



UNIVERSITÀ 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

Espressione genica e contenuto proteico delle metallotioneine nel teleosteo antartico

Trematomus eulepidotus come risposta all'esposizione a ioni metallici (Cu e Cd)

Gene expression and protein content of metallothioneins in Antarctic teleost

Trematomus eulepidotus as a response to metal ions (Cd and Cu)

Relatore: Prof. Paola Irato

Correlatrice: Dott.ssa Elisabetta Piva

Laureanda: Alessia Magrin

Matricola 1228757

Anno accademico 2022/2023

Indice

- 1 Introduzione
 - 1.1 Il continente antartico
 - 1.2 Inquinamento delle acque antartiche
 - 1.3 I metalli
 - 1.3.1 Rame
 - 1.3.1 Cadmio
 - 1.4. I teleostei antartici
 - 1.4.1 *Trematomus eulepidotus*
 - 1.5 Le metallotioneine
 - 1.5.1 Le metallotioneine negli animali acquatici
- 2 Scopo della tesi
- 3 Materiali e metodi
 - 3.1 Organismi utilizzati
 - 3.2 Estrazione dell'RNA totale
 - 3.3 Analisi della purezza dell'RNA
 - 3.4 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA
 - 3.5 Primers utilizzati per l'amplificazione del cDNA
 - 3.6 PCR quantitativa (qRT-PCR)
 - 3.7 Trattamento campioni e dosaggio metallotioneine
 - 3.8 Determinazione del contenuto proteine totali
 - 3.9 Contenuto metallotioneine rispetto alle proteine totali
 - 3.9.1 Analisi statistiche
- 4 Risultati e discussione
 - 4.1 Espressione mRNA nel cervello
 - 4.2 Espressione mRNA nelle gonadi
 - 4.3 Contenuto metallotioneine nel rene
 - 4.4 Contenuto metallotioneine nel cuore
- 5 Conclusioni
- 6 Bibliografia

1 INTRODUZIONE

1.1 Continente Antartico

L'Antartide (figura 1) è il continente situato nell'emisfero australe della Terra, oltre il 60° parallelo di latitudine sud, opposto all'Artide e circondato dagli oceani Pacifico, Indiano e Atlantico che, nella loro totalità, vengono impropriamente chiamati Oceano Antartico (Danovaro, 2019). Si estende per circa 14 milioni di chilometri quadrati di cui il 99,7% è coperta perennemente 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 presente sulla Terra.

In media è il luogo più freddo della Terra con temperature di circa +5°C durante l'estate australe (il continente è illuminato durante tutto questo periodo), mentre le temperature invernali scendono raramente sotto i -20°C, cioè quando l'Antartide rimane nell'oscurità; inoltre è una delle zone più ventose al mondo con venti di notevole violenza.

La zona dell'oceano Antartico è interessata da diverse correnti oceaniche, tra cui la più importante che prende il nome di Corrente Circumpolare Antartica (ACC). Essa è presente in maniera costante ed è in grado di isolare fisicamente il continente, impedendo la migrazione degli organismi e creando condizioni uniche per il loro adattamento ed evoluzione. La caratteristica principale delle acque antartiche è la temperatura costante tra i -1°C e i -2°C che comporta una elevata concentrazione di gas disciolti tra cui ossigeno e anidride carbonica. I nutrienti nelle acque profonde sono abbondanti ed i raggi solari penetrano fino in profondità attraverso le acque molto trasparenti. Queste caratteristiche rendono l'ecosistema antartico molto ricco (Cervellati e Marsico, 1993).



Figura 1 – Dimensione e posizionamento dell’Antartide

1.2 Inquinamento delle acque antartiche

Grazie alla sua posizione geografica, il continente Antartico è un ambiente meno inquinato rispetto agli altri, ma l’aumento delle attività antropiche ha portato anche all’inquinamento degli ecosistemi terrestri e acquatici più remoti. Le cause principali sono gli scarichi di rifiuti sia solidi che liquidi, il trasporto marittimo, la combustione di carburante, le perdite accidentali di petrolio ed il trasporto atmosferico e la deposizione a lungo raggio (Motta et al., 2021). Tra i vari inquinanti di origine antropica, quelli metallici sono tra i più pericolosi data la loro elevata persistenza nell’ambiente, e possono portare a tossicità e problematiche per il biota (Buono et al., 2018).

1.3 I metalli

Dal punto di vista biologico i metalli si possono suddividere in essenziali e non essenziali. Il primo gruppo viene definito così poiché sono necessari per la sopravvivenza ed il funzionamento delle cellule e sono indispensabili per il corretto svolgimento delle funzioni metaboliche dell’organismo. I metalli essenziali possono suddividersi a loro volta in macroelementi, quali Ca, Na, K, Mg; elementi in traccia (Fe, Cu, Zn); ed elementi in ultratraccia quali Mn, Co, Cr, Ni, Se, V. I metalli non essenziali come Cd e Hg possono risultare tossici negli organismi già a basse

concentrazioni (Komjarova e Bury, 2014); anche quelli essenziali, se presenti in eccesso, possono risultare tossici.

I metalli presenti nella biosfera possono derivare sia da fonti naturali, come le emissioni vulcaniche o l'erosione di rocce, sia da fonti antropiche che sono in continuo aumento a causa dell'utilizzo di combustibili fossili e produzioni industriali e minerarie. Nelle acque antartiche anche l'accumulo nel ghiaccio, l'assorbimento da parte delle alghe ghiacciate e le fioriture estive di fitoplancton influenzano la presenza e disponibilità di metalli in traccia disciolti nelle acque superficiali (Beltcheva et al, 2010) e nei sedimenti (Deheyn et al, 2005).

Gli organismi acquatici sono quindi costantemente esposti ad una varietà di metalli attraverso la dieta e l'approvvigionamento idrico e gli effetti tossici si presentano con diversi meccanismi e conseguente danno al metabolismo proteico e lipidico e all'integrità del DNA. La tossicità è anche estesa agli organi riproduttivi e allo sviluppo embrionale (Henon e Chedese, 2004)

La scarsa degradabilità dei metalli può provocare bioaccumulo e biomagnificazione lungo gli anelli successivi della catena trofica arrivando a macroinvertebrati, pesci, animali piscivori e, infine, all'uomo (Ciesielski et al., 2010).

1.3.1 Rame

Il rame si trova in natura sia allo stato elementare sia allo stato ridotto Cu(I) o ossidato Cu(II). Nell'acqua di mare i composti a base di Cu sono tra i più presenti (Brooks e Waldock, 2009) con una concentrazione di circa 150 ng/L (Motta et al., 2021), mentre negli esseri viventi è presente in traccia con una quantità di $\mu\text{g/g}$ di peso corporeo ed è considerato essenziale poiché è una componente determinante per la struttura e le proprietà catalitiche di molte proteine.

L'assorbimento del Cu nella maggioranza degli organismi marini avviene attraverso gli epiteli branchiali, i tessuti intestinali e l'epidermide ma dipende dal pH del lume intestinale, dallo stato chimico del metallo e dalla presenza di altri metalli che possono competere per gli stessi siti di legame. Il rame tende ad accumularsi soprattutto in branchie, fegato, intestino, reni e altri organi escretori (Handy, 2003) provocando effetti tossicologici, tra cui la compromissione della crescita e della sopravvivenza, la diminuzione del metabolismo, la riduzione delle prestazioni nel nuoto, l'interruzione dell'omeostasi ionica (Na e Cl) e l'inibizione della risposta allo stress e stress ossidativo (Driessnack et al, 2016).

1.3.2 Cadmio

Il cadmio è un elemento non essenziale appartenente al sottogruppo IIB degli elementi di transizione come zinco e mercurio. Non si trova libero in natura ma se ne conosce un solo minerale, il CdCl_2 . I meccanismi molecolari responsabili della tossicità del cadmio negli organismi non sono ancora stati completamente chiariti. Alcuni studi a livello cellulare hanno dimostrato che il cadmio compete per i canali del calcio (Hinkle et al, 1987) e induce stress ossidativo con conseguente danno al DNA assieme all'insorgere di mutazioni. È considerato un metallo tossico che in seguito ad una intossicazione acuta, si può trovare in reni, polmoni, fegato e testicoli causando nefrotossicità, immunotossicità e tumori come conseguenza ad esposizioni prolungate.

1.4 I teleostei antartici

Ad oggi si conoscono oltre 260 specie di teleostei antartici, soprattutto endemici che costituiscono una componente fondamentale dell'ecosistema dell'oceano antartico. Essi sono dominati da un singolo gruppo, il sottordine dei Notothenioidei, specializzati per la vita nell'ambiente polare antartico grazie allo sviluppo di una serie di adattamenti evolutivi peculiari che hanno permesso loro di colonizzare questo ambiente particolare.

Sono generalmente pesci dalla taglia piccola, la maggior parte non supera i 35cm di lunghezza. L'alimentazione dei pesci antartici si svolge prevalentemente sul fondo, ma si conosce ancora poco delle abitudini alimentari di gran parte delle specie. Si differenziano nettamente da quelli di altre parti del globo per quanto riguarda gli aspetti riproduttivi, lo sviluppo larvale e i ritmi di crescita. In generale vengono deposte sul fondo un numero limitato di uova di grandi dimensioni ed alcune specie le sorvegliano attivamente fino alla schiusa. Le fasi larvali sono molto lunghe e possono durare quasi due anni. L'accrescimento corporeo è lento ed il ciclo vitale è di alcune decine di anni (Kock & Everson, 1998).

Per impedire il congelamento dei fluidi interni hanno molecole anticongelanti, glicoproteine, che sono sintetizzate costantemente dal pancreas esocrino e vengono

secrete nel lume intestinale e da qui assorbite e immesse in circolo raggiungendo concentrazioni attorno al 3,5% (Di Prisco, 1997).

Le glicoproteine ostacolano il congelamento dei fluidi corporei nei teleostei, il cui punto di congelamento (-0.7 a -1°C) è significativamente superiore a quello dell'acqua di mare (-1.9°C), assorbendo i piccoli cristalli di ghiaccio nel corpo e inibendo il loro sviluppo. Legandosi alla superficie di un cristallo, le glicoproteine prevengono l'aggiunta di molecole di acqua al cristallo e quindi la futura crescita dello stesso (Danovaro, 2019). Se non fosse per gli anticongelanti il ghiaccio che entra nel pesce attraverso l'ingestione o le branchie si propagherebbe con conseguente morte per congelamento (Fields e De Vries, 2015).

Un altro adattamento che si riscontra nei Notothenioidei è la riduzione di eritrociti ed emoglobina nei liquidi circolanti, come risposta all'aumento di viscosità in relazione alla bassa temperatura dell'habitat marino antartico. Il dispendio energetico viene così limitato.

Altra caratteristica rilevante di questi pesci è l'assenza di vescica natatoria. Tale tratto distintivo costringe i pesci antartici alla segregazione ad una vita bentonica. In alcuni casi però si riscontrano la riduzione della componente ossea dello scheletro e l'accumulo di lipidi in particolari sacchetti sottocutanei e intermuscolari, così da consentire loro di condurre una vita pelagica (Devries e Eastman, 1978).

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 Notothenioidei. 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 dell'Antartide (Daane e Detrich III, 2022): le specie più abbondanti sono *Trematomus scotti* (29,7%), *Batidraco marri* (10,4%) e *Trematomus eulepidotus* (8,7%) (Eastman e Hubold, 2004). Il genere *Trematomus* è considerato principalmente un gruppo ad alta latitudine a causa della sua abbondanza in quelle zone (Fields e Devries, 2015).



Figura 2 – Trematomus eulepidotus

1.5 Le metallotioneine

Le metallotioneine (MT) sono proteine non enzimatiche con diverse funzioni, tra cui quella di detossificazione dei metalli, limitando la concentrazione di ioni metallici tossici liberi quali Cd e Hg (Viarengo et al., 2000).

Le MT sono caratterizzate da un alto contenuto di cisteina (30%) e presentano un basso peso molecolare (Stillman, 1995). Il legame selettivo delle MT con i 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 svolgono un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi dei metalli essenziali come rame e zinco, nella disintossicazione dei metalli pesanti, riducendo la quantità di metallo libero nei tessuti e fornendo protezione contro lo stress ossidativo (Lin, 2017).

L'espressione tissutale e l'accumulo di MT nei pesci si verificano principalmente nel fegato, nei reni e nelle branchie (Santovito et al., 2012).

Per quanto riguarda la classificazione di queste proteine, attualmente la Superfamiglia delle MT viene suddivisa in Famiglie multigeniche con diverse isoforme.

Le MT oggi fanno parte di una classe di biomarcatori riconosciuti a livello europeo ed esaminati nell'ambito della garanzia e della qualità degli effetti biologici nei programmi di monitoraggio.

1.5.1 Le metallotioneine negli animali acquatici

La documentazione riguardante le MT negli organismi acquatici è vasta e in costante aumento. Nei teleostei sono state identificate due isoforme di MT, differentemente espresse in diversi tessuti (Bargelloni et al., 1999) e nei diversi stadi di sviluppo.

Le MT nei vertebrati acquatici hanno una distribuzione variabile fra i tessuti come fegato, branchie, reni, polmoni, gonadi e cervello. I metalli si accumulano nei tessuti degli animali acquatici ed alti livelli rilevati nei tessuti di questi organismi possono riflettere delle esposizioni importanti. Molta della variabilità della concentrazione dei metalli in traccia negli organismi acquatici è stata attribuita alla diversità nella taglia così come nell'età degli individui (Farkas et al., 2003), al sesso (Al-Yousuf et al., 2000) ed all'habitat di alimentazione (Canli et al., 2001; Yilmaz, 2005).

Esse sono principalmente indotte da Cd, Cu, e Zn; il Cd è infatti uno dei più potenti induttori per la trascrizione di MT nei pesci.

Organismi che vivono in acque contaminate presentano concentrazioni sufficientemente alte di metalli. I metalli che popolano l'ambiente acquatico possono compromettere sia la biodiversità delle specie marine che gli ecosistemi, a causa della loro tossicità e del loro comportamento cumulativo (Matta et al., 1999). L'accumulo di metalli si basa sul metabolismo dei tessuti e le differenze nel loro ambiente chimico, compresa la presenza di vari ligandi, ciascuno con diverse caratteristiche nella capacità di legare metalli (Campenhout et al., 2004).

2 SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni risulta essere sempre più fondamentale l'importanza dello studio e l'analisi degli effetti sugli ecosistemi dovuti ai cambiamenti globali, sia climatici, sia chimici, inclusi quelli dovuti all'inquinamento antropico.

Le acque marine sono caratterizzate da una presenza naturale di un'elevata concentrazione di cadmio (70ng/l) e di rame (159 ng/l) (Westerlund e Ohman, 1991). Gli organismi marini che popolano queste acque sono quindi costantemente esposti a questi metalli, i quali possono bioaccumularsi negli animali che occupano le posizioni di vertice della rete trofica, come i pesci. Per mitigare gli effetti negativi prodotti da un eccesso di metalli nei fluidi corporei le specie endemiche presentano adattamenti fisiologici come la presenza di proteine speciali 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 fornendo protezione contro lo stress ossidativo (Lin, 2017).

Lo scopo di questa tesi è quello di determinare la concentrazione di MT e i livelli di espressione dei geni codificanti per esse in uno specifico organismo endemico dell'Antartide, *Trematomus eulepidotus*, esposto in condizioni controllate di laboratorio a 100µg/l di Cd o Cu.

L'analisi dell'espressione è stata effettuata in diversi organi quali cervello, gonadi, cuore e rene, allo scopo di determinare risposte tessuto-specifiche che possano essere correlate alla fisiologia di questi animali. I risultati ottenuti costituiscono una base di partenza per poter utilizzare l'espressione delle MT come bioindicatori sia di esposizione ai metalli presi in considerazione sia di stress ossidativo, vista la nota funzione antiossidante svolta da queste proteine.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Organismi utilizzati

Gli organismi presi in considerazione per questo studio appartengono alla specie *Trematomus eulepidotus* e provengono da campionamenti effettuati nei pressi della stazione italiana Mario Zucchelli che si affaccia sul 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 dove sono stati allestiti tre gruppi sperimentali, uno di controllo, uno con animali esposti a 100 µg/l di Cd (sotto forma di CdCl₂) e uno con animali esposti a 100µg/l di Cu (sotto forma di CuCl₂). Dopo dieci giorni, gli esemplari sono stati sacrificati per l'isolamento di organi e tessuti, che sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e stoccati a -80°C per l'invio in Italia. I campioni sono stati conservati presso il Complesso Vallisneri a -80°C.

3.2 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto da due tessuti, gonadi e cervello. Per ogni tessuto sono stati utilizzati i campioni provenienti da 4 individui. Dopo aver prelevato una piccola porzione di tessuto, è stato utilizzato il reagente Trizol (Invitrogen) per l'estrazione dell'RNA totale. Il Trizol è un composto contenente guanidina isotiocianato, che ha la proprietà di lisare le cellule, e fenolo, che serve per la successiva estrazione fenolo-cloroformio dell'RNA. Dopo l'aggiunta di cloroformio, che permette la separazione degli acidi nucleici dal resto della soluzione, e centrifugazione a freddo, si formano tre fasi a diversa densità: sul fondo rimane il Trizol in cui si trovano vari componenti cellulari quali proteine e organelli, nella fase intermedia si trova il DNA, mentre nella soluzione acquosa superiore si trova l'RNA totale. Quest'ultimo è stato prelevato e fatto precipitare per aggiunta di alcool isopropilico. Il pellet contenente l'RNA totale è stato lavato con etanolo al 75%, lasciato asciugare e risospeso in acqua RNase free, scaldato a 40°C per 5 min e ricentrifugato a freddo.

Il surnatante ottenuto dopo la centrifugazione viene trasferito in una provetta e precipitato con l'aggiunta di 1/3 di volume di LiCl 8M, che permetta la precipitazione dell'RNA, ma non del DNA, le proteine o i nucleotidi trifosfati liberi. Il campione viene

così lasciato overnight a 4°C. Il giorno seguente il campione di RNA estratto viene nuovamente centrifugato e sottoposto a due lavaggi successivi con etanolo al 75%, risospeso in acqua RNase free e scaldato a 55°C per 10 min.

3.3 Analisi della purezza dell'RNA

La stima della qualità dell'estrazione è stata fatta tramite Nanodrop, uno spettrofotometro UV-VIS, utilizzando 1 µl di campione. L'analisi è avvenuta osservando i rapporti di assorbanza 260/230 e 260/280: per quanto riguarda il primo rapporto valori indicativi di una buona estrazione sono compresi rispettivamente tra 1,8 e 2,2. Se minore di 1,8 è indice di contaminazione da solventi organici (fenolo, Trizol) e carboidrati. Per quanto riguarda il rapporto 260/280, i valori devono essere circa 2,2. Risultati minori di questo valore sono indice di contaminazione da proteine.

3.4 Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA

L'RNA estratto è stato retrotrascritto in cDNA mediante il kit "cDNA synthesis kit" di Biotechrabbit, allestendo una mix dei componenti:

- 2,0 µl dNTP Mix
- 0,5 µl RNase Inhibitor
- 0,5 µl Oligo (dT)
- 4,0 µl 5X cDNA Synthesis Buffer
- 1,0 µl RNA tot (campione)
- 1,0 µl Reverse Transcriptase
- 11,0 µl PCR Grade Water

Per un volume totale di 20,0 µl.

Le mix così prodotte sono poi state incubate in termociclatore per 1 ora a 50°C perché avvenisse la retrotrascrizione e per 5 minuti a 99°C per inattivare gli enzimi.

3.5 Primers utilizzati per l'amplificazione del cDNA

I primer utilizzati per l'amplificazione delle sequenze codificanti le due isoforme di MT ed il gene housekeeping *gapdh* sono (Tab. 1):

Tabella 1. Sequenze dei primer utilizzati

Primer	Sequenza nucleotidica
MT-1 Fw	5'-GGACCTGCAACTGGGGAG-3'
MT-1 Rv	5'-CTTTGCACACACAGCCAGAG-3'
MT-2 Fw	5'-ACAACACGCTCTCATCTGA-3'
MT-2 Rv	5'-AGTTGCAGGTCCCACCTTTTG-3'
Gapdh Fw	5'-AAGTATGACTCCACCCACGG-3'
Gapdh Rv	5'-ATGTTAGCGGGGTCCTTCTC-3'

3.6 PCR quantitativa (qRT-PCR)

Una volta confermato l'appaiamento dei primer, è stata effettuata una qRT-PCR per l'analisi effettiva dei campioni. Il kit utilizzato è stato il "2x qPCR SyGreen Mix Separate ROX" di PCRBIOSYSTEMS. Le dosi utilizzate sono le seguenti:

- 5,0 µl di Mix (2x qPCRBIO SyGreen Mix No-ROX + ROX Additive)
- 1,0 µl Fw Primer
- 1,0 µl Rv Primer
- 1,5 µl cDNA (campione)
- 1,5 µl PCR grade water

Per un volume totale di 10 µl.

Con questo procedimento è stata analizzata l'espressione dei geni *mt-1* e *mt-2* nei campioni di gonadi e cervello di individui di *Trematomus eulepidotus* sottoposti a esposizione a Cu e Cd. I dati ottenuti sono stati normalizzati utilizzando il gene housekeeping *gapdh*.

Il gene housekeeping codifica proteine coinvolte in processi fondamentali per la vita della cellula e normalmente viene sempre espresso, indipendentemente dalle condizioni a cui è sottoposto l'organismo. Risulta dunque ideale per normalizzare l'espressione di geni che vengono espressi diversamente in relazione alle diverse condizioni ambientali.

Per ogni campione si sono ottenute una curva di amplificazione e una di dissociazione. La curva di amplificazione descrive la quantità di segnale ricevuta dallo strumento in funzione del numero di cicli di PCR. Minore è il numero di cicli

necessari per il raggiungimento della fase di crescita della curva, maggiore è la concentrazione di analita all'interno del campione.

La curva di dissociazione serve invece per verificare la specificità di amplificazione della qRT-PCR. Essa viene a formarsi in seguito all'aumento incrementale della temperatura al termine dell'amplificazione, la quale causa la denaturazione del cDNA. I reagenti presenti nel campione emettono un segnale solo quando sono legati a un doppio filamento di cDNA; dunque, a mano a mano che la temperatura aumenta, il segnale prodotto dal campione e registrato dallo strumento tenderà a diminuire. La diminuzione di tale feedback consente di determinare la curva di dissociazione, di cui viene poi plottata la derivata negativa per ottenere un grafico a picco. Il punto di massimo (temperatura di melting, T_m) rappresenta la temperatura a cui il 50% del cDNA è stato denaturato.

Per analizzare i dati è stato usato il metodo $\Delta\Delta Ct$ (o "metodo Livak"). Questo è un metodo di quantificazione relativa e la procedura consiste in più step. Si calcola inizialmente la differenza di espressione tra il gene di interesse (*mt-1* e *mt-2*) e quello di housekeeping (*gapdh*) ($\Delta Ct = Ct_{mt-1} - Ct_{gapdh}$) per ogni campione dei due tessuti per ogni individuo alle due diverse temperature.

Successivamente, per calcolare il $\Delta\Delta Ct$, si confronta il ΔCt del campione incognito con uno di riferimento (la media tra ΔCt) ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{campione} - \Delta Ct_{rif}$). Infine, si applica la formula per ottenere il rapporto di espressione, che quantifica l'incremento (o decremento) del gene target rispetto al riferimento e normalizzato rispetto al gene housekeeping.

3.7 Trattamento campioni e dosaggio metallotioneine

I campioni sono stati scongelati, e mantenuti in ghiaccio per prevenire lo shock termico. Successivamente i campioni sono stati pesati con l'ausilio 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 μ L di Leupeptina, 30 μ L di PMSF e 2 μ L 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 21.000 rpm a 5°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.

Il dosaggio delle metallotioneine è stato effettuato tramite la metodica di saturazione dell'argento (Scheuhammer e Cherian, 1986). Sono state allestite una serie di provette di vetro contenenti i campioni e i bianchi in duplicato. All'interno di queste provette è stata inserita una quantità di campione (trattato secondo il metodo descritto nel paragrafo 3.1) pari a 20 µL, 780 µL di glicina, e infine 500 µL di Ag 20 ppm. Nei bianchi, al posto del campione, è stato utilizzato un volume uguale di soluzione tampone. Le provette sono state sottoposte ad agitazione con il Vortex e lasciate incubare per dieci minuti. Sono stati poi aggiunti 100 µL di emoglobina e di nuovo agitate. Dopodiché le provette sono state immerse in un bagno caldo per due minuti e poi 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 è stato infine trasferito in provette Eppendorf messe in una centrifuga (modello 5415D) a 18.000 rpm per mezz'ora all'interno di una stanza a 4°C.

Il metodo di saturazione dell'argento si basa sulla maggiore affinità dell'Ag rispetto ad altri metalli verso le MT e sulla termostabilità delle MT. L'emoglobina serve a legare l'Ag presente in eccesso e il trattamento a caldo a far precipitare la stessa nonché altre eventuali altre molecole, lasciando in soluzione solo l'Ag legato alla MT. (Bienengraber et.al, 1995).

Il surnatante è quindi stato analizzato per determinare la quantità di Ag presente attraverso lo spettrofotometro di massa ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy). Per calcolare la concentrazione di MT si assume 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:
$$MT(\mu\text{g/mL})x = \frac{(A - B) \cdot 3,55 \cdot V_{\text{finale}}}{V_{\text{campione}}}$$

Dove:

A: Concentrazione media di Ag nel campione, espressa in µg/mL.

B: Concentrazione media di Ag nei bianchi, espressa in µg/mL.

VFinale: Volume finale nella provetta (1,6 mL)

VCampione: Aliquota di campione utilizzata nel dosaggio

3.8 Determinazione del contenuto di proteine totale

La determinazione del contenuto di proteine totali è stata svolta tramite il metodo di Lowry (1951), che si basa sull'utilizzo del reagente di Folin (Peterson, 1979).

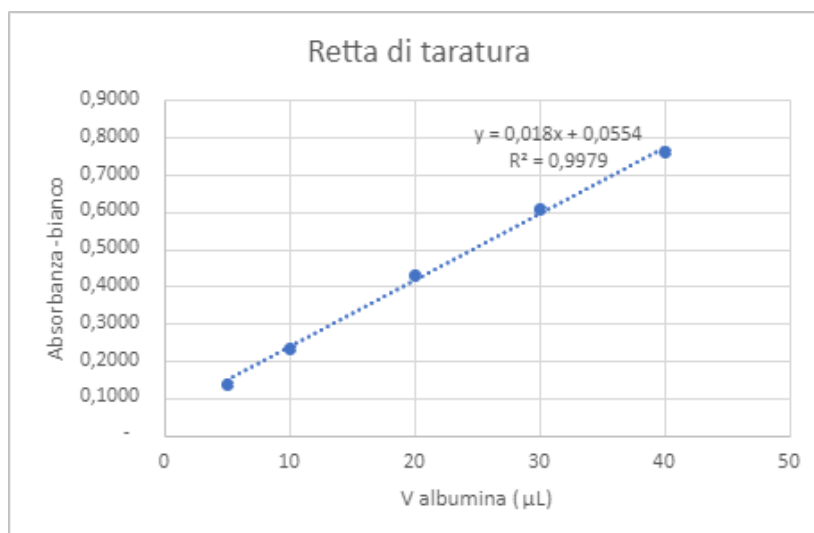
Preparazione reattivi:

- Soluzione A (per 1L): 4 grammi di NaOH e 20 grammi di Na_2CO_3 portate a volume con acqua MilliQ;
- Soluzione B (per 100 mL): 1 grammi di sodio citrato ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e 0,5 grammi di CuSO_4 ;
- 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.

Per la determinazione del contenuto di proteine totali, è stata costruita una retta di taratura utilizzando concentrazioni note di albumina (5, 10, 20, 30 e 40 μg) come proteina di riferimento. Sono state allestite una serie di provette contenenti 4 μL di supernatante di ogni campione a cui sono stati aggiunti 196 μL di acqua milliQ.

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 quindi possibile calcolare la concentrazione delle proteine totali all'interno dei campioni, utilizzando l'equazione della retta di taratura precedentemente calcolata.

La metodica si basa sull'utilizzo del reagente di Folin. Mediante l'introduzione della soluzione C, le proteine presenti nel campione si uniscono al solfato di rame (CuSO_4), dando origine a complessi Cu-Proteina. Successivamente, il reagente di Folin-Ciocalteu contenuto nella soluzione D, a contatto con i complessi Cu-Proteina, subisce una riduzione che porta alla caratteristica colorazione blu della procedura. (Peterson, 1979).



3.9. Contenuto di metallotioneine rispetto alle proteine totali

Una volta ottenute le concentrazioni di MT con il metodo di saturazione dell'Ag, e le concentrazioni delle proteine totali attraverso il metodo di Lowry, si calcolano ora i µg di MT su mg di proteine totali attraverso il seguente rapporto:

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

3.9.1 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate usando il programma Primer.exe. Le indagini utilizzate sono state di due tipi: il test di Student e l'analisi varianza ad una via (ANOVA). Il test di Student, noto anche come t-test, è uno strumento che può essere utilizzato per determinare se è presente 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.

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 $p \leq 0.05$, seguiva il test di Student-Newman-Keuls un test per confronti multipli usato per indagare le differenze che esistono fra un insieme di medie e quindi individuare tra quali campioni era presente una differenza statisticamente significativa.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Espressione genica nel cervello

Nel cervello il trattamento ha prodotto risultati diversi a seconda del metallo al quale l'organismo è stato esposto (figura 4). Nello specifico l'esposizione a Cu non porta a significative variazioni dei livelli di espressione di nessuna delle due isoforme, mentre l'esposizione a Cd produce un incremento significativo ($p < 0,05$) del messaggero per *mt-1* pari al doppio del controllo, mentre non vi è alcuna differenza statisticamente significativa per *mt-2* anche se sembrerebbe esserci un aumento: la mancata significatività statistica potrebbe essere dovuta alla scarsa numerosità. È pertanto un dato che andrà verificato.

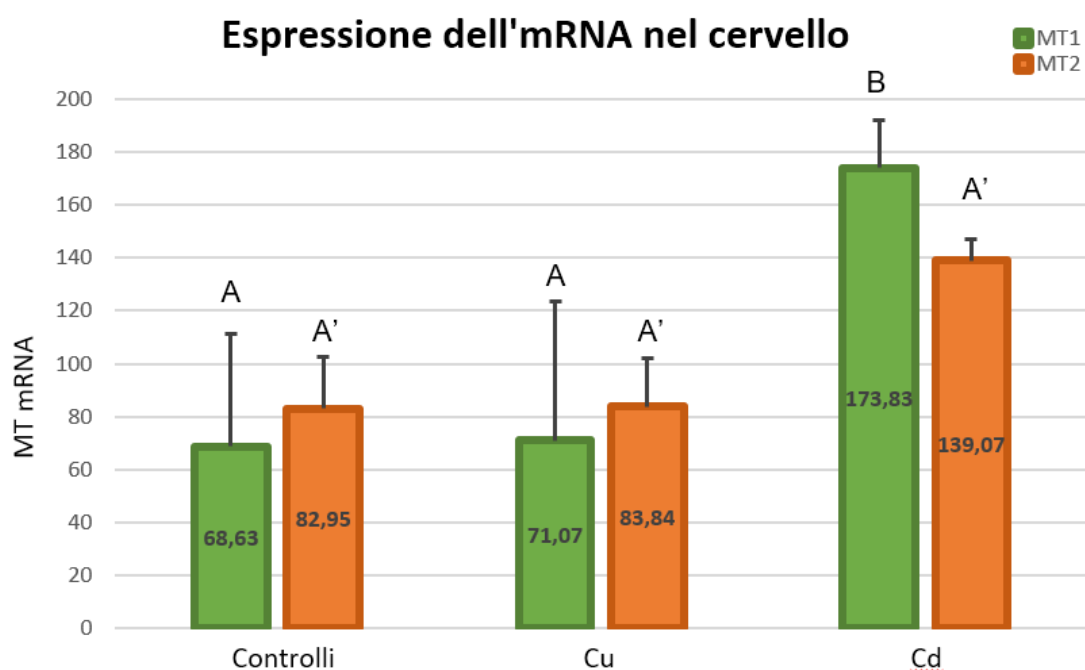


Figura 4 - Livelli di espressione del gene di *mt-1* e *mt-2* nel cervello. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard, $n=3$ per Cd e $n=4$ per Cu e C. Lettere differenti rappresentano differenze statisticamente significative per $p < 0,05$.

Interessante è il confronto tra messaggero e contenuto di proteina tradotta. Studi precedenti hanno mostrato un contenuto di MT negli individui di controllo pari a quello determinato negli individui trattati con Cu, mentre gli individui trattati con Cd

mostravano un contenuto inferiore (figura 5) (tesi di laurea di Boccalini e Trapasso, 2022).

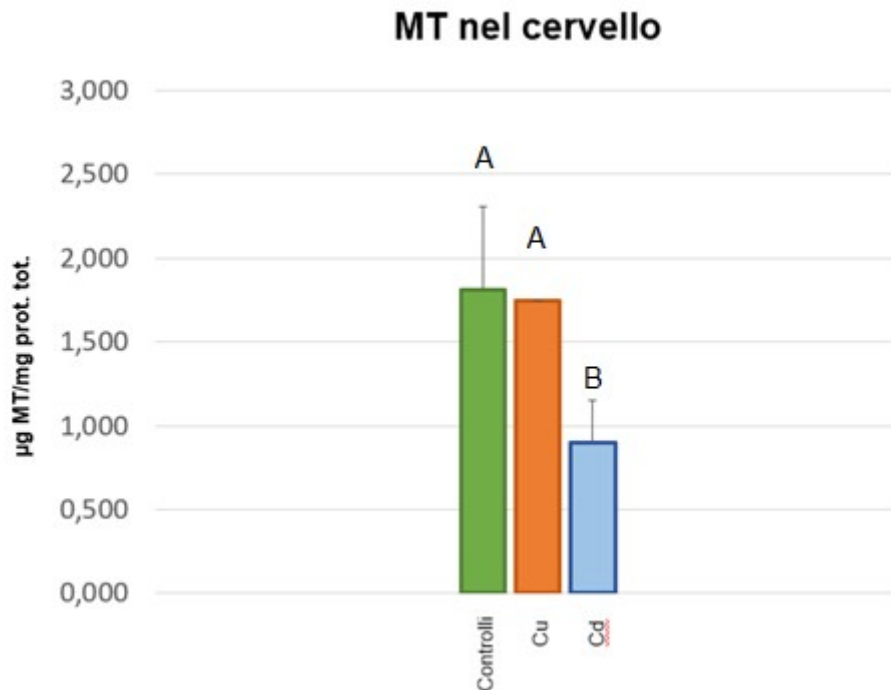


Figura 5 - contenuto di MT, espressa come µg/mg di proteine totali, nel cervello. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard, n=4. Lettere differenti presentano differenze statisticamente significative tra i diversi tessuti all'interno dello stesso gruppo per $p < 0,05$.

4.2 Espressione genica nelle gonadi

Anche nelle gonadi il trattamento porta a livelli di espressione diversi per ciascun metallo (figura 6). L'esposizione a Cu non porta a differenze statisticamente significative dei livelli di espressione delle due isoforme. L'esposizione a Cd invece produce un incremento di circa 3 volte ($p < 0,05$), dell'accumulo del messaggero sia per *mt-1* che per *mt-2* rispetto ai controlli.

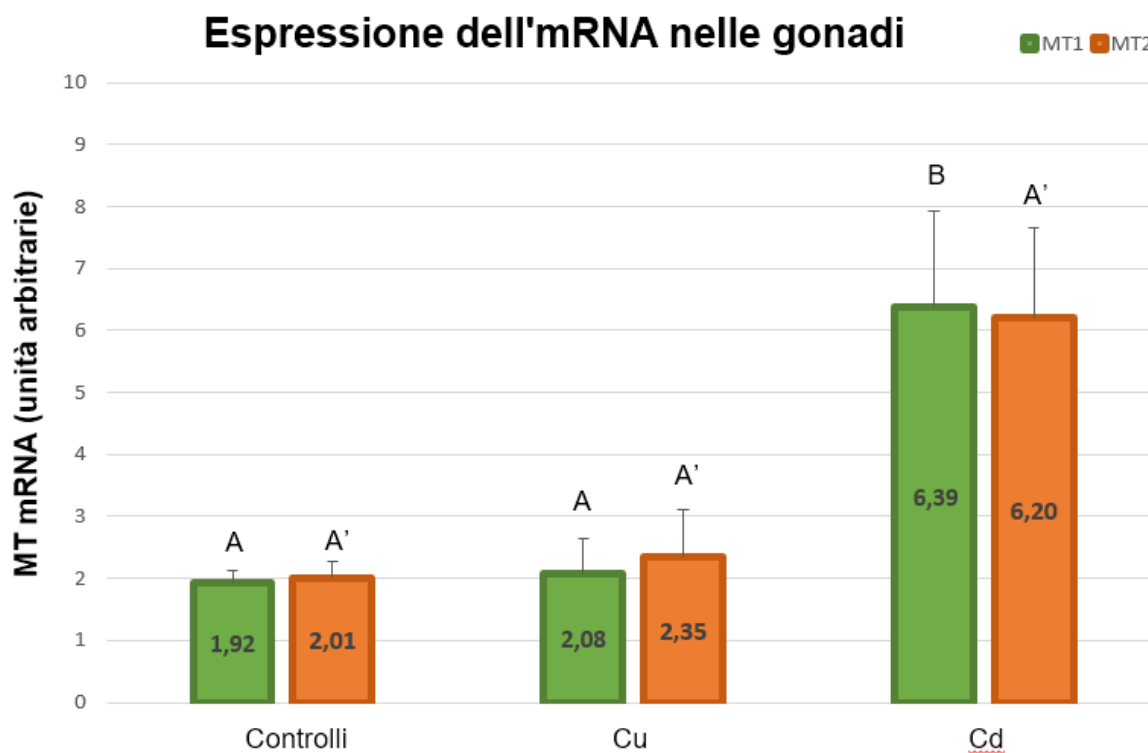


Figura 6 - Livelli di espressione del gene di *mt-1* e *mt-2* nelle gonadi. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard, n=4. Lettere differenti rappresentano differenze statisticamente significative per $p < 0,05$.

Il contenuto di MT, determinato sempre in studi precedenti, mostra un decremento statisticamente significativo tra controlli e trattati a Cd, e un contenuto inferiore, seppur non significativo anche per il trattamento Cu (tesi di laurea di Boccalini e Trapasso, 2022) (figura 7).

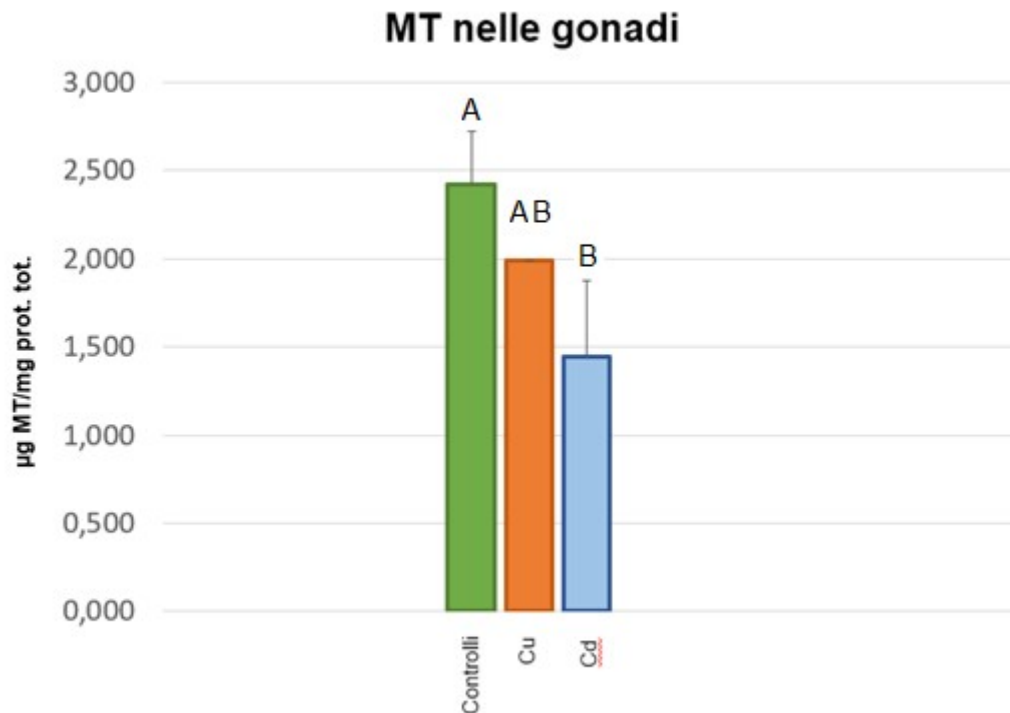


Figura 7 - contenuto di MT, espressa come µg/mg di proteine totali, nelle gonadi.

Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard, n=4. Lettere differenti rappresentano differenze statisticamente significative tra i diversi tessuti all'interno dello stesso gruppo per $p < 0,05$.

4.4 Contenuto di MT nel rene

Nel rene il contenuto di MT (figura 8) risulta non essere statisticamente diverso nei tre gruppi, anche se il gruppo esposto a Cu ha un contenuto di MT che è circa la metà di quello determinato nel controllo. Questo è probabilmente dovuto alla bassa numerosità e alla variabilità individuale come dimostrato dagli alti valori della deviazione standard.

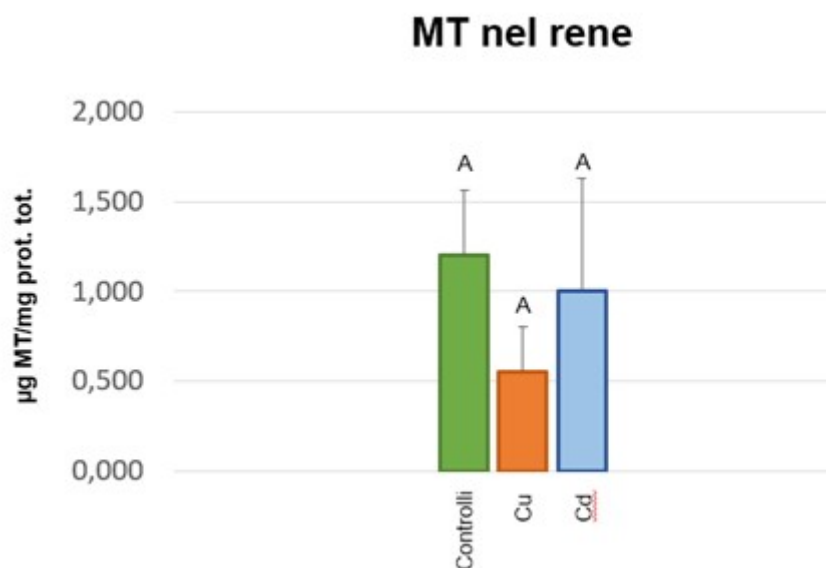


Figura 8 - contenuto di MT, espressa come µg/mg di proteine totali, nel rene. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard, n=4. Lettere differenti rappresentano differenze statisticamente significative tra i diversi tessuti all'interno dello stesso gruppo per p<0,05.

L'espressione del messaggero totale riscontrato in precedenti studi su organismi trattati (somma delle due isoforme *mt-1* e *mt-2*) risulta essere rispettivamente di 30 e 56 volte circa rispetto al valore dei controlli (tesi di Carnera, 2021) (figura 9)

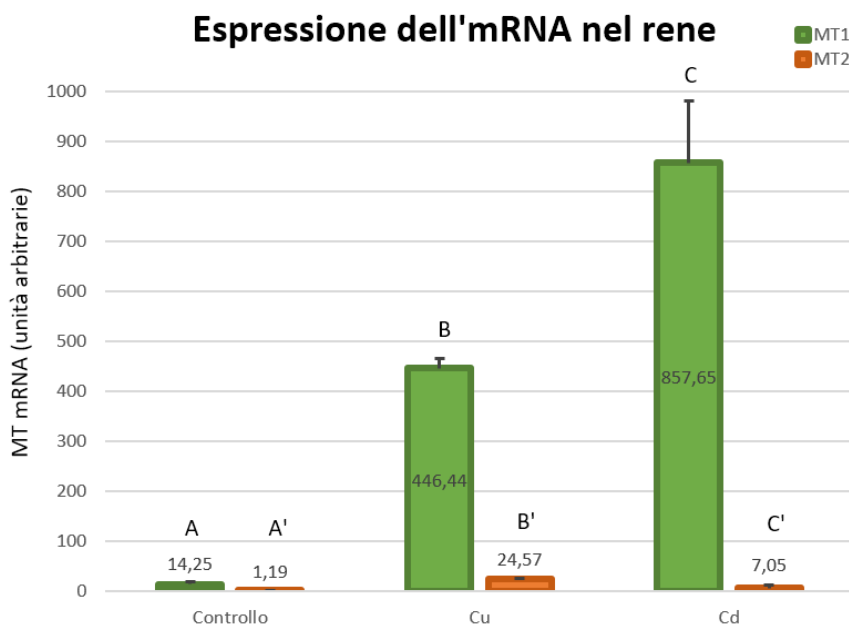


Figura 9 - Livelli di espressione del gene di *mt-1* e *mt-2* nel rene. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard, n=4. Lettere differenti rappresentano differenze statisticamente significative per p<0,05.

Come abbiamo notato finora, non sempre c'è una correlazione positiva tra espressione genica e sintesi di MT, questo probabilmente perché gli organismi che si trovano a vivere in condizioni sfavorevoli, ma senza che sia presente uno stress acuto, hanno sviluppato un controllo post-trascrizionale dell'espressione genica delle proteine antistress, quali enzimi antiossidanti e le stesse metallothioneine, basato sugli *stress granules*. Essi sono dense aggregazioni citoplasmatiche prive di membrana, con dimensioni comprese tra 0,1 e 0,2 μm , composti da ribonucleoproteine messaggere, fattori di inizio della traduzione e proteine leganti l'mRNA, le quali agiscono bloccando la traduzione dei messaggeri ed aumentando la loro stabilità (Anderson e Kedersha, 2009; Lavut e Raveh, 2012). Questa condizione permette quindi una risposta molto rapida da parte dei tessuti nei confronti dell'improvviso manifestarsi di uno stress acuto, nel caso specifico con una maggiore biosintesi delle proteine antistress.

4.5 Contenuto di MT nel cuore

Anche nel cuore il contenuto di MT (figura 10) risulta non essere statisticamente diverso nei tre gruppi anche se c'è un leggero calo tra controlli e trattamenti.

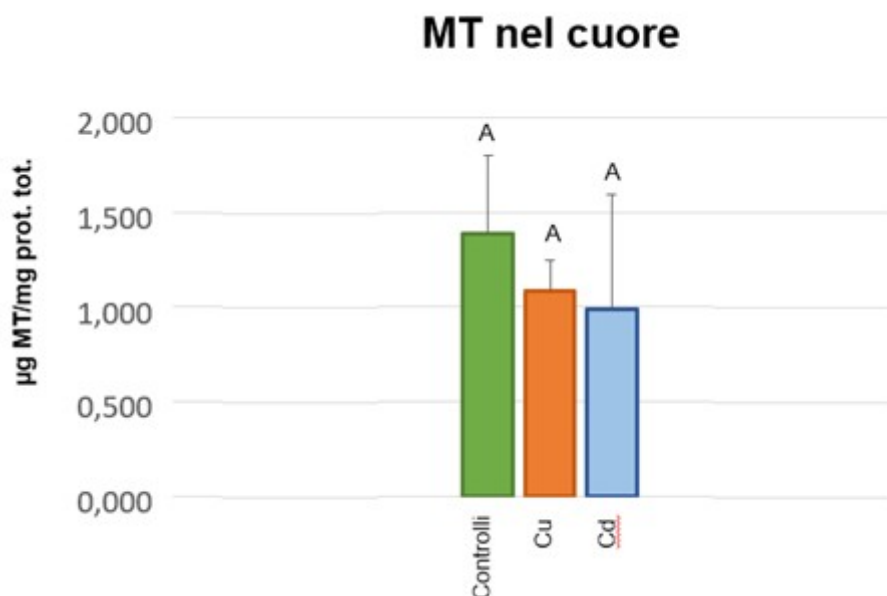


Figura 10 - contenuto di MT, espressa come $\mu\text{g}/\text{mg}$ di proteine totali, nel cuore. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard, $n=4$. Lettere differenti rappresentano differenze statisticamente significative tra i diversi tessuti all'interno dello stesso gruppo per $p<0,05$.

Per quanto riguarda il cuore però, abbiamo una corrispondenza tra l'espressione e la sintesi di MT. Possiamo infatti notare come nel lavoro di Carnera (figura 11) ci sia un decremento statisticamente significativo per *mt-1* sia nell'esposizione a Cu che a Cd, e cala, seppur non in modo significativo, anche l'espressione di *mt-2*. Si può ipotizzare quindi che questo mancato aumento di trascrizione di geni codificanti le MT a seguito del trattamento con i due metalli, sia dovuto al limitato accumulo di questi metalli nel cuore. Data la bassa concentrazione di MT in questo muscolo, si può supporre che questo mancato aumento di trascrizione sia in relazione alla minore attività locomotoria degli animali nelle condizioni di stabulazione, con la rispettiva riduzione del metabolismo basale. Questo non è correlabile alla funzione chelante delle MT, ma alla loro capacità antiossidante. Infatti, diminuendo il consumo di ossigeno diminuisce anche la probabilità di formazione delle ROS e quindi la necessità di sintetizzare molecole antiossidanti quali le MT.

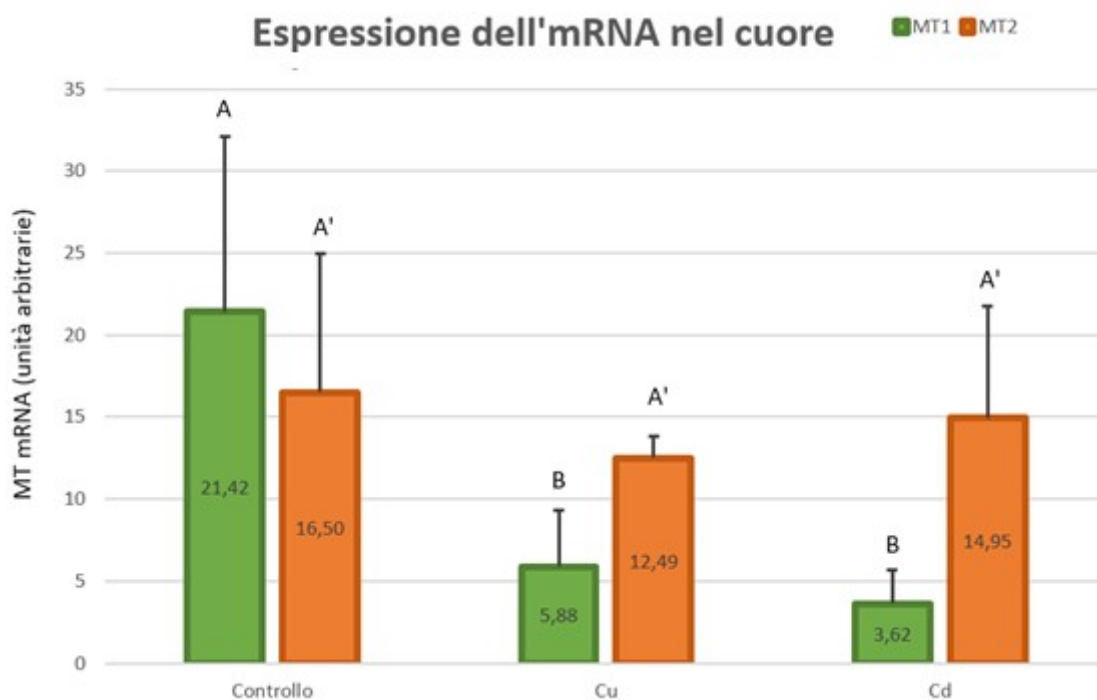


Figura 11 - Livelli di espressione del gene di *mt-1* e *mt-2* nel cuore. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard, n=4. Lettere differenti rappresentano differenze statisticamente significative per p<0,05.

Questi dati sono in linea con il muscolo bianco analizzato da Trapasso e Boccalini (figura 12) in cui hanno riscontrato un decremento del contenuto di MT nei trattamenti rispetto ai controlli. Questo è probabilmente dovuto al ruolo svolto dalle MT che sono in questo caso utilizzate per la loro proprietà antiossidante e non per la capacità chelante i metalli.

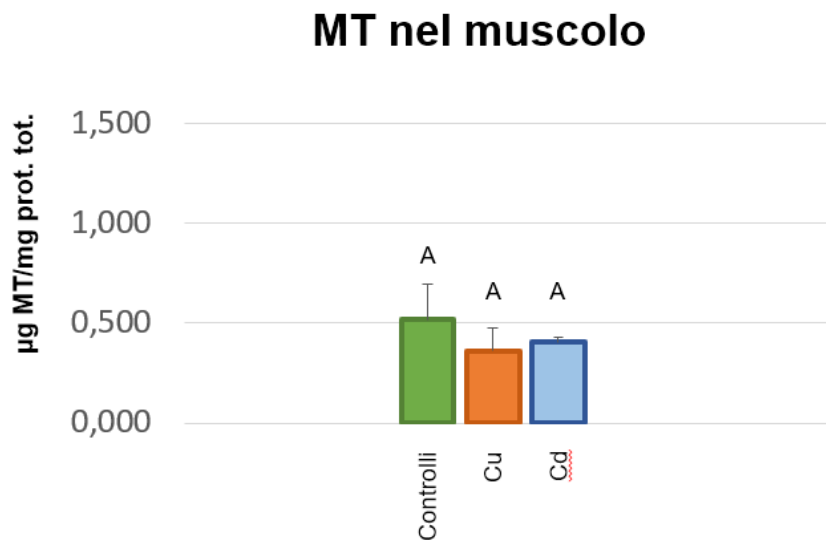


Figura 12 - contenuto di MT, espressa come µg/mg di proteine totali, nel muscolo. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard, n=4. Lettere differenti rappresentano differenze statisticamente significative tra i diversi tessuti all'interno dello stesso gruppo per $p < 0,05$.

5 CONCLUSIONI

L'inquinamento del mare causato dall'eccessiva presenza dei metalli ed i loro composti è attualmente una delle forme di contaminazione ambientale maggiormente sotto attenzione, soprattutto a causa della tossicità che queste sostanze possono produrre negli organismi. I metalli più pericolosi in mare sono cromo, cadmio, rame e piombo e il loro impatto negativo è dovuto anche alla loro scarsa degradabilità che può provocare bioaccumulo e biomagnificazione lungo gli anelli della catena trofica.

L'esposizione a livelli tossici di contaminanti metallici può causare agli organismi marini danni a tessuti, ma anche incapacità di rigenerazione del tessuto danneggiato, inibizione della crescita e danni al DNA.

La presenza di queste sostanze può sembrare una minaccia importante per le specie che vivono in questi ambienti, ma dobbiamo ricordare anche che gli organismi marini possiedono vari sistemi di difesa contro gli effetti negativi prodotti dalla presenza di questi contaminanti all'interno delle loro cellule, fra i quali le metallotioneine che risultano essere tra i più importanti oltre che tra i più interessanti e studiati.

In questo studio abbiamo rivolto la nostra attenzione verso organismi provenienti da un ambiente peculiare, l'Antartide. Il motivo è che le acque costiere di questo continente possiedono concentrazioni relativamente alte di alcuni metalli a causa di una condizione naturale risultato della storia geologica dell'Antartide, oltre che all'impatto antropico che sta diventando un pericolo sempre più crescente. Risulta quindi interessante studiare le risposte fisiologiche che gli organismi come il teleosteo antartico *T. eulepidotus* hanno sviluppato nel corso della loro evoluzione.

I risultati ottenuti concludono parte di un progetto riguardante i pesci antartici *Trematomus eulepidotus* che potrebbe essere implementato da studi futuri su altri organi o con la determinazione del contenuto effettivo di metalli accumulato nei tessuti. L'insieme dei risultati emersi rappresenta quindi un incremento delle conoscenze funzionali dei pesci antartici, ma costituiscono anche 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 del fragile ambiente marino antartico.

6 BIBLIOGRAFIA

- Al-Yousuf M.H., El-Shahawi M.S., Al-Ghais S.M. (2000). Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. *Sci. Total Environ.* 256, 87-94.
- Bargelloni L., Scudiero R., Perisi E., Carginale V., Capasso C., Patarnello T. (1999). Metallothioneins in Antarctic fish: evidence for independent duplication and gene conversion. *Mol. Biol. Evol.* 16(7), 885-897.
- 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). *Biol. Trace Elem. Research*, 141, 150-158.
- Bienengraber, M., Forderkuz, S., Klein, D., & Summer, K. H. (1995). Determination of Cu-containing metallothionein: comparison of Ag saturation assay, thiomolybdate assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal. bioc.*, 228, 69-73.
- Boccalini, N. (2022). Determinazione del contenuto di metallothioneine nel teleosteo antartico *Trematomus eulepidotus* esposto a cadmio. Tesi di Laurea triennale in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente, Università degli studi di Padova.
- Brooks, S. J., & Waldock, M. (2009). Copper biocides in the marine environment. In *Ecotoxicology of antifouling biocides* (pp. 413-428). Springer, Tokyo.
- Bueno, C., Kandravicius, 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, 1-11.
- Campenhout K.V., Infante H.G., Adams F., Blust R. (2004). Induction and binding of Cd, Cu and Zn to metallothionein in carp (*Cyprinus carpio*) using HPLC-ICPTOFMS. *Toxicol. Sci.* 80, 276-287.
- Canli M., Kalay M., Ay O. (2001). Metal (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, Cr, Ni) concentrations in tissues of a fish *Sardina pichardus* and prawn *Penaeus japonicus* from three stations on the Mediterranean Sea. *Bull. Env. Cont. Tox.* 67, 75-82.
- 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.
- Cervellati R., Marsico B. (1993). Italia in Antartide ENEA Progetto Antartide, Roma, Italia.
- 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, 1378-1384.

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. *Biol. Reviews*, 83, 103-117.

Daane, J. M., & Detrich III, H. W. (2022). Adaptations and Diversity of Antarctic Fishes: A Genomic Perspective. *Annual Review of An. Bios.*, 10, 39-62.

Danovaro, R. *Biologia marina. biodiversità e funzionamento degli ecosistemi marini*; De Agostini Scuola, Novara (2019), 391-393.

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 Env. Research*, 60, 1-33.

Devries A.L., Eastman J. T. (1978). Lipid sacs as buoyancy adaptation in an Antarctic fish. *Nature*. 271, 352-353.

Di Prisco G. (1997). Physiological and biochemical adaptations in fish to a cold marine environment. In “Antarctic communities: species, structure and survival”, Battaglia B., Valencia J., Walton D. W. H. Cambridge University Press, Cambridge. 251-260.

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*). 165-173.

Eastman, J. T. (2005). The nature of the diversity of Antarctic fishes. *Polar biology*, 28, 93-107.

Eastman, J. T., & Hubold, G. (1999). The fish fauna of the Ross Sea, Antarctica. *Antarctic Science*, 11, 293-304.

Farkas A., Salanki J., Specziar A. (2003). Age and size-specific patterns of heavy metals in the organs of freshwater fish *Abramis brama* L. populating a low contaminated site. *Water Res.* 37, 959-964.

Fields, L. G., & DeVries, A. L. (2015). Variation in blood serum antifreeze activity of Antarctic Trematomus fishes across habitat temperature and depth. *Comp. Bioc. and Phys. Part A: Mol. & Int. Phy.*, 185, 43-50.

Handy, R. D. (2003). Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comp. Bioc. and Phys. Part A: Mol. & Int. Phy.*, 135, 25-38.

Hinkle P., Kinella P.A., Osterhoudt K.C. (1987). Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.* 262, 16333-16337.

Kock K.H., Everson I. (1998). Age, growth and maximum size of Antarctic Notothenoid fish – revisited – in “Fish of Antarctica, A Biological overview”, Di Prisco G., Pisano E., Clarke A. Eds. Springer-Verlag Italia.

- Komjarova, I., & Bury, N. R. (2014). Evidence of common cadmium and copper uptake routes in zebrafish *Danio rerio*. *Env. Scie. & tech.*, 48, 12946-12951.
- 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, 355-364.
- Lin C.H., John J.A.C., Ou L.W., Chen J.C., Lin C.H., Chang C.Y. (2004). Cloning and characterization of metallothionein gene in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Aquat. Toxicol.* 66, 111-124.
- Lowry, O. H. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- Matta J., Milad M., Manger R., Tosteson T. (1999). Heavy metals, lipid peroxidation and cigateratoxicity in the liver of the Carribean barracuda (*Sphyraena barracuda*). *Biol. Trace Elem. Res.* 70, 69-79.
- 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.
- 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. *Sci. of the Total Env.*, 775, 145829.
- Santovito, G., Piccinni, E., Boldrin, F., & Irato, P. (2012). Comparative study on metal homeostasis and detoxification in two Antarctic teleosts. *Comp. Bioc. and Phys. Part C: Tox. & Phar.*, 155, 580-586.
- Scheuhammer, A. M., & Cherian, M. G. (1986). Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Tox. and ap. phar.*, 82, 417-425.
- Trapasso, R. (2022). Contenuto di metallotioneine nel teleosteo antartico *Trematomus eulepidotus* esposto a rame. Tesi di Laurea triennale in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente, Università degli studi di Padova.
- Viarengo A., Burlando B., Ceratto N., Panfoli I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46, 407-417.
- Westerlund S., Ohman P. (1991). Cadmium, copper, nickel, lead and zinc in the water column of the Weddel Sea, Antarctica. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 55, 5127-5146.
- Yilmaz A.B. (2005). Comparison of heavy metal levels of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) and Sea Bream (*Sparus aurata* L.) caught in Iskenderun Bay (Turkey). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 257-262.