, interagisce elettronicamente con la struttura dei peptidi, facilitando in particolare il trasferimento di elettroni al reagente di Folin, aumentando così la sensibilità alle proteine (Peterson, 1979). Per la determinazione del contenuto di proteine totali, è stata costruita una retta di taratura utilizzando concentrazioni via via crescenti di albumina, utilizzata come proteina di riferimento. La retta di taratura è stata costruita utilizzando soluzioni acquose contenenti 0, 10, 20, 40, 50 e 60 µL di albumina. Acqua milliQ è stata aggiunta fino ad arrivare ad un volume finale di 200 µL.

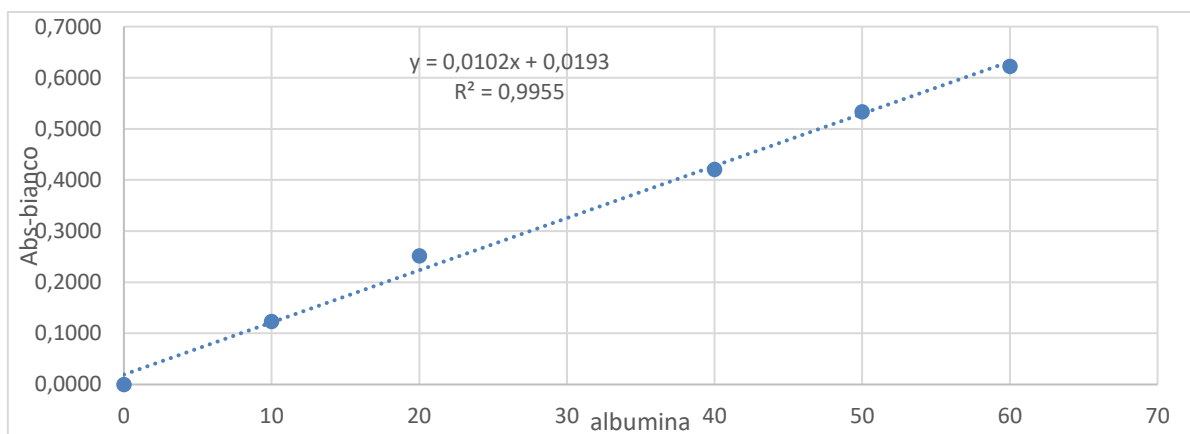


Figura 3- retta di taratura effettuata con soluzioni di albumina a concentrazioni crescenti.

Dalle soluzioni contenenti i campioni precedentemente trattati (vedi paragrafo 3.2) sono stati prelevati 3 μL . A ogni campione è stato aggiunto 1 mL di soluzione C e 100 μL di soluzione D. I campioni sono stati lasciati riposare al buio a temperatura ambiente per 30 minuti.

I campioni sono stati successivamente analizzati attraverso lo spettrofotometro (modello UV-1800PC) a una lunghezza d'onda pari a 750 nm. È stato possibile quindi, calcolare la concentrazione delle proteine totali all'interno dei campioni, utilizzando l'equazione della retta di taratura costruita con aliquote crescenti di albumina.

4. Risultati

4.1 Contenuto metallotioneine rispetto alle proteine totali

Ottenute le concentrazioni di MT, con il metodo di saturazione dell'Ag e le concentrazioni di proteine totali attraverso il metodo di Lowry, si definiscono ora i μg di MT su mg di proteine totali attraverso un semplice rapporto (eq. 2):

(eq.2)

$$\mu\text{g MT} / \text{mg Prot. tot.} = \frac{\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ MT}}{\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ Prot. Tot.}}$$

Si riportano quindi le medie e le deviazioni standard di tale rapporto per i 2 gruppi sperimentali (controllo C ed esposizione a Cu), per ogni singolo organo (Tabella 1).

Tabella 1. Medie e deviazioni standard della concentrazione di MT rispetto alle proteine totali nella specie *Trematomus eulepidotus* nei due gruppi sperimentali per i vari organi.

ORGANI	C	Cu
MUSCOLO	0,492 \pm 0,180	0,363 \pm 0,116
GONADI	2,421 \pm 0,243	1,989 \pm 0,345
FEGATO	1,501 \pm 0,614	1,494 \pm 0,562
CERVELLO	1,812 \pm 0,441	1,748 \pm 0,333

4.2 Indagini statistiche

Le indagini statistiche sono state effettuate usando il programma Primer.exe. Le indagini utilizzate sono state di due tipi.

4.2.1 test di Student

Il test di Student, noto anche come t-test, è uno strumento che può essere utilizzato per determinare se sussista una differenza significativa nelle misure appaiate. Questo metodo si basa sulla determinazione del valore p (o p-value), un indicatore di significatività di test statistici. Il valore p definisce la probabilità di ottenere uno specifico insieme di osservazioni nel caso in cui l'ipotesi nulla fosse vera, cioè che quanto sostenuto sia corretto con un piccolo margine di errore.

In questo caso l'ipotesi nulla è che non ci sia differenza di concentrazione tra i 2 gruppi sperimentali C e Cu nello stesso organo. Se il valore p è:

- $\leq 0,05$: si rifiuta l'ipotesi nulla
- $> 0,05$: non si hanno sufficienti prove per rifiutare ipotesi nulla

utilizzando questo test per il confronto tra C e trattati a Cu, è emerso che non c'è alcuna differenza statistica tra i 2 gruppi sperimentali, anzi il contenuto di MT è leggermente inferiore nel gruppo trattato a Cu rispetto al C, seppure non in modo significativo.

4.2.2 Analisi varianza ad una via

È stata utilizzata l'analisi della varianza ad una via per il confronto tra più di due campioni. Se questa risultava avere un valore di $p < 0,05$, seguiva il test di Student-Newman-Keuls, per individuare tra quali campioni era presente una differenza statisticamente significativa. Questa analisi è stata svolta all'interno del gruppo di C e del trattato a Cu, per valutare se fossero presenti differenze tra i diversi tessuti.

L'istogramma presente in figura 4 illustra graficamente i risultati ottenuti attraverso le indagini statistiche:

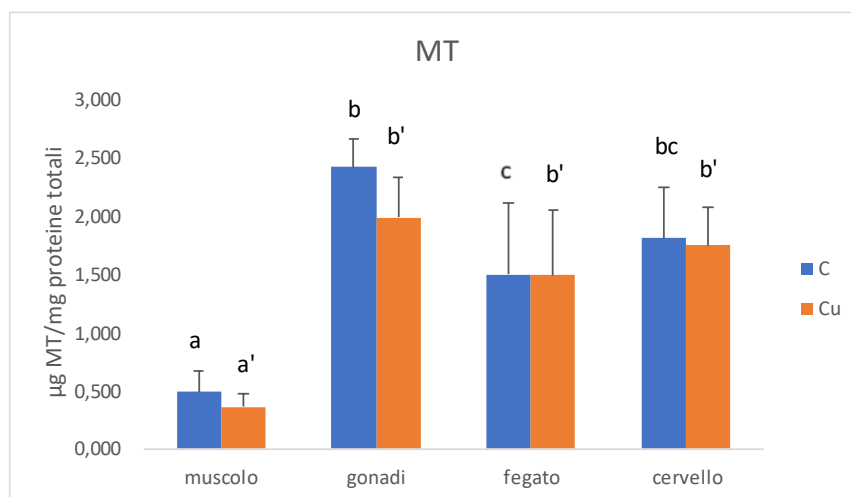


Figura 4 - contenuto di MT, espressa come $\mu\text{g}/\text{mg}$ di proteine totali, nei tessuti/organi dei due gruppi della specie *Trematomus eulepidotus*. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard, $n = 5$. Lettere differenti rappresentano differenze statisticamente significative tra i diversi tessuti all'interno dello stesso gruppo per $p < 0,05$.

Dopo aver appurato che il Cu non induceva un aumento della proteina, sono stati confrontati i diversi tessuti presi in esame. Sorprendentemente il contenuto maggiore di MT è presente nelle gonadi (ovviamente di entrambi i gruppi), a cui segue cervello, fegato ed infine muscolo. Il contenuto di MT nelle gonadi è circa cinque volte quello determinato nel muscolo.

5. Discussione e Conclusioni

Un'ampia varietà di inquinanti antropogenici, comprese specie metalliche altamente tossiche, disturba l'ambiente marino.

L'impatto negativo dovuto all'aumento delle concentrazioni delle specie metalliche nell'ambiente è ulteriormente accresciuto dalla loro scarsa degradabilità, che può provocare bioaccumulo e biomagnificazione lungo gli anelli successivi della catena trofica. Infatti, negli ecosistemi acquatici, i metalli traccia possono essere mobilitati sia dai sedimenti che dall'acqua e trasferiti attraverso la rete alimentare acquatica a macroinvertebrati, pesci, animali piscivori e, infine, all'uomo.

Risulta quindi estremamente interessante studiare le risposte fisiologiche che gli organismi, come il teleosteo antartico *Trematomus eulepidotus*, hanno sviluppato nel corso della loro evoluzione, che li ha visti segregati in questo ambiente sottoposto ad una costante pressione selettiva.

Gli organismi marini che popolano queste acque sono quindi costantemente sottoposti a questi metalli, poiché i sedimenti delle aree marine costiere antartiche, dove vivono queste specie, sono ricchi di Cu, come conseguenza di attività vulcaniche passate. Quindi questi animali sono naturalmente esposti a una condizione tale da favorire la presenza di questi metalli nei loro organi e tessuti. Al fine di rendere non tossica questa condizione, le specie endemiche presentano adattamenti ecofisiologici, come la presenza di speciali proteine, le MT, che svolgono un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi dei metalli essenziali, nella disintossicazione dei metalli non essenziali, riducendo così la quantità di metallo libero nei tessuti e fornendo protezione contro lo stress ossidativo.

Le analisi effettuate in questa tesi rientrano in una ricerca più ampia, che riguarda l'utilizzo delle MT come biomarcatori esaminati nell'ambito della garanzia e della qualità degli effetti biologici nei programmi di monitoraggio. In particolare, è stato determinato il contenuto di MT in alcuni organi del teleosteo antartico *Trematomus eulepidotus*, quali fegato, gonadi, muscolo e cervello in due gruppi sperimentali; uno di controllo e l'altro precedentemente trattato con Cu ad una concentrazione pari a 100 µg/l.

Attraverso l'utilizzo del test di Student si è evidenziato come tra i due gruppi sperimentali, all'interno dello stesso organo, non sussista alcuna differenza statisticamente significativa (Figura 4): il trattamento con Cu non induce alcun aumento nella sintesi delle MT.

I risultati ottenuti sono in parte suffragati da risultati precedentemente ottenuti sugli stessi organismi: né il muscolo né il fegato presentavano un accumulo di Cu in seguito al trattamento degli animali per dieci giorni alla dose di 100 µg/l di Cu (aggiunto come CuCl₂) (Benetollo, 2008) (Figura 5, 6).

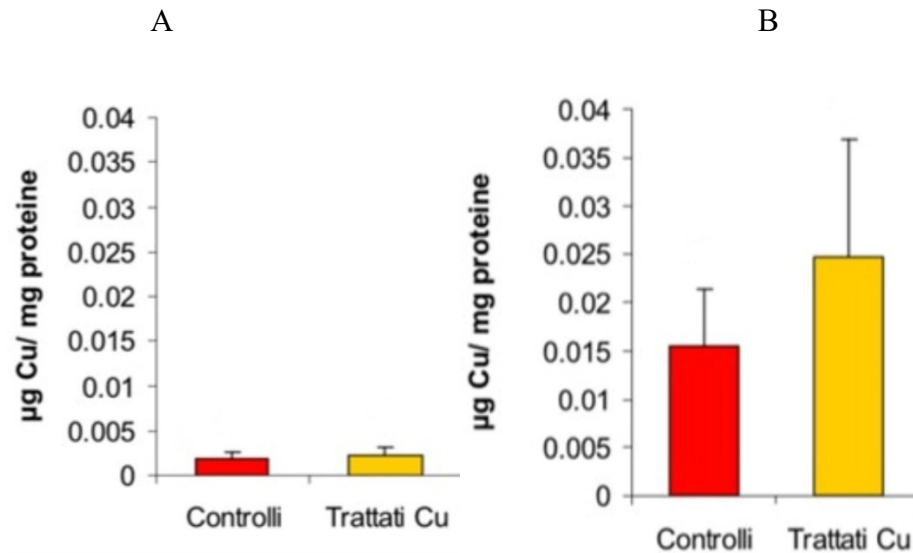


Figura 5- Concentrazioni di Cu nel muscolo (A) nella specie *Trematomus eulepidotus* nei diversi gruppi sperimentali. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard

Figura 6- Concentrazioni di Cu nel fegato (B) nella specie *Trematomus eulepidotus* nei diversi gruppi sperimentali. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard.

Inoltre, anche l'analisi dell'espressione genica delle 2 isoforme di MT (Carnera, 2021) non aveva evidenziato alcuna differenza tra C e Cu nel tessuto epatico, mentre nel muscolo il trattamento con Cu causava addirittura una riduzione del messaggero (Tabelle 2).

Tabella 2- Livelli di espressione del gene MT1 e MT2, la loro somma (unità arbitrarie), il contenuto di MT e il rapporto tra l'espressione del messaggero totale e il contenuto di MT nel muscolo e nel fegato nella specie *Trematomus eulepidotus*.

	MT1	MT2	MT1 + MT2	µg MT/mg prot.tot	(MT1 + MT2) / (µg MT/mg prot.tot)
MUSCOLO C	1522,36	2266,96	3789,32	0,49	7733,31
MUSCOLO Cu	419,19	346,05	765,24	0,36	2125,66
FEGATO C	21,19	77,50	98,69	1,5	65,79
FEGATO Cu	12,70	55,72	68,42	1,49	45,92

Per quanto riguarda il confronto tra i diversi tessuti, il fatto che si abbia determinato il minore contenuto di MT nel muscolo, sarebbe coerente con quanto descritto in letteratura, poiché il muscolo non rappresenta, nell'organismo, un organo attivo nell'accumulo di Cu (Liu *et al*, 2012). Tuttavia, questo dato non è in linea col lavoro precedente di Carnera, in cui era stata determinata l'espressione genica poiché l'espressione del messaggero totale (somma delle due isoforme MT1 e MT2) risulta essere maggiore nel muscolo piuttosto che nel fegato di quasi 40 volte per il gruppo C e di 11 per il Cu (Tabella 2). Mentre il contenuto di proteina tra muscolo e fegato risulta essere differente, di un valore medio tra i due gruppi, di circa 1/3 (Tabella 1).

Non sempre quindi, vi è una correlazione diretta tra espressione genica e sintesi di MT. Questo poiché è noto che organismi che si trovano a vivere in condizioni sfavorevoli, ma senza che sia presente uno stress acuto, hanno promosso un controllo post-trascrizionale dell'espressione genica delle proteine antistress, quali gli enzimi antiossidanti e le stesse metallotioneine, basato sugli *stress granules*, dense aggregazioni citoplasmatiche prive di membrana di dimensioni comprese tra 0,1 e 2,0 μm , composti da ribonucleoproteine messaggere, fattori di inizio della traduzione e proteine leganti l'mRNA, le quali agiscono bloccando la traduzione dei messaggeri ed aumentandone la loro stabilità (Anderson e Kedersha, 2009; Lavut e Raveh, 2012). Questa condizione permette una risposta estremamente rapida da parte dei tessuti nei confronti dell'improvviso manifestarsi di uno stress acuto, nel caso specifico con una maggiore biosintesi delle proteine antistress (Carnera, 2021).

Le concentrazioni di MT riscontrate nel fegato, risultano concordare con i valori dell'espressione genica (Tabella 2), a differenza del muscolo. Infatti, il rapporto tra espressione genica e concentrazione proteica nel fegato risulta essere di quasi 100 volte minore rispetto al medesimo rapporto nel muscolo. E' noto come il fegato sia un sito d'accumulo di xenobiotici dato il suo ruolo fondamentale nel metabolismo e nella disintossicazione delle sostanze tossiche (Moiseenko e Kudryavtseva, 2001). Risulta spesso usato inoltre, come organo target negli studi di biomonitoraggio.

La concentrazione più elevata di MT è stata però rilevata (Figura 4), in entrambi i gruppi sperimentali, nelle gonadi, con valori che differiscono da quelli del fegato di un valore percentuale pari a 61 per il gruppo sperimentale del controllo e di 33 con quello esposto a Cu.

Per quanto riguarda le gonadi (e il cervello) dati riguardanti l'espressione genica e l'accumulo tissutale di Cu risultano mancanti. Si ipotizza però, che elevate concentrazioni di MT a livello di gonadi, siano dovute per evitare effetti nocivi a livello riproduttivo, come un eccessivo aumento del costo energetico per affrontare le sfide fisiopatologiche (Driessnack *et al*, 2016). Prove crescenti hanno indicato che i metalli pesanti (tra cui Cu) hanno il potenziale per provocare effetti negativi

sulla differenziazione sessuale e sullo sviluppo delle ghiandole. Inoltre, potrebbero causare disturbi ormonali e interferire con l'espressione di enzimi chiave, che possono alterare concentrazioni di ormoni (Zhang *et al*, 2016) e causare così anomalie riproduttive nei pesci.

Per quanto riguarda il cervello, sono state anche qui osservate elevate concentrazioni di MT, la cui sintesi potrebbe essere riconducibile al loro effetto neuroprotettivo dal danno cerebrale, meccanico e indotto da neurotossine (Lin, 2017).

In conclusione, questo lavoro di tesi e i risultati così ottenuti, costituiscono una base di partenza per poter utilizzare l'espressione delle MT come biomarker nell'ambito della garanzia e della qualità degli effetti biologici nei programmi di monitoraggio, utilizzando questa specie endemica, come organismo bioindicatore nell'ambiente marino antartico.

6. Bibliografia

1. Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., & Rainbow, P. S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic toxicology*, 76(2), 160-202.
2. Anderson, P., Kedersha, N. (2009). Stress granules. *Curr. Biol.* 19, R397–R398.
3. Avallone, B., Cerciello, R., Creti, P., Pizzoleo, C., Scudiero, R., Tizzano, M., ... & Motta, C. M. (2017). Long term exposure to cadmium: Pathological effects on kidney tubules cells in *Sparus aurata* juveniles. *Aquatic Toxicology*, 193, 201-209.
4. Bargagli, R. (2000). Change and Increasing Human Impact. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 166, 166, 129-173.
5. Beers, J. M., & Jayasundara, N. (2015). Antarctic notothenioid fish: what are the future consequences of ‘losses’ and ‘gains’ acquired during long-term evolution at cold and stable temperatures?. *The Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1834-1845.44.
6. Beltcheva, M., Metcheva, R., Peneva, V., Marinova, M., Yankov, Y., & Chikova, V. (2011). Heavy metals in Antarctic notothenioid fish from South Bay, Livingston Island, South Shetlands (Antarctica). *Biological Trace Element Research*, 141(1), 150-158.
7. Benetollo, L. (2008). Caratterizzazione e studio dell'espressione di superossido dismutasi a rame e zinco e glutatione perossidasi nel teleosteo antartico *Trematomus eulepidotus*: tools biomolecolari per le biotecnologie ambientali. Tesi di Laurea Specialistica in Biotecnologie Industriali, Università degli Studi di Padova.
8. Bienengraber, M., Forderkunz, S., Klein, D., & Summer, K. H. (1995). Determination of Cu-containing metallothionein: comparison of Ag saturation assay, thiomolybdate assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytical biochemistry*, 228(1), 69-73.
9. Bilyk, K. T., & DeVries, A. L. (2011). Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(4), 382-390.
10. Brooks, S. J., & Waldock, M. (2009). Copper biocides in the marine environment. In *Ecotoxicology of antifouling biocides* (pp. 413-428). Springer, Tokyo.

11. Bueno, C., Kandratavicius, N., Venturini, N., Figueira, R. C. L., Pérez, L., Iglesias, K., & Brugnoli, E. (2018). An evaluation of trace metal concentration in terrestrial and aquatic environments near Artigas Antarctic Scientific Base (King George Island, Maritime Antarctica). *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(12), 1-11.
12. Bustamante, P., Bocher, P., Cherel, Y., Miramand, P., & Caurant, F. (2003). Distribution of trace elements in the tissues of benthic and pelagic fish from the Kerguelen Islands. *Science of the total environment*, 313(1-3), 25-39.
13. Capasso, C., Carginale, V., Riggio, M., Scudiero, R., Temussi, P. A., Trinchella, F., & Parisi, E. (2006). Metal detoxification and homeostasis in Antarctic Notothenioids. A comparative survey on evolution, expression and functional properties of fish and mammal metallothioneins. *Life in Extreme Environments*, 369-383.
14. Carnera, M. (2021). Espressione genica delle metallothioneine in *Trematomus eulepidotus* come risposta ad una variazione ambientale della concentrazione di ioni metallici. Tesi di Laurea magistrale in Biologia Marina, Università degli studi di Padova.
15. Ciesielski, T., Pastukhov, M. V., Szefer, P., & Jenssen, B. M. (2010). Bioaccumulation of mercury in the pelagic food chain of the Lake Baikal. *Chemosphere*, 78(11), 1378-1384.
16. Convey, P., Gibson, J. A., Hillenbrand, C. D., Hodgson, D. A., Pugh, P. J., Smellie, J. L., & Stevens, M. I. (2008). Antarctic terrestrial life—challenging the history of the frozen continent?. *Biological Reviews*, 83(2), 103-117.
17. Craig, P. M., Wood, C. M., & McClelland, G. B. (2007). Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(5), R1882-R1892.
18. Daane, J. M., & Detrich III, H. W. (2022). Adaptations and Diversity of Antarctic Fishes: A Genomic Perspective. *Annual Review of Animal Biosciences*, 10, 39-62.
19. Danovaro, R. *Biologia marina. biodiversità e funzionamento degli ecosistemi marini*; De Agostini Scuola, Novara (2019), 393.
20. Danovaro, R. *Biologia marina. biodiversità e funzionamento degli ecosistemi marini*; De Agostini Scuola, Novara (2019), 391-392.

21. Danovaro, R. *Biologia marina. biodiversità e funzionamento degli ecosistemi marini*; De Agostini Scuola, Novara (2019), 393.
22. Deheyn, D. D., Gendreau, P., Baldwin, R. J., & Latz, M. I. (2005). Evidence for enhanced bioavailability of trace elements in the marine ecosystem of Deception Island, a volcano in Antarctica. *Marine Environmental Research*, 60(1), 1-33.
23. Driessnack, M. K., Matthews, A. L., Raine, J. C., & Niyogi, S. (2016). Interactive effects of chronic waterborne copper and cadmium exposure on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comparative Biochemistry and Physiology*
24. Eastman, J. T. (2005). The nature of the diversity of Antarctic fishes. *Polar biology*, 28(2), 93-107.
25. Eastman, J. T., & Hubold, G. (1999). The fish fauna of the Ross Sea, Antarctica. *Antarctic Science*, 11(3), 293-304.
26. Fields, L. G., & DeVries, A. L. (2015). Variation in blood serum antifreeze activity of Antarctic *Trematomus* fishes across habitat temperature and depth. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 185, 43-50.
27. Gösterişli, T. U., Koçoğlu, E. S., Er, E. Ö., & Bakırdere, S. (2022). Accurate and Sensitive Determination of Concentrations of Twenty-Two Elements in the Surface Water from West Antarctica. *Water, Air, & Soil Pollution*, 233(7), 1-10.
28. Handy, R. D. (2003). Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(1), 25-38.
29. Henson, M. C., & Chedrese, P. J. (2004). Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Experimental biology and medicine*, 229(5), 383-392.
30. Hernández, P. P., Moreno, V., Olivari, F. A., & Allende, M. L. (2006). Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hearing research*, 213(1-2), 1-10.

31. Hwengwere, K., Paramel Nair, H., Hughes, K. A., Peck, L. S., Clark, M. S., & Walker, C. A. (2022). Antimicrobial resistance in Antarctica: is it still a pristine environment?. *Microbiome*, 10(1), 1-13.
32. Inoue, M., Hanaki, S., Kameyama, H., Kumamoto, Y., & Nagao, S. (2022). Unique current connecting Southern and Indian Oceans identified from radium distributions. *Scientific Reports*, 12(1), 1-11.
33. Komjarova, I., & Bury, N. R. (2014). Evidence of common cadmium and copper uptake routes in zebrafish *Danio rerio*. *Environmental science & technology*, 48(21), 12946-12951.
34. La Mesa, M., Caputo, V., & Eastman, J. (2008). The reproductive biology of two epibenthic species of Antarctic nototheniid fish of the genus *Trematomus*. *Antarctic Science*, 20(4), 355-364.
35. Lavut, A., Raveh, D. (2012). Sequestration of highly expressed mRNAs in cytoplasmic granules, P-bodies, and stress granules enhances cell viability. *PLoS Genet.* 8, e1002527
36. Liu, F., Ni, H. G., Chen, F., Luo, Z. X., Shen, H., Liu, L., & Wu, P. (2012). Metal accumulation in the tissues of grass carps (*Ctenopharyngodon idellus*) from fresh water around a copper mine in Southeast China. *Environmental monitoring and assessment*, 184(7), 4289-4299.
37. Lowry, O. H. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193, 265-275.
38. Marina-Montes, C., Pérez-Arribas, L. V., Escudero, M., Anzano, J., & Cáceres, J. O. (2020). Heavy metal transport and evolution of atmospheric aerosols in the Antarctic region. *Science of the total Environment*, 721, 137702.
39. Materić, D., Kjær, H. A., Vallelonga, P., Tison, J. L., Röckmann, T., & Holzinger, R. (2022). Nanoplastics measurements in Northern and Southern polar ice. *Environmental research*, 208, 112741.
40. Meloni, A., & Zucchelli, M. (2001). La sfida Antartide.
41. Moiseenko, T. I., & Kudryavtseva, L. P. (2001). Trace metal accumulation and fish pathologies in areas affected by mining and metallurgical enterprises in the Kola Region, Russia. *Environmental Pollution*, 114(2), 285-297.

42. Motta, C. M., Simoniello, P., Di Lorenzo, M., Migliaccio, V., Panzuto, R., Califano, E., & Santovito, G. (2021). Endocrine disrupting effects of copper and cadmium in the oocytes of the Antarctic Emerald rockcod *Trematomus bernacchii*. *Chemosphere*, 268, 129282.
43. Nawaz, M., Manzl, C., & Krumschnabel, G. (2005). In vitro toxicity of copper, cadmium, and chromium to isolated hepatocytes from carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 75(4).
44. Padeiro, A., Amaro, E., Dos Santos, M. M., Araújo, M. F., Gomes, S. S., Leppe, M., ... & Canário, J. (2016). Trace element contamination and availability in the Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 18(6), 648-657.
45. Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical biochemistry*, 100(2), 201-220.
46. Præbel, K., Hunt, B., Hunt, L. H., & DeVries, A. L. (2009). The presence and quantification of splenic ice in the McMurdo Sound nototheniid fish, *Pagothenia borchgrevinki* (Boulenger, 1902). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 154(4), 564-569.
47. Roche, K., Kuta, J., Sedláček, I., Červenka, R., Tomanová, K., & Jurajda, P. (2019). Concentrations of thirteen trace metals in scales of three nototheniid fishes from Antarctica (James Ross Island, Antarctic Peninsula). *Biological Trace Element Research*, 191(1), 214-223.
48. Samuel, M. S., Datta, S., Khandge, R. S., & Selvarajan, E. (2021). A state of the art review on characterization of heavy metal binding metallothioneins proteins and their widespread applications. *Science of the Total Environment*, 775, 145829.
49. Santovito, G., Piccinni, E., Boldrin, F., & Irato, P. (2012). Comparative study on metal homeostasis and detoxification in two Antarctic teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(4), 580-586.
50. Scheuhammer, A. M., & Cherian, M. G. (1986). Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Toxicology and applied pharmacology*, 82(3), 417-425.
51. Seong Lin Teoh, Satoshi Ogawa, Ishwar S. Parhar, Localization of genes encoding metallothionein-like protein (mt2 and smtb) in the brain of zebrafish, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, Volume 70, 2015, Pages 20-32.

52. Stillman, M. J. (1995). Metallothioneins. *Coordination chemistry reviews*, 144, 461-511.
53. Sures, B., & Reimann, N. (2003). Analysis of trace metals in the Antarctic host-parasite system *Notothenia coriiceps* and *Aspersentis megarhynchus* (Acanthocephala) caught at King George Island, South Shetland Islands. *Polar Biology*, 26(10), 680-686.
54. Teoh, Seong Lin (2017): Neuroprotective effect of metallothionein. Monash University.
55. Li-Han Zhang, Zhi Luo, Yu-Feng Song, Xi Shi, Ya-Xiong Pan, Yao-Fang Fan, Yi-Huan Xu, (2016). Effects and mechanisms of waterborne copper exposure influencing ovary development and related hormones secretion in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, *Aquatic Toxicology*, Volume 178, Pages 88-98,
56. Zhu, G., Li, Y., Wang, D., & Liu, H. (2021). Concentration and Distribution of Cu, Zn, Pb, and Cd in Mackerel Icefish (*Champsocephalus gunnari*) in South Georgia, Antarctic, During Winter. *Biological Trace Element Research*, 1-10.