



**Università degli Studi di Padova
Facoltà di Scienze MM FF NN**

**Laurea di primo livello in Biologia
Curriculum di Biologia Generale**

**Espressione del messaggero
della Superossido Dismutasi a
rame e zinco nel tessuto
intestinale di *Trematomus
hansonii***

**Tutor: Dott. Gianfranco Santovito
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Laura Bignotto

Anno Accademico 2006/2007

INDICE

	Premessa	Pag. 1
1	INTRODUZIONE	Pag. 3
1.1	I pesci antartici	Pag. 3
1.2	<i>Trematomus hansonii</i>	Pag. 3
1.3	L'apparato digerente dei Teleostei	Pag. 4
1.4	Metalli pesanti	Pag. 5
1.5	Rame	Pag. 6
1.6	Cadmio	Pag. 6
1.7	Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)	Pag. 7
1.8	La superossido dismutasi a rame e zinco	Pag. 8
3	MATERIALI E METODI	Pag. 9
3.1	Organismi utilizzati	Pag. 9
3.2	Estrazione e quantificazione dell'RNA totale da intestino di <i>Trematomus hansonii</i>	Pag. 9
3.3	Purificazione dell'mRNA da RNA totale e retrotrascrizione del cDNA	Pag. 10
3.4	Amplificazione del cDNA	Pag. 11
3.5	Quantificazione dei metalli e delle proteine totali	Pag. 12
3.6	Analisi statistiche	Pag. 13
4	RISULTATI	Pag. 15
5	DISCUSSIONE	Pag. 17
5.1	Cadmio	Pag. 17
5.2	Rame	Pag. 17
5.3	Cu/Zn-Superossido dismutasi	Pag. 18
	Bibliografia	Pag. 21

Premessa

Lo scopo di questa tesi è quello di verificare se l'assorbimento e l'esposizione ad elevate concentrazioni ambientali di metalli pesanti quali il rame e il cadmio possano influire sull'espressione del messaggero della superossido dismutasi a rame e zinco nel tessuto intestinale di un teleosteo antartico, *Trematomus hansonii*. I pesci sono stati esposti ad elevate concentrazioni di questi metalli e, mediante metodiche chimiche e biomolecolari si sono ricavati dei dati per mettere in evidenza eventuali differenze fra i pesci trattati e non.

1. INTRODUZIONE

1.1 I pesci antartici

Delle circa 20.000 specie di pesci esistenti al mondo, solo circa 120 sono state trovate a sud della Convergenza Antartica e molte sono esclusive di questa zona.

Il gruppo dominante è quello appartenente all'ordine dei Perciformi e alla famiglia dei Notothenioidi.

L'ambiente antartico è noto per le sue basse temperature sia delle terre emerse che delle acque. Nei primi 50 m di profondità delle acque si sono registrati valori che vanno da quasi -2°C durante la stagione invernale ai $4^{\circ}/5^{\circ}\text{C}$ durante la stagione estiva (Palmisano e Sullivan, 1985).

Le basse temperature delle acque costituiscono un pericolo di congelamento per i teleostei antartici, i quali, tuttavia, hanno evoluto alcune risposte adattative atte a fronteggiare questa caratteristica ambientale. La prima consiste in una elevata concentrazione, rispetto ai pesci di acque temperate, di NaCl nei liquidi interni e la seconda nella capacità di produrre glicoproteine anticongelanti in grado di abbassare a $-2,2^{\circ}\text{C}$ la soglia di formazione di cristalli di ghiaccio (De Vries, 1978).

Le basse temperature, inoltre, favoriscono l'aumento della viscosità dei liquidi corporei, accrescendo lo sforzo a carico dell'apparato cardiocircolatorio ed il dispendio di energia. Tuttavia i pesci antartici si sono adattati a questa situazione, riducendo il contenuto di emoglobina e di eritrociti nel sangue facilitandone quindi la circolazione.

1.2 *Trematomus hansonii*

È un teleosteo appartenente alla famiglia Nototheniidae e all'ordine Perciformes.

Le sue dimensioni possono raggiungere i 42 cm e si nutre di piccoli pesci, policheti, copepodi, isopodi, piccoli gasteropodi, krill e altri organismi appartenenti all'ordine Euphausiacea, molto diffusi nelle acque fredde e polari.

Il corpo è di colorazione brunastra con grandi macchie scure sul corpo, sulla testa e sulle pinne.

La sua distribuzione batimetrica è compresa fra i 6 e i 549 m (Everson, 1984) e lo si può trovare nell'Oceano del Sud, nei Mari di Davis e di Weddel.

Trematomus hansonii è un pesce che presenta una conformazione dell'apparato digerente propria dei teleostei.



Fig. 1.1 *Trematomus hansonii*

1.3 L'apparato digerente dei Teleostei

I teleostei sono dotati di un tubo digerente e di ghiandole annesse, fegato e pancreas. Il tubo digerente si divide in tratti successivi in cui i limiti sono più o meno determinati (Harder, 1995).

- intestino cefalico o bucco faringeo che inizia con la rima buccale e termina a livello dell'ultimo paio di archi branchiali.
- Intestino anteriore che comprende l'esofago e lo stomaco.
- Intestino posteriore che comprende l'intestino cieco e la cloaca .

Digestione gastrica. La digestione globale (gastrica + intestinale) è comunque molto lenta, la durata va dai 2 ai 6 giorni ed è influenzata dalla temperatura. Da studi fatti non sembra possa esserci nei pesci una secrezione gastrica psichica, condizionata cioè, come nei mammiferi, dagli organi di senso (vista-olfatto-udito). Quindi essa dipende solamente dal contatto fisico-chimico con gli alimenti.

Intestino medio e posteriore. Sono l'intestino propriamente detto e il retto. Nell'intestino si distinguono una tunica mucosa e una muscolare.

- mucosa: l'epitelio dell'intestino medio è semplice e prismatico, quello dell'intestino posteriore è stratificato. Le cellule presenti sono le principali, mucose e di sostegno;

- sottomucosa: è di connettivo lasso e fibroso e in alcuni tratti tra le sue maglie sono infiltrati i leucociti, tanto da esser comparata ad un tessuto linfoide. Le sue fibre muscolari lisce, organizzate in fasci, costituiscono la *muscularis mucosae* distinta dalla tunica muscolare propriamente detta molto vascolarizzata.
- muscolare: si continua senza cambiamenti con quella dell'intestino anteriore e comprende uno strato interno ad andamento trasversale e uno esterno longitudinale.

L'intestino presenta dei rilievi non sempre apprezzabili ad occhio nudo. Le pliche rettilinee possono essere longitudinali o trasversali. L'organizzazione della mucosa intestinale nei pesci è estremamente variabile anche tra specie vicine e nell'ambito della stessa specie. Non sembra esser legata al tipo di alimentazione; la medesima organizzazione di papille, pliche si ritrova in pesci erbivori, limnivori ed onnivori.

La lunghezza e la forma dell'intestino è variabilissima e dipende dalla forma del corpo, dallo sviluppo della vescica natatoria, dallo sviluppo o atrofia muscolare a seconda che il pesce sia buon nuotatore o sedentario ecc.

Il retto o intestino terminale si distingue esteriormente dell'intestino medio per il suo diametro inferiore e per la sua consistenza maggiore dovuta allo strato muscolare circolare più spesso. La mucosa è organizzata in pliche longitudinali con epitelii di tipo stratificato.

1.4 Metalli pesanti

La maggior parte dei metalli pesanti non sono di importanza biologica. Tuttavia, almeno 12 sembrano essere essenziali per le funzioni biologiche: vanadio, cromo, manganese, ferro, cobalto, nichel, rame, zinco, arsenico, selenio, molibdeno e stagno (Mertz 1981). Sebbene siano essenziali per il metabolismo, diventano tossici quando superano una certa concentrazione citoplasmatica. Le cellule sono in grado di percepire i cambiamenti nelle concentrazioni citoplasmatiche dei metalli e di coordinare l'espressione dei geni che sono coinvolti nell'assorbimento, nella distribuzione, nel sequestro e nell'utilizzo dei metalli (Rutherford e Bird, 2004). I metalli pesanti, se considerati come atomi singoli, si trovano legati a

diversi componenti (metallocomplessi) che variano continuamente per struttura e concentrazione.

1.5 Rame

È un metallo che nell'organismo svolge molteplici funzioni biologiche tra le quali è il cofattore della superossido dismutasi, un enzima che trasforma il radicale superossido ($\bullet\text{O}_2^-$) in perossido di idrogeno. Il rame è inoltre un componente essenziale di una trentina di enzimi e co-enzimi tra i quali quelli coinvolti nel legame dell'elastina e collagene nel tessuto connettivo, nelle vie di formazione dei pigmenti, nella catena respiratoria dei trasportatori degli elettroni (Linder, 1991, Cox 1995).

Il rame, una volta assunto, attraverso il cibo e l'acqua, viene assorbito dallo stomaco e dal primo tratto dell'intestino; passa nel sangue legandosi a delle proteine, ceruloplasmine ed albumine, quindi viene portato verso il fegato e distribuito ai vari organi (Grosell 2002).

Il rame è un elemento essenziale, ma allo stesso tempo, se presente in eccesso nei tessuti, può risultare tossico, favorendo la formazione di radicali liberi (Halliwell 1994).

1.6 Cadmio

È un oligoelemento che non riveste alcun ruolo biologico all'interno dell'organismo. Esso, come anche i suoi composti, è tossico perfino a basse concentrazioni, tendendo ad accumularsi negli organismi e nell'ambiente.

Il cadmio fu scoperto nel 1817 e nel corso degli anni divenne sempre più disponibile per molti impieghi a livello industriale, divenendo però anche elemento ubiquitario nella biosfera e arrecando molti effetti negativi alla salute di tutti gli organismi. A causa della sua ormai vasta diffusione, il cadmio può essere ingerito ed assorbito nel tratto gastrointestinale, accumulandosi prevalentemente nel fegato e nei reni di qualsiasi organismo (Andersen 1984).

Il cadmio può legarsi agli acidi nucleici o alle proteine. L'affinità per il cadmio di queste ultime risulta essere maggiore rispetto agli acidi nucleici, grazie all'instaurazione di legami con i residui di cisteina. Legami molto forti li instaura con le metallotioneine, proteine a basso peso molecolare ricche di cisteine. Negli acidi nucleici, gli ioni cadmio come anche quelli rame, si legano nella parte della molecola contenente azoto (Andersen 1984).

L'assorbimento da parte del tratto gastrointestinale del cadmio non avviene sempre con le stesse modalità. Il suo assorbimento e accumulo è influenzato dalle concentrazioni e dai tempi di esposizione nonché dalla forma chimica. Studi scientifici hanno dimostrato che l'esposizione a cadmio legato ad alcune molecole come EDTA non interferisce sul normale metabolismo cellulare poiché il metallo legato ad un chelante come l'EDTA perde la sua potenziale tossicità (Müller *et al.*, 1994).

È stato inoltre proposto che il Cd inibisca il III° complesso della catena respiratoria, facilitando la generazione dell'anione superossido (Wang *et al.*, 2004).

1.7 Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)

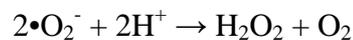
All'interno delle cellule, in seguito alla riduzione parziale dell'ossigeno, si generano naturalmente dei metaboliti di "scarto". Si tratta delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), le quali se prodotte in quantità minima aiutano le cellule del sistema immunitario, in particolare i macrofagi, nella difesa contro i batteri. Se i radicali liberi vengono prodotti in eccesso, come in presenza di xenobiotici quali i metalli pesanti, possono provocare danni cellulari fra i quali l'alterazione degli acidi nucleici, l'ossidazione dei lipidi membrana, l'alterazione nella sintesi di ATP, la degradazione delle proteine e l'inattivazione degli enzimi.

Dal punto di vista chimico, le ROS (anione superossido $\bullet\text{O}_2^-$, radicale idrossile $\bullet\text{OH}$, perossido di idrogeno H_2O_2) sono molecole particolarmente instabili che tendono a ricercare un equilibrio interagendo con gli elettroni delle molecole con cui vengono a contatto (Shull *et al.*, 1991). Le ROS prodotte vengono eliminate da enzimi antiossidanti ma anche da composti antiossidanti non enzimatici. Tra gli enzimi citiamo le superossido dismutasi, le glutazione perossidasi, la catalasi. Fra

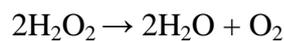
le sostanze antiossidanti non enzimatiche ci sono gli aminoacidi, le vitamine A, C (acido L-ascorbico) ed E (tocoferolo), il coenzima Q10, il glutatione .

1.8 La superossido dismutasi a rame e zinco

La superossido dismutasi a rame zinco (Cu/Zn-SOD) è un metalloenzima citoplasmatico ubiquitario delle cellule. Essa catalizza la dismutazione dell'anione superossido ($\bullet\text{O}_2^-$) in ossigeno molecolare (O_2) e perossido di idrogeno (H_2O_2) attraverso reazioni di ossido-riduzione che coinvolgono gli ioni rame, presenti nel sito attivo della molecola:



A sua volta il perossido di idrogeno, grazie agli enzimi catalasi (CAT) e glutatione perossidasi (GPX, selenio dipendente), viene trasformato in ossigeno e acqua:



La catalasi ha la funzione di proteggere le cellule dagli effetti tossici del perossido di idrogeno (H_2O_2) ed è un enzima estremamente importante nella risposta dell'organismo allo stress ossidativi (Halliwell e Gutteridge, 1984). Infatti, in presenza di ioni metallici con proprietà redox, come Fe^{2+} e Cu^{2+} , il perossido di idrogeno può essere convertito attraverso la reazione di Fenton nel radicale idrossile ($\bullet\text{OH}$), una specie molto più reattiva del perossido di idrogeno:

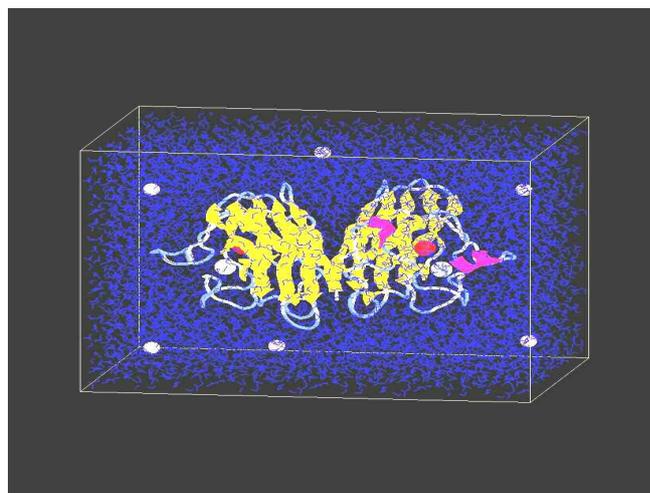


Fig. 1.3 *Struttura tridimensionale della Cu/Zn-SOD*

3 MATERIALI E METODI

3.1 Organismi utilizzati

Gli esemplari utilizzati in questa ricerca appartengono alla specie *Trematomus hansonii* e sono stati catturati a Baia Terranova durante la XXI^a Spedizione Italiana in Antartide.

Gli organismi sono stati stabulati in vasche termostate a -2°C. Alcuni esemplari non sono stati sottoposti ad alcun trattamento per utilizzarli come controlli. In altre vasche è stato disciolto CdCl₂ (0,89 µM) e in altre CuCl₂ (1,57 µM).

Trascorsi cinque giorni, i pesci sono stati sacrificati e sono stati isolati in loco diversi organi e tessuti tra i quali anche l'intestino, preso in considerazione da questo studio. I reperti sono stati congelati in azoto liquido e poi conservati a -80°C fino al loro utilizzo.

3.2 Estrazione e quantificazione dell'RNA totale da intestino di *Trematomus hansonii*

I campioni congelati di tessuto intestinale sono stati omogenati con dei pestelli in un 1ml di TRIzol, un reagente contenente guanidina isotiocianato, che lisa le cellule, e fenolo, che serve per l'estrazione fenolo-cloroformio dell'RNA.

All'omogenato sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio e si è lasciato incubare a temperatura ambiente per tre minuti. Il cloroformio separa gli acidi nucleici dal resto degli organuli cellulari. Il processo è stato completato con una centrifugazione a 11600 × g a 4°C per 15 minuti.

Nelle eppendorf sono state evidenziate tre fasi a diversa densità e quella acquosa più in superficie, contenente l'RNA, è stata recuperata ed incubata con 0,5 ml di alcool isopropilico ciascuna a temperatura ambiente per 10 minuti, affinché l'RNA precipitasse.

Nuovamente si è centrifugato a 4°C per 10 minuti a 11600 × g per far sedimentare l'RNA. L'alcool isopropilico è stato rimosso e il *pellet* di RNA è stato lavato con 1ml di etanolo 75%, poi rimosso. Il *pellet* ottenuto è stato lasciato asciugare a

temperatura ambiente e successivamente risospeso *overnight* in acqua *RNAase free* a 4°C.

Una volta risospeso, l'RNA deve essere quantificato. I campioni sono stati incubati a 55-60°C per 10 minuti per permettere la denaturazione, poi sono stati collocati immediatamente in ghiaccio. Ciascun campione è stato diluito 1:500 in acqua DEPC (diethylpirocarbonato) e si sono effettuate le letture di assorbanza allo spettrofotometro a 260 nm (A_{260}) e a 280 nm (A_{280}). Se il rapporto tra A_{260} e A_{280} non risultava 1,6-1,8 la soluzione non era sufficientemente pura e pertanto l'estrazione veniva ripetuta.

I valori ottenuti allo spettrofotometro permettono anche di ricavare la concentrazione di RNA espressa in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mediante la seguente proporzione:

$1 : 40 \mu\text{g}/\text{ml} = A_{260} : x$, dove 1 unità di densità ottica corrisponde ad una concentrazione di RNA pari a $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Ottenuti tutti i valori di assorbanza si è verificata l'integrità dell'RNA mediante elettroforesi in gel d'agarosio-formaldeide.

Al termine della corsa le bande sono state evidenziate sotto raggi UV mediante "colorazione" con una soluzione contenente bromuro di etidio.

In caso di RNA integro si vedono due bande nette corrispondenti all'RNA ribosomale 28S e 18S. L'mRNA non è visibile perché costituisce una percentuale minima del totale. I campioni utilizzati sono stati conservati in freezer a -80°C.

3.3 Purificazione dell'mRNA da RNA totale e retrotrascrizione del cDNA

La purificazione dell'RNA messaggero è stata ottenuta grazie al kit commerciale NucleoTrap[®] mRNA (Macherey-Nagel) seguendo il protocollo della ditta produttrice.

Per la sintesi del cDNA a 4 μg , ovvero 4 μl di mRNA sono stati aggiunti 1 μl di oligo(dT) primer e una mix contenente:

6,1 μl acqua DEPC

4 μl improm II 5 \times reaction buffer

2,4 μl MgCl_2 25 mM

1 µl dNTP mix

0,5 µl recombinant RNAsin ribonuclease inhibitor

Per favorire la denaturazione degli acidi nucleici i campioni sono stati incubati per 5 minuti a 70°C e poi 5 minuti a 4°C. Prima di inserire le provette nel termociclatore per iniziare la reazione di retrotrascrizione, ad ognuna è stato aggiunto 1 µl Improm II reverse transcriptase, l'enzima di reazione.

Il programma del termociclatore è stato il seguente:

25°C per 5 minuti

42°C per 60 minuti

70°C per 15 minuti

Al termine i campioni sono stati trasferiti a -20°C.

3.4 Amplificazione del cDNA

Nella fase successiva il cDNA retrotrascritto è stato amplificato, mediante PCR, che consiste in una simultanea amplificazione di più frammenti di DNA di interesse in un'unica reazione, utilizzando più coppie di *primers*. Questa tecnica è stata utilizzata per l'analisi semiquantitativa dell'espressione dei geni della Cu/Zn-SOD. I *primers* utilizzati per amplificare il trascritto che si vuole quantificare, vengono utilizzati unitamente ai *primers* che amplificano un trascritto di un gene *housekeeping* (in questo caso la β-actina). I segnali provenienti dall'amplificazione del cDNA della Cu/Zn-SOD vengono, quindi, normalizzati con i segnali dell'amplificazione del cDNA dell'actina.

A 5µl di cDNA è stata aggiunta una mix fino ad un volume finale di 50µl così composta:

29µl di acqua sterile

5µl di RB buffer

0,75µl MgCl₂

2µl dNTP

2 µl SOD reverse1 primer

2 µl SOD forward1 primer

2 µl ACT reverse1 primer

2 µl ACT forward1 primer

Gli oligonucleotidi usati come primer reverse e forward per l'amplificazione della Cu/Zn-SOD sono stati disegnati sulla sequenza del cDNA della Cu/ZN-SOD di *T. hansonii*. La sequenza degli oligonucleotidi è la seguente:

primer reverse SOD RE1 5'-ggatgggacaaggttaagca-3'

primer forward SOD FW1 5'-ttggcgctcctttgaaacta-3'

Gli oligonucleotidi per l'amplificazione dell'actina sono stati costruiti sulla sequenza del corrispondente cDNA di *T. hansonii*.

primer reverse ACT RE 5'-gagcctccgatccagaca-3'

primer forward ACT FW 5'-cctggacttcgagcagga-3'

Prima di aver posto i campioni nel termociclatore venne aggiunta a ciascuno 0,25µl di Taq polimerasi.

Il programma del termociclatore è stato il seguente:

94°C per 2 minuti

94°C per 1 minuto

55°C per 1 minuto

74°C per 2 minuti

Al termine dei cicli 24 e 30 sono stati prelevati 10 µl di soluzione e posti a -20°C.

Lo scopo dei prelievi è quello di seguire successivamente una curva di accumulo dell'amplificato e ricavare un valore attendibile dei livelli di mRNA espresso.

È stata poi allestita un'elettroforesi dei prodotti di RT-PCR con aliquote dell'amplificato più dei pozzetti contenenti un marker quantitativo necessario nella determinazione della lunghezza e della concentrazione della banda.

Al termine della corsa il gel è stato colorato con bromuro di etidio e visualizzato tramite Biorad in cui si sono notate due bande per ogni pozzetto, una attorno alle 200 pb corrispondente alla β-actina e una attorno alle 500 pb corrispondente alla Cu/Zn-SOD.

3.5 Quantificazione dei metalli e delle proteine totali

Circa 200 mg di tessuto sono stati omogenati in un tampone specifico per ottenere l'estratto cellulare

Per 50 ml di tampone di omogeneizzazione sono serviti:

0,02081g EDTA

0,0077g 1,4-Ditio-treitolo (DTT)

8,5575g saccarosio

0,559g KCl

30-40ml Tris-HCl

È stato aggiustato il pH a 7,6 e si è portato a volume.

Ad ogni campione si è aggiunto un volume di tampone di omogeneizzazione pari a quattro volte il peso dei campioni espresso in grammi.

I campioni sono stati omogenati utilizzando il Polytron (PT 30.000 Kinematica) e poi centrifugati per 50 minuti con centrifuga Beckman con rotore JA a 20000xg a 4°C.

Si sono prelevati i surnatanti e si sono mantenuti in ghiaccio per la determinazione delle proteine totali e per il contenuto di metalli.

La quantificazione totale delle proteine è stata effettuata con il metodo di Lowry (Lowry *et al.*, 1951) che si basa sulla reazione dei gruppi fenolici dei residui tirosinici delle proteine con il reattivo Folin-Ciocalteu. Questa reazione è sensibile a concentrazioni comprese tra 5-100 µg in 0,2ml di campione. L'albumina bovina (1mg/ml) viene usata come standard.

La concentrazione proteica di ciascun campione, espressa in mg/ml, è stata calcolata utilizzando una retta di taratura costruita utilizzando quantità note e crescenti di standard proteico (BSA 1 mg/ml in tampone di omogeneizzazione) e relativi valori di assorbenza a 750 nm.

Per il dosaggio dei metalli (Cu e Cd) il supernatante ottenuto dopo la centrifugazione dell'omogenato è stato opportunamente diluito con acqua milliQ.

La determinazione è stata effettuata mediante spettrofotometro ad assorbimento atomico a fiamma (Perkin-Elmer mod. 4000). La quantità di metalli misurata è stata normalizzata con il contenuto di proteine totali (µg metallo/mg proteine totali).

3.6 Analisi statistiche

I valori ottenuti sono riportati come media \pm deviazione standard. La presenza di differenze statisticamente significative tra i vari gruppi di campioni è stata

verificata mediante l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Student-Newman-Keuls.

4 RISULTATI

Negli esemplari trattati con il cadmio la concentrazione intracellulare di rame nell'intestino di *Trematomus hansonii* precipita a valori vicini allo zero (Fig 4.1). Negli stessi esemplari, la concentrazione di cadmio, invece, è molto elevata rispetto ai controlli (Fig. 4.2).

I pesci esposti al rame non mostrano variazioni statisticamente significative di rame e cadmio rispetto ai controlli, nonostante le concentrazioni medie subiscano un lieve decremento per entrambi i metalli, in particolare per il cadmio (Figg 4.1 e 4.2).

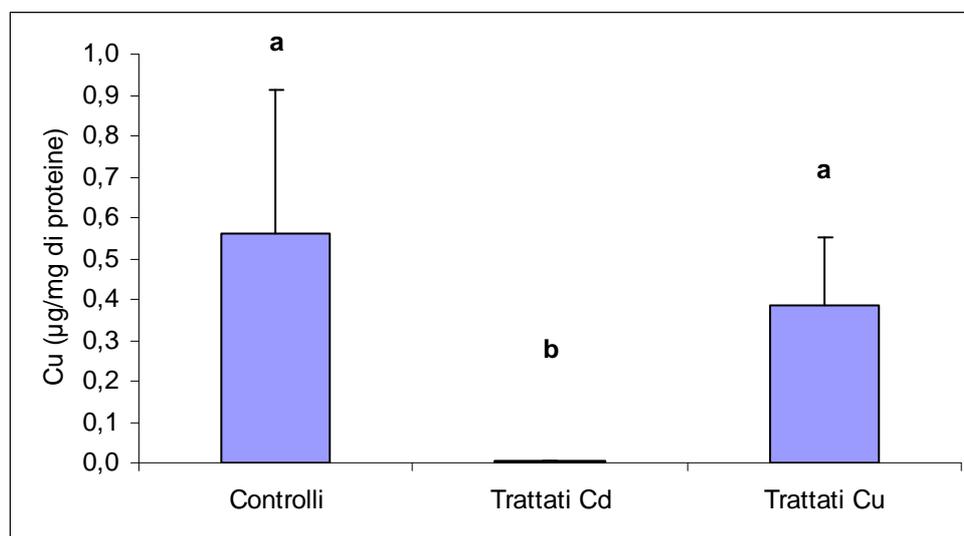


Fig. 4.1 Confronto fra i contenuti di rame fra gli esemplari controllo, trattati con il cadmio e trattati con il rame per 5 giorni in acque contenenti 100µg/L di ciascun metallo. Lettere diverse corrispondono a differenze statistiche significative per $p < 0,05$.

Per quanto concerne i livelli del messaggero della superossido dismutasi a rame e zinco nell'intestino di *Trematomus hansonii*, in seguito a trattamento con i metalli rame e cadmio, si evidenzia un leggero decremento, sebbene le differenze rispetto ai controlli non siano statisticamente significative. Il decremento è più evidente nei pesci trattati con il cadmio (Fig. 4.3).

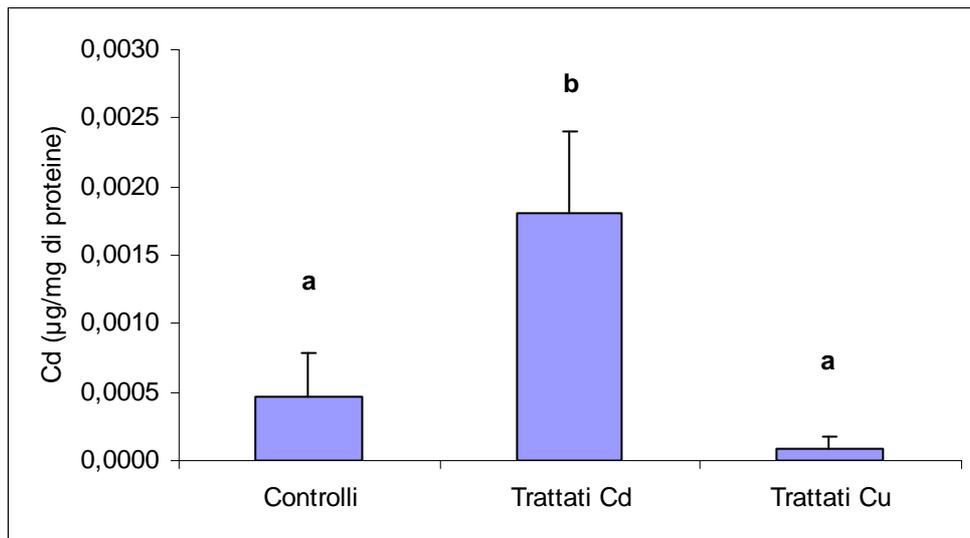


Fig 4.2 Confronto fra i contenuti di cadmio fra gli esemplari controllo, trattati con il cadmio e trattati con il rame per 5 giorni in acque contenenti 100µg/L di ciascun metallo. Lettere diverse corrispondono a differenze statistiche significative per $p < 0,05$.

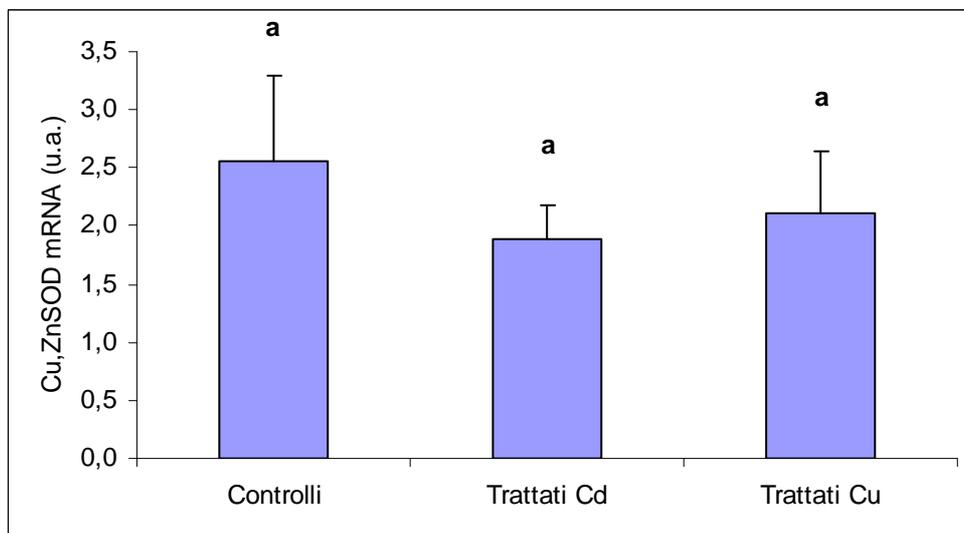


Fig 4.3 Espressione dell'mRNA per la Cu/Zn-SOD nell'intestino. Confronto fra esemplari controllo non trattati ed esemplari che sono stati esposti o solo a cadmio o solo a rame per 5 giorni in acque contenenti 100µg/L di ciascun metallo. Lettere diverse corrispondono a differenze statistiche significative per $p < 0,05$.

5 DISCUSSIONE

5.1 Cadmio

L'esposizione al Cd comporta, negli animali da noi utilizzati, un aumento di questo metallo nelle cellule dell'intestino. Risultati simili sono stati ottenuti in diversi organi e tessuti di vari organismi trattati sperimentalmente con Cd (Revis e Osborne, 1984; Reeves *et al.*, 2005; Frazier, 1979).

E' stato osservato che il cadmio, nei pesci, tende ad accumularsi maggiormente nella mucosa intestinale, nei reni, nello stomaco, nel fegato e nelle branchie (Van Campenhout *et al.*, 2004; Fox , 1979). A livello intestinale, il cadmio, e il cloruro di cadmio in forma meno accentuata, causano necrosi delle cellule assorbenti (Fox, 1979).

L'accumulo di Cd nella cellula è spesso messo in relazione al legame di questo metallo con le metallotioneine, che sono una famiglia di proteine a basso peso molecolare ricche di cisteine che chelano i metalli, aiutando a contrastare gli effetti tossici dei metalli pesanti. Inoltre mantengono l'omeostasi dei metalli essenziali e sequestrano quelli non essenziali presenti in concentrazioni elevate (Van Cleef-Toedt *et al.*, 2001). Esse sono state anche proposte come *biomarkers* di esposizione a metalli pesanti in pesci e altri organismi (De Smet e Blust, 2001; Olsvik *et al.*, 2001; Roesijadi, 1994).

5.2 Rame

Nei pesci trattati con il rame anziché evidenziare un maggior accumulo intracellulare di questo metallo come avviene per il cadmio, la concentrazione di rame misurata nei pesci esposti risulta essere leggermente inferiore a quella misurata negli organismi controllo.

La diminuzione seppur lieve del contenuto di Cu in seguito ad esposizione a questo metallo è comunque stata verificata in altri esperimenti effettuati su altri animali, quale il ratto (Oestreicher and Cousins, 1985) e *Oncorhynchus mykiss* (Grosell *et al.*, 1997).

Anche in studi condotti su altri mammiferi e nel teleosteo *Clarias gariepinus* si assiste ad un declino nell'efficienza di assorbimento di rame nell'intestino all'aumentare dell'esposizione allo ione (Linder, 1991, Buckley, 1996; Handy *et al.*, 2000). Hamilton e Smith (1978) hanno dimostrato che l'accumulo di rame nella mucosa intestinale viene inibito anche quando gli organismi sono esposti a concentrazioni di cadmio elevate. È stato dimostrato che il fattore limitante è il trasporto basolaterale del metallo, in quanto si evidenzia un'alterazione del simporto Cu/Cl⁻. Pertanto il rame non riesce a raggiungere il sangue quando la mucosa intestinale è a contatto con elevate concentrazioni di questo metallo, e questo è considerato un meccanismo di difesa contro gli effetti tossici di un eccesso di rame (Handy *et al.*, 2000). Un'eccessiva concentrazione intestinale di rame, induce anche l'interruzione dell'espressione del gene della proteina Cu-ATPasi che lega e trasporta il catione sempre a livello della membrana basolaterale (Handy *et al.*, 2000). Anche nel nostro studio, quindi, l'esposizione ad elevate concentrazioni di rame potrebbe aver attivato questi meccanismi omeostatici.

È stato dimostrato che l'aggiunta di cadmio nella dieta di pesci, uccelli e mammiferi anche a basse concentrazioni e per brevi periodi di tempo (entro sette giorni) fa precipitare i livelli di rame soprattutto nel fegato ed intestino, alterando la capacità della mucosa di assorbire questi ioni e altri nutrienti. (Campbell and Mills, 1974). In ogni caso, la letteratura ci dice quindi che l'esposizione al cadmio porta ad un deficit nell'accumulo di rame, come si verifica anche nei nostri esperimenti. Sebbene il meccanismo con cui si verifica tale fenomeno non sia ancora noto, si può supporre che siano coinvolte proteine trasportatrici di membrana, le quali potrebbero essere saturate dal cadmio o la cui espressione potrebbe essere bloccata da questo metallo.

5.3 Cu/Zn-Superoossido dismutasi

Per quanto riguarda la regolazione dell'espressione genica della superossido dismutasi a rame e zinco a livello dell'intestino, il trattamento con cadmio e con rame sembrano non avere alcun effetto in *Trematomus hansonii*.

Si potrebbe ipotizzare che l'induzione del sistema trascrizionale del gene per la Cu/Zn-SOD richieda tempi maggiori di trattamento (superiori ai cinque giorni) oppure concentrazioni diverse da quelle utilizzate. In effetti, studi effettuati su esemplari di *Salmo trutta* che vivono in ambienti in cui sono presenti concentrazioni di Cd, Cu e Zn relativamente elevate (ma di molto inferiore a quelle utilizzate nei nostri esperimenti), hanno mostrato livelli di Cu/Zn-SOD mRNA più alti rispetto ad esemplari della stessa specie che vivono in acque povere di tali metalli (Hansen *et al.*, 2006). Potrà quindi essere interessante ripetere gli esperimenti sia utilizzando una dose inferiore di Cd o di Cu, sia prolungando l'esposizione per tempi maggiori.

Seppure l'espressione del messaggero per la Cu/Zn-SOD non vari, l'accumulo di Cd che si verifica a seguito del trattamento con questo metallo influisce negativamente sull'attività cellulare di questo enzima. Infatti, presso il nostro laboratorio si sono svolti dei dosaggi enzimatici dell'attività della SOD nell'intestino di *T. hansonii* da cui è risultato che l'attività enzimatica mostra una diminuzione del 90% negli organismi esposti sperimentalmente al Cd (Eleonora Sforza, 2007).

E' noto che i metalli sono responsabili dell'inibizione di molti enzimi, sia per azione diretta del metallo sulla proteina, sia attraverso la formazione di radicali liberi che producono ossidazione delle proteine (Shull *et al.*, 1991). Inoltre è da notare che i livelli di Cu nelle nostre condizioni sperimentali (trattamento con Cd) si riducono fortemente e questo potrebbe portare ad una carenza che impedisce un efficiente legame tra Cu e apo-SOD, con relativa diminuzione di attività enzimatica.

Bibliografia

- Andersen, O.** (1984). Chelation of cadmium. *Environ. Health Perspect.* 54, 249-266.
- Buckley, W. T.** (1996). Application of compartmental modeling to determination of trace element requirements in humans. *J. Nutr.* 126, 2312S-2319S.
- Campbell, J. K. and Mills, C. F.** (1974). Effects of dietary cadmium and zinc on rats maintained on diets low in copper. *Proc. Nutr. Soc.* 33, 15A.
- Cox, D. W.** (1995). Genes of the copper pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 828-834.
- De Smet, H. and Blust, R.** (2001). Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 255-262.
- De Vries, A. L.** (1978). The Physiology and biochemistry of low temperature adaptations in polar marine ectotherms. In *Polar Research. To the present, and the future* (ed. M.A. Mc Whinnie), pp 175-202. Selected Symposium, Boulder: Westview Press.
- Everson, I.** (1984). Fish biology. In *Antarctic Ecology* (ed. R. M. Laws), pp. 491-531. New York: London Academic Press.
- Fox, M. R. S.** (1979). Nutritional influences on metal toxicity: cadmium as a model toxic element. *Environ. Health Perspect.* 29, 95-104.
- Frazier, J. M.** (1979). Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Environ. Health Perspect.* 28, 75-79.
- Grosell, M. H. and Wood, C. M.** (2002). Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biol.* 205, 1179-1188.
- Grosell, M. H., Hogstrand, C. and Wood, C. M.** (1997). Cu uptake and turnover in both Cu-acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 38, 257-276.
- Halliwell, B.** (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* 52, 253-265.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C.** (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14.
- Handy, R. D., Musonda, M. M., Phillips, C. and Falla, S. J.** (2000). Mechanisms of gastrointestinal copper absorption in the African Walking Catfish: Copper dose-effects and a novel anion-dependent pathway in the intestine. *J. Exp. Biol.* 203, 2365-2377.
- Hansen, B. H., Rømme, S., Garmo, Ø. A., Olsvik, P. A. and Andersen, R. A.** (2006). Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 263-274.
- Harder, W.** (1995). The gastrointestinal tract. In *Anatomy of fishes* (ed. Schweizerbart), pp. 164-179. Verlagsbuchhandlung Stuttgart.
- Linder, M. C.** (1991). Absorption of copper from the digestive tract. In *Biochemistry of Copper*. pp. 15-42. New York: Plenum Press.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Rondell, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mertz, M.** (1981). The essential trace elements. *Science* 213, 1332-1336.

- Müller, T., Schuckelt, R. and Jaenicke, L.** (1994). Evidence for radical species as intermediates in Cadmium/Zinc-Metallothionein-dependent DNA damage in vitro. *Environ Health Perspect.* 102, 27-29.
- Oestreicher, P. and Cousins, R. J.** (1985). Copper and zinc absorption in the rat: mechanism of mutual antagonism. *J. Nutr.* 115, 159-166.
- Olsvik, P. A., Hindar, K., Zachariassen, K. E. and Andersen, R. A.** (2001). Brown trout (*Salmo trutta*) metallothioneins as biomarkers for metal exposure in two Norwegian rivers. *Biomarkers* 6, 274-288.
- Palmisano, A.C. and Sullivan, C.W.** (1985). Pathways of photosynthetic carbon assimilation in sea-ice microalgae from McMurdo Sound, Antarctica. *Limnol. Oceanogr.* 30, 674-678.
- Reeves, P. G., Chaney, R. L., Simmons, R. W. and Cherian, M. G.** (2005). Metallothionein induction is not involved in cadmium accumulation in the duodenum of mice and rats fed diets containing high-cadmium rice or sunflower kernels and a marginal supply of zinc, iron, and calcium. *J. Nutr.* 135, 99-108.
- Revis, N. W. and Osborne, T. R.** (1984). *Environ. Health Perspect.* 54, 83-91.
- Roesijadi, G.** (1994). Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ. Health Perspect.* 102, 91-96.
- Rutherford, J. C. and Bird, A. J.** (2004). Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot. Cell.* 3, 1-13.
- Sforza, E.** (2007). Metallothioneine e Cu,Zn superossido dismutasi come biomarkers di esposizione a metalli in *Trematomus hansonii*. *Tesi di Laurea*.
- Shull, S., Heintz, N., Periasamy, M., Manohar, M., Janssen, Y. M. W., Marsh, J. P. and Mossman, B. T.** (1991). Differential Regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J. Biol. Chem.* 266, 24398-24403.
- Van Campenhout, K., Infante, H. G., Adams, F. and Blust, R.** (2004). Induction and binding of Cd, Cu, and Zn to metallothionein in carp (*Cyprinus carpio*) using HPLC-ICP-TOFMS. *Toxicol. Sci.* 80, 276-287.
- Van Cleef-Toedt, K., Kaplan L. A. E. and Crivello, J. F.** (2001). Killifish metallothionein messenger RNA expression following temperature perturbation and cadmium exposure. *Cell Stress Chaperones* 6, 351-359.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S. and Rao, K. M. K.** (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biol. Med.* 36, 1434-1443.