

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOLOGICHE, GEOLOGICHE E AMBIENTALI

SEZIONE BIOLOGIA ANIMALE “MARCELLO LA GRECA”

VERONICA MAZZEI

Bioaccumulo di cadmio e piombo
e biomarkers di esposizione e di effetto
in alcune specie di isopodi oniscidei (Crustacea)

—————
Tesi di Dottorato
—————

Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica - XXIV ciclo

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Maria Teresa Vinciguerra

Tutor: Chiar.mo Prof. Guglielmo Longo



2008 - 2011



*Quello che sappiamo è una goccia,
ciò che ignoriamo è un oceano!*

Isaac Newton

INDICE

Abstract

1. <u>Introduzione</u>	pag. 1
2. <u>Inquinamento da metalli pesanti</u>	» 6
2.1 Inquinamento da cadmio	» 7
2.1.1 Meccanismo d'azione	» 11
2.1.2 Impatto ambientale	» 12
2.2 Inquinamento da piombo	» 13
2.2.1 Meccanismo d'azione	» 16
2.2.2 Impatto ambientale	» 17
3. <u>Le Metallothioneine (MTs)</u>	» 19
3.1 Le metallothioneine dei vertebrati	» 20
3.2 Le metallothioneine dei crostacei	» 23
3.3 Le funzioni delle metallothioneine	» 25
4. <u>Le Hsp70 (Heat shock proteins)</u>	» 28
4.1 Regolazione ed espressione delle Hsp	» 31
5. <u>Biomonitoraggio ambientale</u>	» 34
5.1 Bioindicatori, bioaccumulatori e biomonitors	» 35
5.2 Biomarkers	» 36
5.3 Gli isopodi oniscidei come bioindicatori e bioaccumulatori	» 39
5.3.1 Epatopancreas ed accumulo di metalli pesanti	» 39
6. <u>Materiali e metodi</u>	» 42
6.1 Determinazione della concentrazione dei metalli pesanti	» 46
6.2 Indagini al microscopio elettronico a trasmissione	» 47
6.3 Indagini al microscopio elettronico a scansione	» 47
6.4 Indagini immunocitochimiche	» 48
6.4.1 Immunolocalizzazione delle metallothioneine	» 48
6.4.2 Immunolocalizzazione di Hsp70	» 49
6.5 Estrazione di RNA	» 49
6.6 Sintesi di cDNA	» 52
6.7 Reazione a catena della polimerasi (RT-PCR)	» 52
6.8 Disegno dei primers	» 52

7. Risultati	» 55
7.1 Indagini preliminari condotte su <i>Armadillidium granulatum</i>	» 55
7.1.1 Contenuto in metalli nelle fonti di cibo utilizzate.....	» 55
7.1.2 Contenuto in metalli negli animali trattati	» 55
7.2 Indagini su <i>Armadillidium granulatum</i> , <i>Armadillidium vulgare</i> e <i>Porcellio laevis</i>	» 59
7.2.1 Contenuto in metallo nella fonte di cibo utilizzata	» 59
7.2.2 Contenuto in metalli negli animali trattati	» 62
7.2.3 Indagini morfologiche, istologiche ed ultrastrutturali	» 62
a) <i>L'epatopancreas negli individui non trattati</i>	» 62
a.1 - <i>Le cellule B</i>	» 70
a.2 - <i>Le cellule S</i>	» 75
b) <i>L'epatopancreas negli individui esposti al cadmio</i>	» 80
b.1 - <i>Alterazioni ultrastrutturali a carico delle cellule B</i>	» 86
b.2 - <i>Alterazioni ultrastrutturali a carico delle cellule S</i>	» 91
c) <i>L'epatopancreas negli individui esposti al piombo</i>	» 102
c.1 - <i>Alterazioni ultrastrutturali a carico delle cellule B</i>	» 102
c.2 - <i>Alterazioni ultrastrutturali a carico delle cellule S</i>	» 108
7.3 Indagini immunocitochimiche	» 114
7.3.1 Immunolocalizzazione delle metallothioneine	» 114
7.3.2 Immunolocalizzazione di Hsp70	» 122
7.4 Indagini molecolari	» 125
8. Discussione	» 129
9. Conclusioni	» 143
10. Ringraziamenti	» 144
11. Bibliografia	» 146

ABSTRACT

Scopo della presente tesi di Dottorato è stato quello di valutare, utilizzando un protocollo sperimentale basato sulla somministrazione di cibo contaminato con diverse concentrazioni di due metalli pesanti, cadmio e piombo, la capacità di bioaccumulo e le conseguenti risposte biologiche fornite (biomarkers) da tre specie di isopodi oniscidei - *Armadillidium granulatum* Brandt, *Armadillidium vulgare* (Latreillei), *Porcellio laevis* Latreille - presenti ed abbondanti in diverse aree della Sicilia particolarmente interessate da fenomeni di inquinamento ambientale, al fine di verificare il loro possibile impiego in futuri programmi di biomonitoraggio.

Sono stati oggetto di indagine: a) l'accumulo dei metalli mediante impiego di spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS); b) le alterazioni morfologiche, istologiche ed ultrastrutturali indotte a carico dell'epatopancreas, principale organo di accumulo dei metalli; c) l'espressione di molecole indicatrici dello stress conseguente al bioaccumulo dei metalli, quali metallotioneine (MT) e heat shock proteins 70 (Hsp70) analizzata mediante metodi immunocitochimica; d) l'identificazione ed il sequenziamento del gene responsabile dell'espressione delle metallotioneine mediante indagini molecolari.

I risultati conseguiti hanno dimostrato che negli isopodi oniscidei, l'accumulo dei metalli si realizza in maniera correlata alla concentrazione utilizzata ma in modo variabile in relazione al metallo ed alla specie saggiata. Tutte e tre le specie isopodi hanno dimostrato, infatti, una capacità di accumulo del Cd spiccatamente superiore rispetto al Pb; *A. vulgare* è stata la specie capace del maggior accumulo di Pb, soprattutto alle concentrazioni più elevate del metallo somministrate, mentre *P. laevis*, ha mostrato la maggiore capacità di accumulo del Cd, tanto elevata da risultare letale per tutti gli individui trattati per la più alta concentrazione tra quelle saggiate.

La somministrazione delle concentrazioni più elevate di entrambi i metalli ha determinato sensibili alterazioni e della generale organizzazione morfologica ed istologica dei tubuli dell'epatopancreas e dell'organizzazione ultrastrutturale delle cellule dell'epitelio dell'organo, alcune delle quali potrebbero essere utilizzate quali efficaci biomarkers di esposizione.

L'impiego di anticorpi anti-MT ed anti-Hsp70 si è rivelato efficace ai fini di evidenziare la presenza delle MT e delle Hsp70 nell'epitelio dell'organo, apprezzabile in maniera differenziata per intensità e localizzazione in relazione al metallo considerato, aspetti che potrebbero rappresentare utili biomarkers di effetto.

Le indagini molecolari rivolte al sequenziamento del gene responsabile dell'espressione delle metallotioneine, basate su un protocollo già efficacemente impiegato per altre specie di invertebrati ivi compresi i crostacei decapodi, non hanno avuto successo a causa di una persistente contaminazione fenolica dell'RNA, estratto dal pool di epatopaneas.

In conclusione, la ricerca ha confermato quanto già noto circa l'eccellente ruolo che gli isopodi oniscidei possono ricoprire quali bioindicatori e bioaccumulatori dell'inquinamento da metalli pesanti evidenziando, inoltre, che la capacità di bioaccumulo si realizza in maniera specie-specifica nei confronti dei diversi metalli e che, pertanto, essa deve essere preliminarmente valutata in vista di un loro impiego nei programmi di biomonitoraggio.

1. INTRODUZIONE

L'incredibile sviluppo industriale e tecnologico registrato negli ultimi due secoli ha portato indubbi benefici sia in termini di aumento di qualità e aspettativa di vita nel mondo occidentale sia alimentando speranze di progresso nei paesi in via di sviluppo. Sfortunatamente, una così rapida evoluzione, soprattutto nei più grandi paesi asiatici, sta aumentando enormemente l'impatto delle attività umane sull'ambiente e, di conseguenza, sulla salute.

L'industrializzazione moderna e una economia fondata sulla continua incentivazione dei consumi di beni e servizi, non sempre indispensabili, spesso promuove sprechi e cattivi stili di vita (utilizzo smodato del mezzo di trasporto privato, produzione crescente di rifiuti, etc.). Il risultato è un progressivo aumento della pressione sull'ambiente, dovuta ai carichi crescenti di sostanze di ogni tipo immesse nell'aria, nell'acqua e nel suolo, l'esposizione alle quali può determinare effetti nocivi sulla salute degli organismi e dell'uomo.

Con il passare del tempo, inoltre, i fenomeni di inquinamento, che inizialmente davano luogo ad allarmi territorialmente localizzati, hanno incominciato ad interessare il pianeta a livello globale, raggiungendo anche le zone più remote, dove non vi sono insediamenti produttivi inquinanti.

Uno degli aspetti più drammatici con cui l'uomo si dovrà confrontare nell'immediato futuro è rappresentato dall'inquinamento del suolo e soprattutto delle acque, determinato dal crescente rilascio di "metalli pesanti", che non potendo essere degradati o distrutti tendono ad accumularsi nel suolo, nei sedimenti, nelle acque e negli organismi con conseguenti e consistenti rischi sia per le varie forme viventi sia per la salute dell'uomo, tramite il consumo di cibo in cui il contenuto di metalli contaminanti è significativamente elevato.

Negli ultimi decenni i metalli pesanti sono stati protagonisti di alcuni tra i più gravi episodi di inquinamento, con effetti disastrosi per l'ambiente e per la salute umana.

Tra gli esempi più eclatanti si annoverano:

✓ 1960-70: L'avvelenamento da mercurio organico nella baia di Minamata (Giappone), che si verificò in seguito allo scarico in mare di metilmercurio da

parte dell'impianto industriale Chisso Minamata per più di 30 anni, fino al 1966, contaminando animali e persone.

✓ 1986: Drammatico incendio allo stabilimento Sandoz di Basilea. All'origine del disastro vi è stata la necessità di spegnere il fuoco con acqua che poi rifluì nel fiume Reno, portando con sé rilevanti quantità di oltre una trentina di sostanze tossiche, tra cui un fungicida contenente mercurio, presenti in uno dei magazzini incendiati. Ci si accorse dell'evento soltanto perché uno dei prodotti chimici in questione era colorato con una sostanza rossa, che fu immediatamente visibile nelle acque del fiume. Da qui l'appellativo di "*Incidente del Reno rosso*".

Dall'inquinamento delle acque del Reno, all'interno delle quali tutti i pesci presenti morirono per una lunghezza di oltre 100 chilometri, furono interessate Svizzera, Germania e Olanda.

✓ 1998: In una diga in cemento utilizzata per il deposito di veleni chimici, di proprietà della compagnia Boliden Ltd, si creò una falla, e sette milioni di tonnellate di "fango tossico" si riversarono nella miniera di Aznalcóllar, adiacente all'area della diga, nel Coto de Doñana. La breccia creata era di 50 metri e rilasciò una massiccia ondata di residui tossici, con un fronte lungo 500 metri. Uccise tutto ciò che incontrò nel suo cammino e percorse il fiume Guadimar a una velocità di 1 Km/h. L'onda seguì la corrente, attraverso il Rio Guadimar e i canali artificiali, riversandosi nel golfo di Cadice e distruggendo qualsiasi forma di vita a causa dell'alta acidità dei residui tossici trasportati contenenti Pb, Cd, Zn, Cu e As nonché solfuri.

✓ Un esempio altrettanto eclatante riguarda purtroppo da vicino la Sicilia dove, nel territorio compreso nei comuni di Augusta, Priolo e Melilli, si sta da decenni realizzando un progressivo "disastro" ambientale i cui effetti drammatici sono già noti alla comunità scientifica e all'opinione pubblica ma la cui entità è senz'altro destinata a manifestarsi in tutta la sua sconvolgente dimensione nel prossimo futuro.

Il triangolo industriale Priolo - Augusta - Melilli ospita nel raggio di pochi chilometri ben 5 raffinerie: Esso, Agip (ex Montedison - Praoil), EniChem, Isab (gruppo Erg) e Condea (ex EniChem Augusta S.p.a.). La loro attività, associata a quella di altre imprese industriali, ha riversato nell'ambiente circostante

incredibili quantità di gas inquinanti, emissioni legate alla raffinazione di idrocarburi, reflui tossici, polveri di metalli pesanti come il nichel e il vanadio.

L'ultimo drammatico evento risale all'anno 2001, quando alcuni abitanti di Priolo presentarono un esposto alla Procura denunciando la presenza di una grossa macchia rossa nel mare di fronte allo stabilimento dell'Enichem. Gli investigatori scoprirono che da tempo, in quella zona, mercurio e altri inquinanti venivano scaricati direttamente in mare. Analisi successive, condotte dalla Procura di Siracusa, hanno dimostrato che il mercurio era presente nell'ambiente marino circostante in una percentuale 20.000 volte superiore alla soglia ritenuta tollerabile.

Gli effetti di tale incredibile livello di inquinamento, non solo sulla qualità dell'ambiente e sulla conservazione della biodiversità ma, ovviamente, anche sulla salute dell'uomo, sono oramai ben noti.

I risultati di diverse indagini condotte negli ultimi anni (Ramistella et al., 1990; Bianca et al., 2003; Bianchi et al., 2004; Nicosia, 2007) nel triangolo Priolo - Augusta - Melilli fanno temere un nuovo disastro ambientale: 1.000 neonati con gravi handicap fisici e mentali, per una media quattro volte superiore a quella nazionale; numerosissime gravidanze interrotte; tumori ai polmoni del 20% in più rispetto alle altre città siciliane; pesce contaminato, con una percentuale di mercurio superiore del 500% al limite ritenuto non pericoloso dalla legislazione vigente e con un altrettanto elevata presenza di nichel, piombo, arsenico etc..

✓ Infine, proprio recentemente, è stato reso noto all'opinione pubblica il gravissimo fenomeno di inquinamento della falda acquifera del fiume Ofanto e dell'area circostante l'inceneritore Fenice S.p.a. controllato dall'Electricité de France (EDF) con presenza nelle stesse di mercurio, nichel, cromo, piombo, tricloroetilene, tetracloroetilene, fluoruri, alifati clorurati cancerogeni etc., che ha determinato una serie di denunce per disastro ambientale e due ordinanze del comune di Melfi emanate già nel 2009 e tuttora in vigore, con le quali si fa assoluto "divieto di utilizzo, a qualsiasi scopo, delle acque sotterranee emungibili dai pozzi presenti all'interno del perimetro del sito dell'impianto di termovalorizzazione Fenice nonché di quelli a valle del sito stesso".

Da quanto sopra esposto scaturisce la necessità, nei siti soggetti a gravi fenomeni di inquinamento, di interventi immediati sia rivolti ad impedire la prosecuzione degli scarichi incontrollati sia ad imporre il rispetto delle norme di legge vigenti in termini di tutela dell'ambiente e della salute pubblica e a pianificare immediate azioni di bonifica del territorio con drastica riduzione dei livelli di inquinamento del suolo, dell'aria e delle acque.

Tali interventi dovrebbero essere preceduti dalla messa a punto di un quadro articolato ed approfondito dello stato dell'ambiente e della salute degli ecosistemi nel territorio interessato, quadro che potrebbe scaturire dalla realizzazione di un programma ad ampio respiro di biomonitoraggio ambientale che, rispetto agli altri metodi di monitoraggio, presenta diversi vantaggi quali, ad esempio, quello di consentire una rapida individuazione delle zone a rischio presenti nel territorio, e di fornire le conoscenze di base per una localizzazione ottimale delle centraline di rilevamento.

Nei programmi di biomonitoraggio appare particolarmente importante la scelta delle specie da utilizzare; la rilevante mole di dati scaturiti dalle numerose ricerche già effettuate a tale proposito suggeriscono che nel monitoraggio dell'ambiente terrestre risultano particolarmente efficaci come bioindicatori e bioaccumulatori specie appartenenti ai nematodi, insetti e isopodi oniscidei ed altri macroinvertebrati del suolo.

Gli isopodi oniscidei, in particolare, sono da tempo noti per la loro capacità di accumulare rilevanti quantità di metalli pesanti (Wieser et al., 1976; Hopkin et al., 1986; Dallinger et al., 1992) e di sopravvivere anche nelle aree fortemente interessate dalla presenza di metalli pesanti e pertanto essi sono ritenuti "perfetti" indicatori di tale tipo di inquinamento (Wieser et al., 1976; Hopkin e Martin, 1982, 1984; Martin e Coughtrey, 1982; Hunter et al., 1987; Hopkin, 1989; Paoletti e Hassal, 1999).

La capacità di accumulo dei metalli negli isopodi oniscidei sembra essere, però, specie-dipendente; ad es., individui di *Porcellio scaber* presentano una capacità di accumulo dello zinco doppia rispetto a quella riscontrata in individui di *Oniscus asellus* provenienti dallo stesso sito (Hopkin, 1990).

Appare, pertanto, opportuno effettuare la scelta delle specie da utilizzare in un programma di biomonitoraggio sulla base di una valutazione preliminare della loro capacità di accumulo dei diversi metalli e sulla conoscenza delle risposte biologiche date in risposta all'accumulo stesso (biomarkers).

Sulla base di quanto premesso ho ritenuto opportuno svolgere, quale oggetto della tesi di Dottorato, un'articolata indagine sperimentale rivolta a valutare la capacità di accumulo di due metalli pesanti, cadmio e piombo, in tre specie di isopodi terrestri - *Armadillidium granulatum* Brandt, *Armadillidium vulgare* (Latreille) e *Porcellio laevis* Latreille, presenti ed abbondanti in Sicilia ed in particolare nelle aree maggiormente interessate da massicci fenomeni di inquinamento ambientale - e le risposte da esse fornite in termini di biomarkers di esposizione e di effetto, con l'obiettivo finale di prevedere una loro possibile ed efficace utilizzazione in un futuro programma di biomonitoraggio ambientale.

In particolare, sono stati presi in considerazione:

- ✓ i quadri di alterazione dell'organizzazione morfologica, istologica ed ultrastrutturale dell'epatopancreas, principale organo interessato nell'accumulo dei metalli pesanti e nei conseguenti processi di detossificazione;
- ✓ il contenuto in metalli pesanti negli animali contaminati valutato con analisi condotte mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS);
- ✓ la presenza e la localizzazione nell'epatopancreas di metallotioneine (MTs) ed heat shock proteins (Hsp70), molecole che vengono espresse in risposta a fattori di stress, quali il bioaccumulo di metalli pesanti mediante impiego di metodi immunocitochimici;
- ✓ l'identificazione ed il sequenziamento del gene responsabile dell'espressione delle metallotioneine mediante indagini molecolari.

2. INQUINAMENTO DA METALLI PESANTI

Il termine “metalli pesanti” è utilizzato nella letteratura scientifica con significati spesso profondamente diversi. Una definizione restrittiva dal punto di vista chimico include in tale categoria solo quei metalli che hanno una densità maggiore rispetto a quella dei propri ossidi. Poiché tale definizione non è di facile impiego, i metalli pesanti spesso vengono definiti tali quando presentano una densità superiore a 4-5 g/cm³.

Dal punto di vista ambientale e per gli effetti che manifestano negli organismi, il termine “metalli pesanti” viene comunemente riferito a tutti i metalli o metalloidi che rappresentano un pericolo per la salute e per l’ambiente.

Morgan e Stumm (1991) hanno suggerito una lista di 14 metalli e metalloidi pericolosi: cromo, arsenico, cadmio, antimonio, piombo, rame, selenio, indio, mercurio, bismuto, zinco, argento, stagno e tallio. Tale lista non è oggi considerata definitiva. Lo sviluppo di nuove tecnologie porta infatti all’uso di nuovi materiali ed al rilascio nell’ambiente di altri metalli. Ad esempio, alcune recenti ricerche hanno dimostrato un incremento significativo nelle polveri atmosferiche e nei sedimenti marini costieri di elementi del gruppo del platino, causati dall’introduzione delle marmitte catalitiche. Sono stati segnalati, inoltre, alcuni casi di intossicazione determinati dalla presenza nell’ambiente di lantanidi (o altri elementi delle terre rare) legata al rilascio delle industrie litografiche; tali elementi trovano oggi impiego in una vasta gamma di applicazioni quali schermi televisivi, componenti elettronici e siderurgia.

Dal punto di vista ambientale, i metalli pesanti responsabili delle più significative problematiche sono rappresentati dal mercurio, cadmio, piombo e arsenico, in quanto essi sono:

- ✓ frequentemente utilizzati in processi industriali e nelle attività agricole;
- ✓ frequentemente rilasciati in siti dove gli uomini possono venire in loro contatto;
- ✓ tossici per l’uomo;
- ✓ responsabili di modificazioni significative dei cicli bio-geochimici.

Gli effetti dell'aumento della concentrazione di questi metalli sono stati amplificati dal concomitante aumento dell'acidificazione dei terreni che ha determinato un drastico aumento della loro biodisponibilità per tutte le specie vegetali e animali, uomo incluso.

Alcuni metalli sono richiesti dagli organismi in quantità limitata; Zn, Cu, Fe, e Mg, anche se presenti a basse concentrazioni, svolgono una serie di attività fondamentali per la cellula comportandosi come micronutrienti essenziali (Riggio et al., 2003) e partecipano a numerosi processi biochimici responsabili della crescita e della vita cellulare.

Lo zinco, per esempio, è coinvolto nei processi di replicazione, trascrizione e traduzione (Hanas et al., 1983; Grummt et al., 1986), funge da cofattore per oltre 200 metalloenzimi (Dixon e Webb, 1979) e svolge funzioni regolative, come nel caso della modulazione della trasmissione sinaptica (Bryce-Smith, 1989). Il rame, a basse concentrazioni, è essenziale per la respirazione, per la difesa dai radicali liberi e per la sintesi e rilascio dei neurotrasmettitori (Cousins, 1985).

Altri metalli, come Cd, Cr, Al e Pb, invece, non sono normalmente presenti nelle cellule neanche in tracce e pertanto, anche a basse concentrazioni risultano molto tossici: questi metalli, infatti, possono causare ritardi nello sviluppo embrionale (Guillou et al., 2000; Au et al., 2001), nella crescita (Sunderman et al., 1995; Hanna et al., 1997; Calevro et al., 1998; Oskarsson et al., 1998) nonché una lunga serie di patologie, cancro incluso (Frenkel et al., 1994; Hartwing, 1994).

Tra questi metalli, altamente tossici, meritano particolare attenzione il cadmio e il piombo, non solo per la loro incrementata diffusione ma soprattutto per il loro ampio utilizzo in molte produzioni industriali poco o per nulla controllate.

2.1 Inquinamento da cadmio

Il cadmio (Cd) è un metallo bivalente, raro e tossico, dall'aspetto argenteo con riflessi azzurrognoli, duttile e malleabile che si trova in condizioni naturali nella crosta terrestre.

Esso fu scoperto nel 1817 dal chimico Friedrich Stromeyer che lo individuò nelle incrostazioni presenti all'interno di una fornace di zinco, nonostante il suo impiego e la sua estrazione a livello industriale risalga agli anni '40. Nel 1991, da

quanto riportato da Stoeppler (1991), la sua produzione era pari a 17.000 tonnellate, con conseguente emissione in atmosfera di 7.000 tonnellate di metallo.

In natura il cadmio non si trova allo stato nativo ma piccole quantità sono presenti in alcuni minerali come, ad esempio, la greenockite (CdS), l'unico minerale di cadmio importante, quasi sempre associato alla sfalerite (ZnS); per tale motivo il cadmio viene ottenuto, in genere, come sottoprodotto dell'estrazione e della raffinazione dello zinco ed, in minor misura, del piombo e del rame.

Prima della sua utilizzazione a fini industriali, iniziata nel 1907 negli Stati Uniti, la sua presenza nell'ambiente terrestre era estremamente ridotta e determinata soprattutto dall'attività vulcanica, da incendi boschivi, dal trasporto eolico di polveri e dalla lisciviazione delle rocce.

I suoi recenti e molteplici impieghi ne hanno determinato un progressivo crescente rilascio nell'ambiente (valutato recentemente in circa 14.000 tonnellate/anno) che si è tradotto in un considerevole aumento delle sue concentrazioni e nel terreno e nelle acque dolci e salate con conseguenti fenomeni, talora drammatici, di inquinamento e di danno per la salute degli organismi viventi.

L'uso più significativo del cadmio è il suo impiego nelle batterie nickel-cadmio; altre applicazioni comprendono:

- ✓ **cadmiatura:** trattamento metallurgico mediante il quale viene depositato su superfici metalliche, in modo particolare per l'acciaio, per ottenere uno strato protettivo. I rivestimenti di cadmio forniscono una buona resistenza alla corrosione, specialmente in ambienti a stress elevato, quali applicazioni marine ed aerospaziali dove sono richieste sicurezza e affidabilità elevate;
- ✓ **sali di cadmio:** trovano impiego in campo fotografico e nella fabbricazione di fuochi artificiali, gomme, vernici fluorescenti, vetri e porcellane;
- ✓ **composti del cadmio:** usati per produrre i fosfori dei televisori in bianco e nero e i fosfori blu e verdi dei televisori a colori;
- ✓ **solfo di cadmio:** è usato come pigmento e trova applicazione nella realizzazione di celle fotovoltaiche.

Un'altra fonte rilevante di emissione di cadmio è rappresentata dalla produzione di fertilizzanti a base di fosforo.

Il cadmio rilasciato attraverso l'uso dei fertilizzanti o nei canali di scarico delle industrie finisce principalmente nei terreni e il metallo viene, quindi, assorbito in particolar modo dalla componente vegetale e, conseguentemente, dagli animali erbivori. Inoltre quando le concentrazioni di Cd nel terreno sono elevate, esse possono influenzare i processi dei microrganismi e minacciare l'intera comunità biotica del suolo. Negli ecosistemi acquatici il Cd può bioaccumularsi in mitili, ostriche, gamberetti, aragoste e pesci.

Il problema più grave derivante agli organismi presenti negli ambienti inquinati da cadmio è che tale metallo è caratterizzato da una notevole capacità di penetrazione nella cellula, da un'elevata bio-persistenza e da una particolare difficoltà di eliminazione; infatti, una volta assorbito da un organismo il cadmio permane in esso per molti anni prima di venire espulso (è stato calcolato che il periodo di dimezzamento biologico è superiore ai 50 anni) (Nordberg et al., 1994; Schilderman et al., 1997). L'assorbimento di cadmio da parte dell'uomo avviene principalmente attraverso l'assunzione di peculiari cibi quali fegato, funghi, farine di cereali, crostacei, mitili, polvere di cacao, alghe secche, etc.. L'assunzione quotidiana media per gli esseri umani è valutata intorno a 0.15 µg dall'aria e 1 µg dall'acqua. Esposizione a livelli significativamente elevati di cadmio avviene attraverso il fumo (un pacchetto di sigarette può portare all'inalazione di circa 2-4 µg di cadmio). Il fumo di tabacco trasporta il cadmio nei polmoni, il sangue lo trasporta al resto del corpo dove può amplificare l'effetto incrementando il bioaccumulo di cadmio. Il Cd è trasportato al fegato dove si lega a proteine per formare complessi che sono trasferiti ai reni. Il cadmio si accumula nei reni, dove danneggia i meccanismi di filtrazione, ciò causa l'escrezione di proteine essenziali e di zuccheri dal corpo ed un ulteriore danno renale. Occorre molto tempo prima che il cadmio accumulato nei reni sia espulso dal corpo umano.

Altri effetti sulla salute che possono essere causati dal cadmio:

- ✓ diarrea, mal di stomaco ed emesi;
- ✓ problemi riproduttivi e persino possibilità di infertilità;
- ✓ danneggiamento del sistema nervoso centrale;

- ✓ danneggiamento del sistema immunitario;
- ✓ disordini psicologici;
- ✓ possibili danni al DNA (cancerogeno indiretto e cumulativo);
- ✓ sindrome di *itai-itai*.

Con quest'ultimo termine si fa riferimento ad una grave forma di inquinamento ambientale verificatasi in Giappone tra gli anni '60 e '70 nella regione di Jintsu, dove le colture di riso per il consumo locale venivano effettuate con acqua attinta da un fiume contaminato da cadmio proveniente da operazioni di estrazione e fusione dello zinco che si svolgevano a monte della regione stessa. La malattia, riscontrata per la prima volta nel 1946, è caratterizzata da osteomalacia, con fratture patologiche e con incidenza prevalente tra donne di età medio-avanzata. I sintomi prevalenti sono rappresentati da dolori ai reni ed alle articolazioni, da cui il nome dato alla sindrome "*itai-itai*" (grido di dolore equivalente ad "*ahi, ahi*"). La causa venne riconosciuta in una intossicazione cronica da cadmio di origine alimentare, per la contaminazione di origine industriale delle acque e, quindi, dei cibi. L'assunzione del Cd da parte dei pazienti affetti da *itai-itai* fu stimata a circa dieci volte l'ingestione media dei nordamericani.

A livello mondiale le zone a maggior rischio risultano essere il Giappone e l'Europa centrale; in questi territori l'inquinamento da cadmio del suolo è particolarmente elevato per la contaminazione dovuta alle attività industriali. Dal 1960 il Giappone ha stabilito delle regole rigide per la riduzione del tasso di inquinamento da cadmio mentre l'Unione europea ha emanato nel 2006 una direttiva, solo parzialmente soddisfacente, relativa al riciclo delle batterie di computer e cellulari con l'obbligo da parte di produttori e venditori di gestirne lo smaltimento. La direttiva prevede anche che le nuove batterie prodotte in futuro abbiano un contenuto limitato di cadmio e mercurio: sarà vietata la vendita di batterie portatili (ossia che pesino meno di un chilogrammo) contenenti una quantità superiore allo 0.0005% di mercurio e allo 0.002% di cadmio, tranne che nei dispositivi di emergenza, medicali e di allarme.

2.1.1 Meccanismo d'azione

Il cadmio essendo in grado di legarsi fortemente ai numerosi ligandi di molecole proteiche enzimatiche, ne provoca una conseguente alterazione della struttura e della funzionalità.

Una scala di affinità per i diversi ligandi è stata delineata da Kägi e Hapke (1984), scala che, in ordine decrescente, può essere schematizzata come segue: tiolico (RS^-) > fosforico (RPO^-) > cloridrico (RCl^-) > carbossilico ($RCOO^-$). Tale affinità risulta direttamente proporzionale ai siti leganti presenti sulle molecole interessate, ed è pertanto più elevata per glutatione e metallotioneina.

Diverse possono essere le conseguenze dell'azione del metallo a livello cellulare, tra queste ricordiamo l'inibizione delle ossidasi a funzione mista, le alterazioni di alcune attività del calcio e del suo trasporto transmembrana, il blocco della fosforilazione ossidativa dei mitocondri e le variazioni della funzionalità di vari metalloenzimi, quali alcool deidrogenasi, carbossipeptidasi, delta-ALA deidrati, superossido dismutasi, etc. (Sporn et al., 1969; Webb, 1979; Goering et al., 1995).

Il cadmio interferisce anche con le attività del calcio attraverso un suo rilascio dai siti di deposito intracellulare ed un aumento dei livelli di inositol-fosfatasi, probabilmente a seguito di un'interazione con un recettore di membrana (Smith et al., 1989; Chen e Smith, 1992).

Inoltre, va ricordato che il cadmio può sostituirsi al calcio nel legame alla calmodulina, proteina preposta alla regolazione di numerosi processi calcio-dipendenti, il che si traduce in un'azione calcio-agonista da parte del metallo, che può determinare in funzione della sua concentrazione, un'attivazione o un'inibizione, degli enzimi calmodulino-sensibili, quali la fosfodiesterasi e l'adenosintrifosfatasi Ca/Mg dipendente; il fenomeno trova conferma nel fatto che un trattamento con calmodulina-inibitori comporta miglioramenti nel quadro tossico (Donnelly, 1978; Forsen et al., 1979; Andersson et al., 1982; Cox e Harrison, 1983; Habermann et al., 1983; Chao et al., 1984; Cheung, 1984; Mills e Johnson, 1985; Akerman et al., 1985; Richard et al., 1985).

La sostituzione dello zinco da parte del cadmio, spiega la sua azione sui metalloenzimi, ciò trova una controprova nel fatto che carenze di zinco comportano un aggravamento degli effetti tossici (Vallee e Ulmer, 1972; Vallee e Glades, 1974).

Il Cd inoltre, inducendo l'attività della eme-ossigenasi, porta ad un conseguente incremento nella degradazione dell'eme, che a sua volta è responsabile di una riduzione dell'attività dell'ossidasi a funzione mista e del contenuto di citocromo P450.

L'esposizione al Cd comporta infine un aumento della formazione di radicali superossido, in grado di indurre rotture nel singolo filamento di DNA e perossidazione lipidica in vitro e nei tessuti target (Gabor et al., 1978; Stacey et al., 1980; Amoruso et al., 1982; Ochi et al., 1983; Wahba e Waalkes, 1990).

2.1.2 Impatto ambientale

Il Cd è considerato uno dei metalli pesanti più pericoloso per l'uomo e per gli ambienti acquatici e terrestri; a causa della sua elevata dispersione ambientale lo si trova in aria, acqua, suolo e in organismi animali e vegetali.

L'accumulo del Cd nel suolo (a differenza di altri metalli come il Pb) è continuo e sistematico, cosicché anche i vegetali, tramite l'apparato radicale, lo assorbono in modo costante.

Chiamati in causa, oltre agli scarichi industriali, sono i pesticidi e i fertilizzanti utilizzati per migliorare le caratteristiche minerali del suolo. Il fango può trasportare il Cd per lunghe distanze. Anche attraverso l'aria il Cd si deposita sul suolo e sui vegetali.

Attualmente nelle aree non contaminate la presenza naturale del cadmio ammonta alle concentrazioni di seguito riportate:

Comparto ambientale	Concentrazione (ppb)
Acque dolci	0,05 – 0,2
Oceani	0,01 – 0,1
Sedimenti dei fiumi e dei laghi	5.000
Sedimenti marini	30 – 100
Suoli di origine non vulcanica	10 – 1.000
Suoli vulcanici	4.500
Rocce ignee	1 – 600
Rocce fosfatice	100.000

Tali valori, sono comunemente ritenuti non tossici, tuttavia se il metallo è in forma disponibile per l'assunzione, tali valori possono rappresentare un serio problema per l'ambiente e la salute degli organismi viventi.

Queste concentrazioni possono notevolmente incrementarsi in seguito a fenomeni di bioaccumulo ed in questo caso alcune specie risulterebbero essere fonte di tossicità per l'uomo o altri animali (Shuster e Pringle, 1969; Zaroogian e Cheer, 1976; Zaroogian, 1979).

Numerosi fattori, sia fisici sia chimici, influenzano l'assunzione del Cd da parte degli organismi viventi; fra questi ricordiamo la possibilità di adsorbimento e di rilascio da parte di componenti del terreno, il suo pH, il potenziale redox, la struttura chimica, etc., (Eisler, 1985). Un pH notevolmente acido ed un elevato potenziale redox possono, infatti, aumentare, come emerso dalle osservazioni di Khalid et al. (1981) nel fiume Mississippi, la mobilizzazione del metallo dai fanghi con una conseguente maggiore possibilità di assunzione.

La quantità di Cd presente in forma ionica altamente disponibile è influenzata positivamente dalla quantità di ossigeno disciolto: in condizioni di anaerobiosi i livelli sono notevolmente ridotti e, di conseguenza, si ha un aumento della frazione del metallo legata alle particelle sospese e, quindi non biodisponibile (Eisler, 1985).

2.2 Inquinamento da piombo

Il piombo è, probabilmente, il metallo tossico più diffuso nell'ambiente e la sua presenza in natura è in gran parte dovuta alle attività antropiche.

Le concentrazioni di piombo, infatti, nella litosfera sono piuttosto ridotte (20 ppm) ed anche nel suolo presentano, lontano da fonti di contaminazione, valori non superiori generalmente a 25 ppm.

Il piombo si rinviene in numerosi minerali come la galena (PbS), che rappresenta la forma primaria di piombo allo stato naturale, l'anglesite (PbSO₄) e la cerusite (PbCO₃) (EPA, 1980).

Si tratta di un elemento che può agire come veleno esplicando interferenza con svariati sistemi metabolici in particolar modo nelle forme di intossicazione ad andamento cronico e come agente mutageno, cancerogeno e teratogeno, mentre non

esiste alcuna segnalazione, reperibile in letteratura, che ne indichi un ruolo fisiologico (Eisler, 1988).

Episodi di intossicazione cronica da piombo, o saturnismo, vengono riportati già dagli antichi Greci e dai medici arabi (2500 a.C.) e i primi casi conosciuti di encefalopatia da esposizione professionale risalgono al 400 a.C. circa (Venugopal e Luckey, 1978).

Il Pb è pressoché ubiquitario ed è utilizzato in una grande varietà di prodotti (Ensley, 2003).

Una delle cause principali del rilascio di piombo nell'ambiente è stata nel recente passato, e, in misura certamente ridotta, continua purtroppo ancor oggi, ad essere rappresentata dalla combustione della benzina, ove il piombo è presente negli additivi antidetonanti sotto forma di piombo tetraetile; notevole risulta essere anche il rilascio di piombo conseguente alle attività delle fonderie ed alla combustione del carbone. Viene impiegato negli accumulatori, nelle munizioni, nelle tubature, in vernici come il minio, come schermo contro le radiazioni, e in leghe con lo stagno per saldature. Altre fonti secondarie sono rappresentate dalla produzione di cavi ed accumulatori e di pigmenti. Inoltre il piombo può essere prodotto e diffuso come inquinante nell'atmosfera durante l'estrazione e la lavorazione industriale di altri metalli, come argento e oro, bismuto, etc..

Il piombo figura al secondo posto nella lista delle sostanze pericolose indicate dall'ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) nel 1999.

La nocività di questo metallo è nota da molto tempo, specie nelle sue manifestazioni acute (colica saturnina). Tuttavia recentemente, come è accaduto per numerosi altri agenti inquinanti, la dose considerata critica è stata notevolmente abbassata. Fino a circa trent'anni fa, l'avvelenamento cronico da piombo era definito dalla presenza di una dose superiore a 80 µg/dl nel sangue, mentre attualmente viene considerata "alta" una dose di Pb di 30 µg/dl e potenzialmente nocive, specie nello sviluppo, quantità uguali o superiori a 10 µg/dl (0.1 ppm).

Assorbito essenzialmente attraverso la respirazione e la nutrizione, il piombo non viene metabolizzato, ma per larga parte escreto, mentre il resto (circa 20%) si distribuisce nei tessuti e in particolare:

- ✓ nel sangue, ove circola quasi esclusivamente negli eritrociti;

- ✓ nei tessuti minerali (ossa e denti), ove si accumula;
- ✓ nei tessuti molli (reni, midollo osseo, fegato e cervello).

La presenza di Pb nel sangue, all'interno dei globuli rossi e in massima parte legato all'emoglobina, provoca anemia, che deve però considerarsi non un sintomo, ma una manifestazione tardiva dell'avvelenamento da Pb. Attraverso il sangue, il Pb si distribuisce in tutti gli altri tessuti.

Per la sua capacità di “mimare” il calcio, e quindi soprattutto in caso di insufficiente assunzione di calcio, il piombo si accumula nelle ossa e vi costituisce una componente stabile. Tale componente può essere mobilizzata, e quindi rientrare in circolo nel sangue, in particolari stati fisiologici di stress (gravidanza, allattamento, malattie), ma anche come conseguenza di un accresciuto apporto di calcio nella dieta. Questo accumulo stabile di Pb nelle ossa rende molto lenta la guarigione dalla piombemia, anche dopo un completo allontanamento dell'agente tossico.

Il piombo è in grado di danneggiare praticamente tutti i tessuti, in particolare i reni e il sistema immunitario. La manifestazione più subdola e pericolosa dell'avvelenamento da piombo è quella a carico del sistema nervoso. Negli adulti il danno da piombo si manifesta soprattutto con neuropatia periferica, che si ritiene dovuta a un processo di demielinizzazione delle fibre nervose. L'esposizione intensa ad elevate dosi di piombo (da 100 a 200 $\mu\text{g}/\text{dl}$) provoca encefalopatia, i cui sintomi sono: vertigini, insonnia, cefalea, irritabilità e successivamente crisi convulsive e coma. La neuropatia da piombo colpisce soprattutto nello sviluppo, con turbe comportamentali e danni cognitivi.

Studi epidemiologici hanno mostrato una forte correlazione fra il livello di piombo nel sangue e nelle ossa e scarse prestazioni in prove attitudinali (test QI o psicometrici); una simile correlazione è stata accertata anche in studi comportamentali su animali esposti al piombo subito dopo la nascita. Il processo di apprendimento avviene attraverso la formazione e il rimodellamento delle sinapsi e l'effetto tossico del piombo su questo processo suggerisce che questo metallo danneggi specificamente la funzione sinaptica. La particolare vulnerabilità dei bambini è accresciuta dal fatto che essi sono particolarmente esposti all'assunzione di

piombo, per esempio se nutriti con latte artificiale preparato con acqua ricca di piombo, ovvero per ingestione di frammenti di vernice al piombo.

L'avvelenamento da piombo viene curato con farmaci che esercitano un'azione "chelante" sul metallo, ovvero molecole in grado di legare il piombo formando un complesso stabile che viene escreto. I farmaci più utilizzati per questa terapia sono il calcio-EDTA (calcio disodico edetato), il diemercaprolo (DMSA o BAL) e la penicillamina, un derivato della penicillina che però non ha azione antibatterica, ma solo chelante.

2.2.1 Meccanismo d'azione

La tossicità del Pb deriva in larga misura dalla sua capacità di "mimare" il calcio, ovvero di sostituirsi ad esso in molti dei processi cellulari fondamentali che dipendono dal calcio.

Il piombo può attraversare la membrana cellulare mediante diversi sistemi, non ancora completamente chiariti. Il trasporto di piombo attraverso la membrana degli eritrociti è mediato dallo scambiatore anionico Cl^-/HCO_3^- in un senso e dalla pompa Ca-ATPasi in senso opposto. In altri tessuti, il piombo entra attraverso i canali al calcio dipendenti dal potenziale, o ancora attraverso altri tipi di canali che trasportano calcio. Una volta entrato nel citoplasma, il piombo continua la sua azione di mimica distruttiva, occupando i siti di legame per il calcio su numerose proteine calcio-dipendenti. Il piombo si lega alla calmodulina, una proteina che, nel terminale sinaptico, funziona come sensore della concentrazione di calcio libero e da mediatore del rilascio di neurotrasmettitore. Inoltre altera il funzionamento dell'enzima proteina chinasi C, una proteina praticamente ubiquitaria di importanza fondamentale per numerose funzioni fisiologiche. La chinasi C viene normalmente attivata da un modulatore esterno alla cellula (ormoni, neurotrasmettitori, etc.), attraverso una catena enzimatica e in modo dipendente dal calcio. La proteina attivata, fra l'altro, influenza direttamente l'espressione di geni IERG (Immediate Early Response Genes: geni a risposta immediata). Il piombo presenta un'elevata affinità per i siti di legame specifici del calcio su questa proteina; dosi picomolari sono in grado di prendere il posto di dosi micromolari di calcio. In sistemi cellulari modello, è stato mostrato come il piombo sia in grado di stimolare l'espressione genica con un

meccanismo mediato dalla proteina chinasi C e si presume che tale effetto possa avere relazione con alterazioni del funzionamento sinaptico.

Il piombo supera agevolmente la barriera emato-encefalica con una velocità tale da potersi considerare un potente neurotossico a livello centrale. In questo caso il meccanismo di penetrazione non è completamente chiarito, ma l'ipotesi più probabile è che esso sia trasportato passivamente come ione $PbOH^+$. Nel cervello sembra che il piombo si accumuli negli astrociti, che lo sequestrano, proteggendo in questo modo i più vulnerabili neuroni. Evidentemente questo accumulo origina spesso un danno cellulare. In queste cellule, come presumibilmente nei neuroni, l'ingresso del piombo è mediato attraverso i canali del calcio. Gli effetti del piombo sul cervello, con il conseguente ritardo mentale e deficit cognitivo, sono mediati da una sua interferenza con i tre principali sistemi di neurotrasmissione: il sistema dopaminergico, quello colinergico e, soprattutto, quello glutammatergico. L'effetto del piombo sui primi di questi due sistemi (dopaminergico e colinergico) sono accertati, ma scarsamente descritti dal punto di vista dei meccanismi.

E' noto invece come il piombo interferisca direttamente con l'azione del glutammato, il fondamentale neurotrasmettitore del cervello. Il glutammato esplica la sua azione di stimolazione eccitatoria dei neuroni legandosi a recettori di membrana che appartengono a diverse famiglie. Dosi micromolari di piombo sono in grado di bloccare il flusso di ioni attraverso il canale di membrana associato a una classe specifica di recettori del glutammato (denominati tipo NMDA). I recettori NMDA, appunto attraverso il funzionamento del canale ionico, svolgono un ruolo fondamentale nella trasmissione sinaptica eccitatoria e, per certe loro caratteristiche peculiari, appaiono coinvolti nei processi di formazione delle reti neuronali e quindi nelle funzioni della memoria e dell'apprendimento. Sono proprio questi recettori che appaiono come uno dei bersagli critici del piombo nei neuroni del sistema nervoso centrale. Come ciò sia in grado di alterare lo sviluppo cognitivo è tuttora ignoto.

2.2.2 Impatto ambientale

Nell'ambiente le concentrazioni di Pb più elevate si rilevano nei sedimenti (47 mg/Kg), nelle acque interstiziali (36 mg/Kg) e nel suolo (16 mg/Kg), mentre sono più basse le concentrazioni del metallo riscontrate nell'atmosfera e nelle acque

libere, pertanto i sedimenti rappresentano i più importanti depositi ambientali di Pb (Eisler, 1988).

Nelle acque, il metallo può pervenire a seguito del dilavamento dei suoli o delle piante, tuttavia quando la corrente dell'acqua è lenta, i valori di Pb incrementano in misura notevole, mentre in caso di flusso elevato la concentrazione del metallo aumenta nel particolato o in forma libera (Boggess, 1977; May e McKinney, 1981; White e Driscoll, 1985).

Il rilascio del Pb dai sedimenti è favorito dall'acidità delle acque e dalla loro composizione ionica, mentre una temperatura elevata, un basso pH e la presenza di attività microbiche agevolano l'organizzazione del metallo che si rende responsabile di un'alchilazione che interessa non più del 10% del Pb presente; tale fenomeno non sembra essere correlato alla concentrazione del metallo (Chau et al., 1980; May e McKinney, 1981; Demayo et al., 1982).

3. LE METALLOTIONEINE (MT)

Le metallotioneine (MT) sono state per la prima volta identificate nel 1957 da ricercatori interessati allo studio dei costituenti cellulari responsabili dell'accumulo di cadmio nelle cellule renali equine (Margoshes e Vallee, 1957).

Il termine “metallotioneina” fu inizialmente coniato per designare la proteina, isolata dalla corteccia renale equina (Kägi e Vallee, 1960), ricca di zolfo, e legante cadmio e zinco. Dopo il 1° Congresso Internazionale sulle MT, tenutosi nel 1978, il termine MT è stato utilizzato per individuare tutte le proteine di basso peso molecolare con requisiti simili alla metallotioneina equina.

Tali requisiti sono:

- ✓ basso peso molecolare (6-8 kDa);
- ✓ elevato contenuto di metalli pesanti;
- ✓ caratteristica composizione amminoacidica (elevato contenuto di cisteina e assenza o basso contenuto di amminoacidi aromatici);
- ✓ struttura primaria con una caratteristica distribuzione delle cisteine (es. Cys-X-Cys);
- ✓ caratteristiche spettroscopiche tipiche dei clusters metallotioici.

Successivamente, nel 1985, le MT sono state convenzionalmente suddivise in 3 classi sulla base della MT di mammifero: la classe I comprende tutte le MT con struttura primaria correlabile a quella delle MT dei mammiferi; la classe II, le MT la cui sequenza non presenta omologia con le MT dei mammiferi; la classe III, fitochelatine e metallo peptidi atipici, rinvenuti sempre nelle piante, costituiti da unità gamma-glutamil-cisteiniche aventi alcune proprietà in comune con le MT e, pertanto, non rappresentano diretti prodotti genici (Fowler et al., 1987; Kägi, 1993).

Con il progredire delle conoscenze sulle MT, tale classificazione è risultata però ancora inadeguata e nel corso del 4° Meeting Internazionale sulle MT (Kansas City, USA, 1997), è stato proposto un nuovo sistema di classificazione basato sia sulla similarità di sequenza sia sulle relazioni filogenetiche. Questo sistema considera le MT come una superfamiglia suddivisa in famiglie (es. MT dei vertebrati) e sottofamiglie (es. MT dei teleostei).

Le MT sono state rinvenute in alcuni procarioti, negli eucarioti unicellulari, in molti vegetali e sono, quasi sicuramente, presenti in tutti i phyla del regno animale (Kojima e Hunziker, 1991).

Le MT sono prevalentemente proteine citoplasmatiche (Cherian, 1994), ma possono trovarsi anche in altri compartimenti cellulari: esse sono state rinvenute nella frazione lisosomiale e nei nuclei di cellule in attiva proliferazione (Cherian, 1994; Ogra e Suzuki, 2000).

3.1 Le metallotioneine dei vertebrati

In tutti i vertebrati, il gene che codifica per le MT presenta una struttura tripartita costituita da 3 esoni intervallati da due introni nelle posizioni amminoacidiche 9-31 o 9-32 (Samson e Gedamu, 1998).

La composizione amminoacidica delle MT è caratterizzata dalla preponderanza di residui cisteinici, che rappresentano circa un terzo del numero totale degli amminoacidi. La maggior parte delle MT contiene anche quantità apprezzabili di amminoacidi basici, quali lisina e, occasionalmente, arginina. La rimanente frazione amminoacidica è variabile e non comprende di norma amminoacidi aromatici ed istidina (Kagi e Kojima, 1987).

La struttura primaria, determinata mediante le procedure convenzionali di sequenziamento delle proteine, oppure ricavata dalla sequenza del cDNA, o del DNA del genoma, è nota per numerose MT dei vertebrati. A causa dell'abbondanza di residui cisteinici, le analisi convenzionali delle sequenze amminoacidiche vanno incontro all'insorgenza di numerose difficoltà (Hunziker, 1991). Tutte le MT dei vertebrati finora caratterizzate risultano costituite da una singola catena polipeptidica che contiene 60-68 amminoacidi. Le MT di ciascuna classe di vertebrati presentano una sequenza N-terminale propria della classe di appartenenza: le MT di osteitti, uccelli e mammiferi presentano, infatti, rispettivamente, 3, 5 e 4 residui amminoacidici localizzati a monte del primo residuo cisteinico (Kille et al., 1994). Tale regione rappresenta il principale epitopo antigenico della molecola di MT, per cui anticorpi diretti contro la MT umana danno una reazione crociata contro le altre MT di mammifero, ma non reagiscono contro le MT di uccelli (Kille et al., 1994).

Tutte le MT dei vertebrati sinora studiate contengono 20 residui cisteinici, dei quali 19 sono completamente conservati. La maggior parte di essi appare organizzata in motivi Cys-Cys, Cys-X-Cys e Cys-X-Y-Cys, dove X e Y sono residui amminoacidici diversi dalla cisteina. Nelle MT di mammifero, che sono quelle più numerose nelle banche dati, oltre 30 residui sono invariati e le posizioni dei residui basici sono completamente conservate; le sostituzioni amminoacidiche interessano soprattutto la porzione aminoterminale della proteina.

La predisposizione delle MT a formare complessi con gli ioni dei metalli pesanti si basa proprio sull'abbondanza dei residui di cisteina e sulla loro disposizione in sequenze caratteristiche.

Le MT di mammifero manifestano una spiccata tendenza a legare lo zinco ma, in relazione al tessuto di origine, all'età e allo stato di sviluppo, possono legare anche altri metalli (Coyle et al., 2002). Ad esempio, la MT isolata dal rene è capace di legare maggiormente cadmio e rame rispetto alla MT del fegato dello stesso organismo (Suzuki e Yamamura, 1979). La quantità di metallo legata da una mole di proteina rappresenta un valore costante ed ammonta a 7 equivalenti di zinco o cadmio (Vasak et al., 1987).

Il legame con il metallo conferisce una ben precisa struttura tridimensionale alla proteina, come dimostrato dalle indagini spettroscopiche, dagli studi cristallografici (Scudiero et al., 2005; Chan et al., 2005) e dalla NMR bidimensionale (Vasak, 1998). La formazione di legami metallotiolici tra i residui di cisteina e gli atomi di metallo determina il folding della catena polipeptidica che non presenta regioni ad α elica o β laminare (Fig. 1).

Dagli studi strutturali è stato dedotto che i venti residui cisteinici presenti nella catena amminoacidica formano ponti con gli ioni di metalli adiacenti costituendo due distinti cluster, N-terminale e C-terminale: il cluster N-terminale, denominato β , con 3 equivalenti di metallo legati a 9 cisteine forma una struttura tipo cicloesano in cui tre cisteine risultano bicoordinate e sei monocoordinate, mentre il cluster C-terminale, denominato α , con 4 equivalenti di metallo legati a 11 cisteine, forma una struttura tipo biciclononano con cinque cisteine bicoordinate e sei monocoordinate.

La formazione dei complessi metallotiolici è un processo ordinato che inizia nel cluster C-terminale e, solo dopo la saturazione dei siti disponibili in tale cluster, i

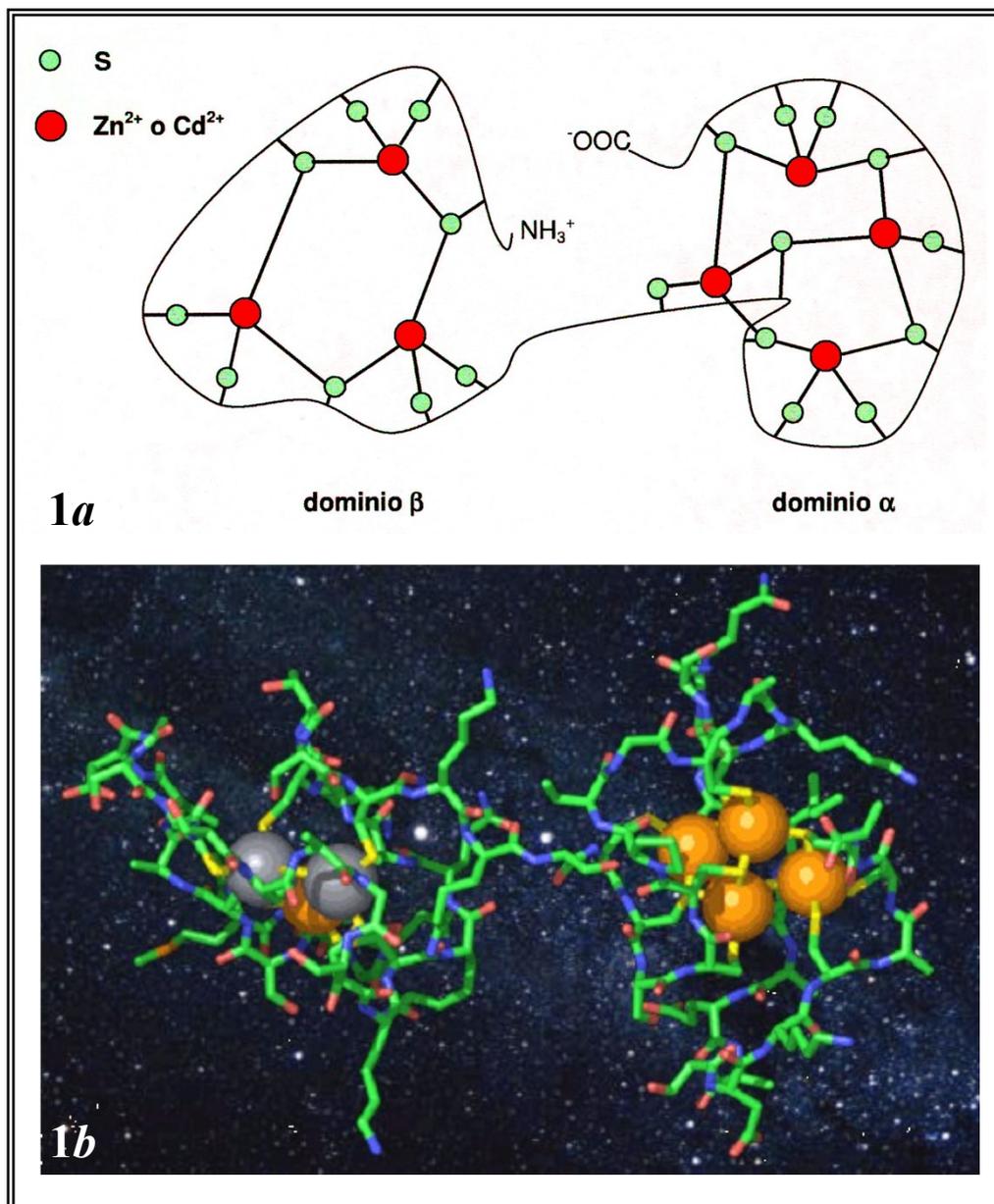


Fig. 1 a, b - a. Rappresentazione schematica della struttura terziaria della metallotioneina di mammifero. Il dominio N-terminale (dominio β) è formato da 9 cisteine che legano 3 ioni $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$, mentre il dominio C-terminale (dominio α) lega 4 ioni $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$. **b.** Struttura tridimensionale della metallotioneina di mammifero. Le sfere rappresentano gli atomi di metallo: in grigio gli atomi di cadmio, in arancio quelli di zinco.

metalli complessano anche i residui cisteinici del cluster N-terminale. Il legame del metallo in ciascun cluster è cooperativo così come lo è il suo rilascio: in presenza di EDTA, il cluster N-terminalcede il metallo prima e più rapidamente di quello C-terminale (Winge e Nielsen, 1984; Capasso et al., 2005).

3.2 Le metallotioneine dei crostacei

Per convenzione la terminologia e gli standard relativi alle MT dei mammiferi sono state estesi anche alla descrizione delle sequenze amminoacidiche e alle caratteristiche dei cluster metallici delle nuove forme di MT descritte per altri organismi, quali ad esempio la MT CUP1 di *Saccharomyces cerevisiae*. In tale organismo la sintesi della proteina viene indotta dal rame e la MT purificata contiene esclusivamente ioni rame (Winge et al., 1985). La distribuzione dei residui di cisteina nella MT CUP1 si allinea molto bene con il dominio β della MT di mammifero e ciò ha indotto a ritenere che le proteine presentanti una struttura primaria simile al dominio β della MT di mammifero debbano esibire una capacità di legame preferenziale per il rame piuttosto che per lo zinco. L'analisi della struttura delle MT dei crostacei ha rivelato che esse risultano dall'associazione di due domini β e pertanto devono essere considerate come putative rame-tioneine (Nemer et al., 1985). Questa affermazione è stata convalidata dagli studi condotti mediante NMR che hanno rilevato la presenza di tre ioni divalenti all'interno di ciascun dominio della MT di crostaceo che risulta, pertanto, comparabile con il dominio β della MT di mammifero (Zhu et al., 1994; Narula et al., 1995).

L'analisi della letteratura relativa alle MT espresse naturalmente o in seguito a esposizione ai metalli nei crostacei, che le metterebbe in correlazione con le rame-tioneine, sembrerebbe invece necessitare di ulteriori considerazioni. I trattamenti basati sulla somministrazione di cadmio o rame, hanno infatti portato all'identificazione nei crostacei di un'elevata varietà di MT, mettendo in discussione la visione unitaria delle MT dei crostacei. Inoltre nelle diverse specie analizzate il numero di geni per le MT è risultato essere variabile; in *Cancer pagurus* (Overnell e Trehella, 1979; Overnell, 1982), *Carcinus maenas* (Pedersen et al., 1994, 1998), *Homarus americanus* (Brouwer et al., 1989; Chou et al., 1991) e *Callinectes sapidus*

(Brouwer et al., 1992b, 1995), il loro numero varia da uno a tre e le MT presentano significative differenze di affinità per i metalli. Una successiva indagine di Syring et al. (2000) condotta su *C. sapidus* ha confermato tale aspetto grazie all'identificazione di una MT rame-specifica e di due forme di MT indotte dal cadmio peraltro già evidenziate da Dallinger et al. (1997).

La caratterizzazione delle MT indotte nei crostacei da elevate concentrazioni di rame e cadmio ha messo in evidenza l'esistenza di un'ampia gamma di complessi aventi differente stechiometria.

Nelle specie che esprimono una sola MT il cadmio rappresenta un induttore più efficace rispetto al rame e in esse è stata generalmente identificata la presenza di aggregati Cd-MT omometallici; se sono presenti anche ioni rame si possono formare aggregati misti rame-cadmio (Overnell e Trehwella, 1979; Overnell, 1982; Brouwer et al., 1989; Chou et al., 1991; Pedersen et al., 1994, 1998). In *C. sapidus*, invece, dove è stata riscontrata una molteplicità dei geni per le MT (Brouwer et al., 1992, 1995), il cadmio e il rame inducono l'espressione di differenti isoforme producendo, ciascuno di essi, corrispondenti aggregati omometallici.

Una successiva ricerca condotta sul comportamento *in vivo* della MT di *H. americanus* (Valls et al., 2001), analizzando indipendentemente la capacità di legame dei suoi domini e tre forme mutanti, ha consentito una valutazione più realistica del suo ruolo fisiologico ed ha portato alla conclusione che essa può essere certamente considerata come una zinco-tioneina. Secondo tali autori per verificare se, utilizzando l'approccio della similarità di sequenza, oltre le MT degli artropodi, anche quelle degli altri animali rappresentino zinco-tioneine o rame-tioneine, sarebbe necessario prenderne in considerazione un numero più consistente.

I saggi basati sull'espressione ricombinante hanno consentito a questo gruppo di ricerca di stabilire le preferenze di chelazione *in vivo* di diverse MT ed hanno fornito le basi per estendere l'analisi funzionale ed evolutiva di questa complessa superfamiglia di proteine (Capdevila et al., 1997; Cols et al., 1997, 1999; Romero-Isart et al., 1999; Valls et al., 2000; Bofill et al., 2001).

La maggior parte delle informazioni relative alle MT dei crostacei riguardano essenzialmente i decapodi mentre del tutto ignorate sono, sotto tale aspetto, le altre classi ed ordini di tale subphylum.

Gli unici dati relativi agli isopodi oniscidei sono quelli forniti da una ricerca preliminare di Knigge et al. (2002) condotta su *Oniscus asellus* rivolta a isolare e caratterizzare una proteina di legame per il cadmio mediante impiego di FPLC/reversed phase HPLC and MALDI-TOF e un approccio genetico basato sull'impiego di primers degenerati dedotti dall'mRNA di MT di crostaceo e sequenziamento amminoacidico mediante RT-PCR al fine di identificare il gene per la MT. I risultati di tale ricerca indicherebbero, secondo gli autori, la presenza in *Oniscus* di proteine leganti il metallo o di proteine indotte dal metallo.

3.3 Le funzioni delle metallotioneine

Le MT rappresentano un gruppo molto antico di proteine e possiedono infatti, una struttura conservata quasi immutata nel corso dell'evoluzione; pertanto tali proteine sono state ritenute, sin dalla loro scoperta, coinvolte in fondamentali processi fisiologici della cellula.

Il ruolo fisiologico più significativo che è stato, sin dall'inizio, loro attribuito, è quello dell'omeostasi dello zinco e del rame associato allo svolgimento di un'azione detossificante nei confronti dei metalli pesanti.

Le MT fungono da deposito e da trasportatori intracellulari di Zn e sono in grado di rilasciare e ridistribuire lo Zn nella cellula per le esigenze metaboliche o in caso di sua necessità (Coyle et al., 2002). E' stato inoltre messo in evidenza il ruolo che le MT hanno nella modulazione del ciclo di ossido-riduzione del rame: in condizioni riducenti (Cu/ascorbato) esse legano efficacemente il Cu, mentre possono rilasciarlo in condizioni ossidanti (Cu/ascorbato + H₂O₂) (Fabisiak et al., 1999).

Il ruolo delle MT non è solo quello di sequestrare Zn, mantenendo bassa la sua concentrazione nella cellula, ma possono comportarsi anche da donatori di tale metallo quando la cellula ne necessita, ad esempio durante la proliferazione cellulare (Vallee e Maret, 1993).

I metalli legati alle MT possono andare in contro ad un destino diverso in funzione delle esigenze fisiologiche della cellula e delle richieste di metallo da parte dell'organismo. Se, ad esempio, la quantità di Zn legata alle MT è elevata, esso può essere escreto ed eliminato nell'ambiente; se invece la riserva di Zn è ridotta, il

metallo resta legato alle MT (Vallee e Maret, 1993). Sembra, inoltre, che le MT possano ricoprire un ruolo regolativo sulla funzione biologica dello Zn, a differenza di quanto noto per altre zinco-proteine la cui funzione risulta, invece, essere regolata dallo Zn stesso. Anche se il legame delle MT con lo Zn è molto forte, la proteina appare in grado di cedere almeno uno dei suoi atomi di metallo ad apoenzimi (Vallee e Maret, 1993).

In un primo momento i meccanismi di trasferimento dei metalli dalle MT ai metalloenzimi erano stati ipotizzati essere di tipo diretto (Udom e Brady, 1980), ma successive ricerche hanno dimostrato, invece, che la distribuzione cellulare dei metalli avviene mediante percorsi più complessi: i clusters metallotiolici delle MT possono, infatti, interagire con specifici ligandi cellulari tra i quali, primariamente, il glutatione che risulta capace di mobilitare i metalli in relazione al suo stato di ossido-riduzione.

In presenza di metalli tossici, quali il cadmio, le MT svolgono il ruolo fondamentale di agenti detossificanti, come chiaramente emerso dalla ricerca di Klaassen e Liu (1998) che ha dimostrato che topi transgenici che non esprimono le MT si sviluppano in maniera del tutto normale, ma mostrano un'augmentata sensibilità agli effetti tossici del cadmio. Inoltre è stato osservato che cellule in coltura in cui i geni codificanti le MT sono amplificati risultano più resistenti al Cd rispetto alle colture di controllo (McAleer e Tuan, 2001). La correlazione tra la resistenza al cadmio e i livelli cellulari di MT è supportata da altre evidenze sperimentali. Topi neonati, il cui fegato esprime costitutivamente livelli cellulari elevati di MT, sono particolarmente resistenti agli effetti tossici del Cd (Klaassen e Wong, 1982).

Nelle cellule le MT svolgono anche altre funzioni. Studi recenti suggeriscono che le MT giocano un ruolo di difesa dagli effetti nocivi degli agenti ossidanti: cellule in coltura, provenienti da topi che non esprimono le MT, sono più sensibili allo stress ossidativo rispetto alle cellule prelevate da animali non transgenici (Lazo et al., 1995). Anche in questo caso, il pretrattamento in vivo con agenti capaci di indurre la sintesi di MT determina un aumento della resistenza delle cellule ad agenti chimici che generano stress ossidativo (Sato et al., 1995). E' stato dimostrato che l'espressione della MT eterologa di scimmia in ceppi di lievito che difettano della

superossido dismutasi (SOD) protegge le cellule dagli effetti nocivi dei radicali liberi (Tamai et al., 1993) e, in vitro, la Cd, Zn-MT di coniglio protegge le macromolecole dai danni causati dai radicali idrossilici (Thornalley e Vasak, 1985). E' stato proposto che i residui di cisteina delle MT possano comportarsi da riducenti rilasciando metallo in situazioni di stress ossidativo (Maret e Vallee, 1998).

4. LE HSP70 (HEAT SHOCK PROTEINS)

Le Hsp sono una famiglia di proteine altamente conservata a livello cellulare, con distribuzione cellulare ubiquitaria (Feder e Hofmann, 1999; Morimoto et al., 1990; Welch, 1993), localizzate maggiormente nel citosol, ma presenti anche nei mitocondri e nel reticolo endoplasmatico, inoltre presentano una regolazione sia costitutiva che inducibile.

Queste proteine sono state descritte per la prima volta nelle cellule salivari di *Drosophila busckii* e *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1962), sottoposte ad elevate temperature, e da qui il nome di “heat shock proteins”.

Da allora, è stato dimostrato che diversi tipi di stress ambientale possono indurre l'espressione delle Hsp e, pertanto, successivamente, per descrivere tali proteine, è stato utilizzato il termine di “stress protein” ad indicare il loro coinvolgimento in qualsiasi tipologia di stress. In particolare è possibile utilizzare anche il termine “Hsp cognates” (Hsc), per indicare quelle proteine, appartenenti alla stessa famiglia delle Hsp, indotte da altri fattori diversi dal calore (Prasad, 1995).

I più comuni fattori ambientali coinvolti nell'induzione di tali proteine (Lewis et al., 1999) sono:

- ✓ esposizione di metalli in traccia;
- ✓ inquinanti organici;
- ✓ cambiamenti di temperatura;
- ✓ ipossia o anossia;
- ✓ esposizione a radiazioni ultraviolette;

tutti elementi determinanti la denaturazione, il non corretto ripiegamento e l'aggregazione delle proteine; l'espressione delle Hsp è quindi essenziale per il mantenimento della normale struttura e funzione delle proteine cellulari.

Non tutti i fattori di stress però, inducono una risposta delle Hsp, Washburn et al. (2002), in uno studio condotto sulla trota iridea, *Oncorhynchus mykiss*, hanno dimostrato che il trasporto, la manipolazione e l'anestesia non aumentano i livelli di Hsp70 nel muscolo, nelle branchie e nel tessuto cardiaco.

La scoperta delle Hsp, ha suscitato l'interesse di numerosi studiosi le cui ricerche, nel corso degli anni, hanno messo in evidenza l'espressione di tali proteine

anche nel tessuto nervoso, nei tubuli del Malpighi e nelle ali della mosca (Tissieres et al., 1974), nei fibroblasti dell'embrione di pollo (Kelly e Schlesinger, 1978), in *Escherichia coli* (Lemeux et al., 1978; Yamamori et al., 1978), nei lieviti (McAlister e Finkelstein, 1980) e nelle piante (Barnett et al., 1980).

Tali proteine sono presenti in tutti i gruppi di organismi viventi, dai procarioti agli eucarioti, e molte di esse sono costitutivamente espresse (Kiang e Tsokos, 1998); infatti, molte di queste proteine appartengono al gruppo delle chaperonine molecolari e svolgono il compito di garantire il corretto ripiegamento delle proteine e di facilitarne il trasporto all'interno dei compartimenti cellulari (Feder and Hofmann, 1999); hanno, inoltre, un ruolo fondamentale nell'interazione tra gli ormoni steroidei e i loro recettori (Welch, 1993) ed inducono termo-tolleranza nei confronti di forti stress termici (Mosser e Bools, 1998).

Il grado d'espressione delle Hsp dipende da diversi fattori quali: la natura dell'agente stressante, il tipo di tessuto (Smith et al., 1999, R bergh et al., 2000), la famiglia delle Hsp considerate (Smith et al., 1999), l'entit  e la durata dell'esposizione al fattore di stress (Airaksinen et al., 2003), il periodo stagionale, (Fader et al., 1994), la specie in esame (Basu et al., 2001), il sesso (Afonso et al., 2003), e lo stadio di sviluppo (Lele et al., 1997; Rendell et al., 2006).

L'over-espressione delle Hsp   spesso sufficiente a proteggere l'organismo da fattori di stress letali. In ambienti naturali, dove coesistono diversi e numerosi fattori di stress, il maggior grado di espressione delle Hsp determina tolleranza allo stress, poich  le Hsp sono in grado di aumentare transitoriamente la resistenza dell'organismo ad una successiva esposizione (Basu et al., 2002). Brown et al. (1992), hanno confermato che l'esposizione dell'epitelio renale di *Pleuronectes americanus* ad uno stress termico, quale il calore, protegge le cellule da una successiva esposizione a temperature estreme o a stress di tipo chimico.

Studi condotti sulla trota iridea, hanno consentito a Bradley et al. (1985) di dimostrare che la pre-esposizione ad una concentrazione sub-letale di zinco aumenta la tolleranza al metallo di quasi tre volte, grazie ad una maggiore espressione delle Hsp che, tuttavia, possono svolgere un effetto tossico se presenti a concentrazioni troppo elevate.

Dall'mRNA delle Hsp70 è stato possibile risalire ai geni ed alle sequenze nucleotidiche codificanti tali proteine; si è scoperto che queste hanno una composizione amminoacidica che per larga parte è costante e uguale nei diversi organismi esaminati: ad esempio l'Hsp70 di *E. coli* possiede fino al 57% di amminoacidi in comune con l'Hsp70 umana (Gupta e Golding, 1993).

Le varie Hsp differiscono tra loro per struttura, per organismo ospite e per localizzazione cellulare. In condizioni di stress, le Hsp sono over-esprese o ne vengono indotte nuove isoforme (Lewis et al., 1999).

Esse vengono classificate sulla base del loro peso molecolare (kDa), determinato mediante elettroforesi, e raggruppate in tre famiglie principali:

1) Hsp70, di peso compreso tra 68-73 kDa: assistono la sintesi della catena polipeptidica e garantiscono il corretto ripiegamento della struttura proteica, agiscono come chaperon molecolari e mediano alla riparazione o alla degradazione di proteine alterate o denaturate. I metalli pesanti sono noti per essere tra i più forti induttori dell'espressione delle Hsp70 e tali proteine sono, pertanto, da considerarsi effettori di metallo-tolleranza (Bierkens et al., 1998).

2) Hsp90, di peso compreso tra 85-90 kDa: svolgono un ruolo di sostegno tra alcuni componenti del citoscheletro e gli enzimi ed i recettori per gli ormoni steroidei.

3) Hsp a basso peso molecolare (sHsp), di peso compreso tra 16-47 kDa: hanno diverse funzioni che sono specie-specifiche e si pensa che agiscano da chaperon molecolari ed impediscano l'aggregazione proteica irreversibile.

Quest'ultime, diversamente dalle altre, sembrano non avere una funzione costitutiva, poiché sono indotte solo dopo un evento stressante (Ciocca et al., 1993).

Sebbene queste proteine abbiano un'emivita relativamente molto breve (6-9 h in *Drosophila*), il loro livello rimane elevato nell'organismo anche molto tempo dopo l'allontanamento del fattore che ha indotto la loro sintesi. E' per questo motivo che si è ipotizzato un ruolo importante delle Hsp nell'adattamento a lungo termine degli animali all'ambiente (Parsell e Lindquist, 1993; Morimoto e Santoro, 1998).

La famiglia delle Hsp70 è quella maggiormente conservata ed, infatti, è stata identificata negli archeobatteri, in molte specie di alghe, in molti invertebrati marini e in tutte le classi dei cordati (Hightower et al., 1985; Hightower, 1993).

Le Hsp70 sono costituite da due principali domini funzionali, il primo presente nella porzione N-terminale della proteina, di circa 40 kDa e con funzione ATPasica, il secondo presente nella porzione C-terminale, di circa 25 kDa e con ruolo di peptide-binding (Fig. 2). I due domini sono separati da una regione cardine suscettibile al taglio delle proteasi.

Poiché le Hsp70, come precedentemente detto, sono localizzate nel citosol, nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri, nei precursori delle proteine destinati ad essere trasportati all'interno di tali organelli, è presente, all'estremità N-terminale, un peptide di transito con una sequenza variabile.

Per molte Hsp70, la presenza di un subdominio all'estremità C-terminale di circa 5 kDa, è indispensabile per consentire l'interazione con i propri co-chaperoni.

Il sito che lega l'ATP, presente nel dominio N-terminale, è situato alla base di una sacca profonda posizionata tra i due lobi strutturali, e il nucleotide che lega il core del dominio dell'ATPasi ha una struttura terziaria simile a quella dell'esochinasi (Flaherty et al. 1990), per cui il meccanismo di fosfotransferasi e il cambiamento conformazionale indotto dal substrato delle due proteine potrebbe essere simile.

Il dominio che lega il peptide contiene un subdominio β -sandwich dove risiede la sacca che lega il peptide, e i residui che rivestono la sacca, interagiscono con il tratto idrofobico esposto delle catene polipeptidiche unfolded.

4.1 Regolazione ed espressione delle Hsp

Si ritiene che l'espressione delle Hsp avvenga in conseguenza del legame di un fattore per la trascrizione dell'Hsp attivato (HSF), con particolari regioni promoter chiamate HSE (heat shock element) situate vicino ai geni codificanti per l'Hsp.

La maggior parte di questi geni non contiene introni, per cui l'mRNA può essere immediatamente tradotto in proteine entro pochi minuti dall'esposizione al fattore di stress.

In natura esistono diversi HSF, ma solo un tipo, l'HSF1, regola i geni per l'Hsp (Baler et al., 1993). L'HSF1 è un monomero o un eterodimero complessato con l'Hsp70 nel citosol delle cellule non stressate (Baler et al., 1992; Rabindran et al., 1994).

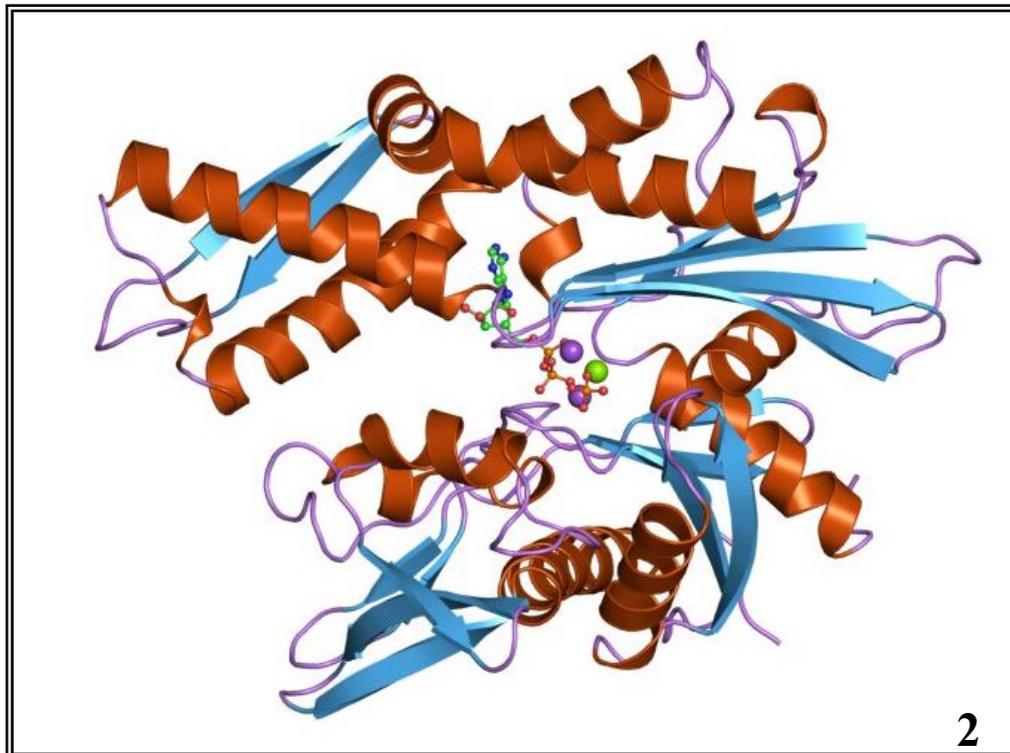


Fig. 2 - Struttura tridimensionale del dominio di legame con i nucleotidi della Hsp70 (Heat shock protein) di *Bos taurus*, risolta mediante cristallografia a raggi X. I foglietti β sono rappresentati come frecce la cui punta corrisponde all'estremità C-terminale e la cui coda corrisponde all'N-terminale. Le α -eliche sono rappresentate come spirali. (Flaherty et al., 1990).

Il fattore di stress (*stressoren*) provoca la trasformazione dell'HSF1 dalla sua forma inattiva alla forma attiva, con conseguente sintesi della proteina Hsp70; tuttavia non è ancora stato del tutto chiarito, il meccanismo attraverso il quale lo stress "attivi" l'HSF1 né come la cellula possa percepire il segnale di stress, Morimoto et al. (1996) hanno proposto il modello della proteotossicità, basato sull'evidenza sperimentale che proteine estranee o denaturate risultano essere potenti induttori di sintesi delle Hsp. Secondo questo modello un agente stressante provocherebbe la denaturazione di determinate proteine cellulari e le Hsp70 interverrebbero nei meccanismi preposti alla loro riparazione. La conseguenza sarebbe una diminuzione della disponibilità citosolica delle Hsp70 tale da indurre il rilascio delle Hsp70 complessate con l'HSF1. Una volta libero l'HSF1 si trasferirebbe nel nucleo dove muterebbe dallo stato monomero allo stato trimero a sua volta in grado di legarsi alle zone promoter del gene per l'Hsp. Qui rimarrebbe legato ma in forma inattiva: solo la fosforilazione indotta dallo stress attiverrebbe il fattore HSF1 e quindi la sintesi di Hsp70. Questo processo sarebbe in grado di autoregolarsi, in quanto un'elevata disponibilità di Hsp70 favorirebbe un loro legame con l'HSF1 e un successivo distacco di quest'ultimo dalla zona promoter, interrompendo quindi la sintesi di Hsp.

Sono state formulate diverse ipotesi inerenti i meccanismi di trasduzione del segnale indotto dallo stress ed in grado di regolare la sintesi delle Hsp. Voellmy (1996), ipotizzò un ruolo importante della variazione nei potenziali redox della cellula, quale elemento di regolazione nella produzione di Hsp. Calderwood et al. (1993), indicarono l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare e la stimolazione di alcuni enzimi (fosfolipasi C e A2) come secondi messaggeri importanti nella trasduzione del segnale. Bensaude (1996) ipotizzò che cambiamenti fisici della membrana plasmatica (elasticità e fluidità) potessero essere coinvolti nella sintesi di Hsp. Nonostante vi siano numerose ipotesi, il meccanismo attraverso il quale la cellula "riconosce" lo stato di stress e traduce tale segnale in reazioni che portano alla sintesi proteica, non è ancora del tutto chiaro.

5. BIOMONITORAGGIO AMBIENTALE

La presenza nell'ambiente di agenti inquinanti e del loro potenziale rischio di contaminazione può essere valutata applicando due diversi metodi:

- a) monitoraggio chimico-fisico (analitico-strumentale);
- b) biomonitoraggio.

Il monitoraggio chimico-fisico fornisce dati di tipo quantitativo e relativi all'istante del campionamento; viene espresso quindi in termini di concentrazioni relative ad ogni singolo inquinante. Il monitoraggio dell'inquinamento atmosferico viene, ad esempio, effettuato essenzialmente tramite centraline automatiche di rilevamento. Queste apparecchiature misurano direttamente le concentrazioni di determinati inquinanti in campioni d'aria prelevati dall'atmosfera. Questo tipo di monitoraggio, oltre a presentare il limite di elevati costi di acquisto e di manutenzione, generalmente esegue il rilevamento solo di pochi parametri (CO, NO_x, SO₂, etc.). Di conseguenza, risulta impossibile effettuare il controllo su vaste aree, basato su un'alta densità di punti di campionamento, mentre scarseggiano o mancano del tutto dati su molti contaminanti, come ad esempio metalli pesanti ed idrocarburi policiclici aromatici, che possono essere nocivi anche a basse concentrazioni.

Il biomonitoraggio, invece, è uno strumento innovativo che consente di trarre informazioni sullo stato dell'ambiente attraverso lo studio di organismi viventi. Questo metodo si basa sul principio che gli organismi assimilando sostanze presenti nell'ambiente, tossiche e non, vengono interessati da alterazioni metaboliche e morfologiche che riflettono la condizione ambientale, ed eventualmente il grado di inquinamento.

Tali variazioni ecologiche indotte dall'inquinamento sull'ambiente si manifestano, in modo più o meno evidente, a tre livelli diversi:

- 1) accumulo delle sostanze inquinanti negli organismi;
- 2) modificazioni morfologiche o strutturali degli organismi;
- 3) modificazioni nella composizione delle comunità animali e vegetali.

L'assorbimento di una sostanza tossica o costitutiva (O₂, H₂, micronutrienti essenziali) da parte degli organismi viventi consente di indicarne la presenza nell'ambiente e, in prima approssimazione, anche la concentrazione della stessa.

In genere ogni organismo vivente risponde in maniera diversa ai fattori sia naturali che antropici presenti nell'ambiente in cui essi vivono ed un'analisi morfologica e/o molecolare di questi organismi può evidenziare l'effettiva condizione dell'individuo o di un ecosistema.

Il biomonitoraggio, rispetto alle tecniche tradizionali realizzate con centraline mobili o fisse, presenta diversi vantaggi:

- ✓ costi di gestione limitati (materiale e allestimento);
- ✓ possibilità di monitorare, con facilità, vaste zone e territori diversificati, consentendo una adeguata mappatura del territorio;
- ✓ elevata sensibilità di alcune specie di organismi viventi;
- ✓ stima degli effetti combinati di più inquinanti sugli organismi viventi.

Il biomonitoraggio fu utilizzato per la prima volta in Scandinavia alla fine degli anni '60, quando furono utilizzati dei muschi per valutare l'inquinamento da metalli pesanti.

Successivamente l'uso di organismi per il monitoraggio ambientale si è notevolmente diffuso (Fernandez et al., 2002; Ruhling e Tyler, 2004) a contribuire all'utilizzo di questa metodica, per la valutazione della contaminazione ambientale, è stato certamente il notevole aumento dell'inquinamento registrato negli ultimi decenni.

5.1 Bioindicatori e bioaccumulatori

Gli organismi viventi possono essere impiegati per il monitoraggio ambientale sia come bioindicatori sia come bioaccumulatori.

Un "*bioindicatore*" è un organismo che subisce variazioni evidenti nella fisiologia, nella morfologia o nella distribuzione spaziale in risposta al grado di inquinamento a cui esso è esposto.

Le principali caratteristiche valutate negli studi di biomonitoraggio sono:

- ✓ modificazioni morfologiche;

- ✓ variazioni della vitalità (es. variazioni del numero di individui bioindicatori che occupano l'area in esame);
- ✓ alterazioni funzionali;
- ✓ eventuali capacità di accumulo di sostanze inquinanti.

Un bioindicatore ottimale è un organismo che consente di stabilire una precisa correlazione tra le modificazioni biologiche e i livelli di inquinante a cui è esposto, permettendo un'analisi quantitativa oltre che qualitativa del tasso di inquinamento.

Un “*bioaccumulatore*” è un organismo che sopravvive in presenza di inquinanti e che, consentendo di misurare il contenuto e l'accumulo di un inquinante nei suoi organi e tessuti, permette di ricostruire il livello di deposito sul territorio.

Un organismo può essere utilizzato come bioaccumulatore solo se presenta specifiche caratteristiche quali:

- 1) capacità di accumulare la sostanza in esame fino ad elevate concentrazioni;
- 2) tolleranza nei confronti della sostanza in esame (un organismo che non possiede tale requisito non permette di evidenziare elevate concentrazioni e quindi livelli elevati di inquinamento);
- 3) possibilità di definirne l'età (l'accumulo di una sostanza è funzione della concentrazione ma anche del tempo di esposizione).

5.2 Biomarcatori o indici di stress (Biomarkers)

Alle indagini di biomonitoraggio è stato recentemente affiancato un altro approccio metodologico basato sulla analisi delle risposte che un organismo, una popolazione o una comunità naturale può dare se sottoposto a stress chimico ambientale.

La National Academy of Science statunitense definisce biomarker “l'alterazione, indotta da un contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari, che può essere evidenziata e quantificata in un sistema biologico”.

Oggi il concetto si è evoluto e si definisce biomarkers o indice di stress “la variazione di una risposta biologica (biochimica, molecolare, cellulare, fisiologica o comportamentale) che può essere correlata all'esposizione e/o all'effetto tossico di composti inquinanti” (Peakal et al., 1994).

Le risposte che l'organismo realizza quando si trova a contatto con una sostanza chimica rappresentano "potenziali biomarkers" (Shugart et al., 1992) utilizzabili per il monitoraggio ambientale (Bayne et al., 1979).

Mediante lo studio delle risposte immediate il biomarker permette di prevedere con notevole anticipo l'insorgenza di effetti nocivi come cancerogenesi, alterazioni patologiche, diminuzione delle capacità riproduttive, e mortalità.

Quando un composto tossico entra in un ecosistema (marino, terrestre o d'acqua dolce) determina una serie d'alterazioni o danni di differente entità che vanno dal danno molecolare e citologico, fino a giungere ad alterazioni strutturali degli organismi e quindi delle popolazioni o della comunità (Olsson et al., 2005).

La tossicità primaria di un contaminante, molto pericolosa perché non evidenziabile ad un'analisi generica, agisce, in linea generale, a livello molecolare, determinando modificazioni delle attività enzimatiche, alterazioni del DNA, RNA, proteine etc.; successivamente gli effetti si possono rilevare, con un meccanismo a cascata, a livello citologico, tissutale, di organo ed organismo fino ad interessare l'intera popolazione.

Gli organismi che subiscono uno stress tossico per un inquinante rispondono in un primo momento attivando meccanismi adattativi tendenti a neutralizzare l'azione nociva e riequilibrare l'omeostasi nell'organismo.

Le risposte omeostatiche a livello primario più note sono l'attivazione di sistemi multienzimatici come le monoossigenasi, gli enzimi coniugati, o le metallotioneine che attualmente sono considerate un'ottima classe di biomarkers per l'analisi della contaminazione da metalli pesanti poiché è stato dimostrato che all'aumento della concentrazione dell'inquinante, nel caso specifico dei metalli pesanti, corrisponde l'aumento del livello di queste molecole nei tessuti.

Dal confronto tra le concentrazioni dei biomarkers presenti nei soggetti bioindicatori, campionati in aree da testare e quelli degli organismi provenienti da aree incontaminate possono derivare informazioni sui rischi a cui sono soggetti gli ecosistemi (Decaprio, 1997).

I biomarcatori possono essere divisi in tre classi:

- 1) *biomarkers d'esposizione*: è la risposta di un organismo che indica l'esposizione ad un composto chimico o ad una classe di composti, ma che

non fornisce nessuna indicazione dei reali effetti tossicologici sull'organismo;

- 2) *biomarkers d'effetto*: è una modificazione biochimica o fisiologica, misurabile in un tessuto o in un fluido corporeo, associata ad un possibile o effettivo stato di malattia;
- 3) *biomarkers di suscettibilità*: si riferisce all'innata o all'acquisita capacità di un organismo a rispondere ad una specifica sostanza xenobiotica.

I biomarkers d'esposizione rilevano la presenza di xenobiotici o dei loro metaboliti quindi possono essere utilizzati per confermare o stimare l'esposizione di individui o popolazioni ad una particolare sostanza, fornendo un legame tra esposizione esterna e dose interna.

I biomarkers d'effetto valutano la risposta dell'organismo e possono essere usati per documentare effetti avversi dovuti all'esposizione e all'assorbimento di una sostanza chimica.

Generalmente i biomarkers d'effetto più sensibili sono rappresentati da alterazioni nei livelli e nell'attività degli enzimi di biotrasformazione che nei pesci possono essere indotti o inibiti dall'esposizione a xenobiotici (Bucheli et al., 1995). Infatti, parallelamente all'effetto negativo della sostanza tossica, nell'organismo esposto si sviluppano delle risposte adattative che tendono a riportare il sistema ad uno stato di omeostasi. In particolare, le risposte a livello molecolare tendono a diminuire l'effetto tossico del composto inquinante, grazie all'induzione di sistemi multienzimatici o di proteine di legame, come le metallotioneine.

In base alla loro specificità di risposta nei confronti di composti inquinanti, i biomarkers possono essere specifici oppure generali.

I *biomarkers specifici* rappresentano l'insieme delle risposte molecolari e biochimiche che si realizzano in seguito all'esposizione ad una specifica classe di contaminanti (es. l'induzione delle metallotioneine da parte dei metalli e l'inibizione della colinesterasi dovuta all'azione specifica di alcuni pesticidi) permettendo di risalire al responsabile della contaminazione e in pochi casi ad uno specifico contaminante.

I *biomarkers generali* rappresentano le risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico che non possono essere ricondotte ad un

inquinante in particolare, ma rappresentano uno stato generale di stress dell'organismo (es. danni al DNA).

I *biomarkers molecolari* forniscono informazioni circa le risposte degli organismi a livelli di organizzazione biologica molto bassi, offrendo quindi la possibilità di ottenere indicazioni tempestive e sensibili dell'influenza dei composti tossici su tali sistemi. Inoltre hanno un ruolo importante anche nel controllo e nella valutazione dell'efficacia dei mezzi di recupero ambientale poiché facilmente misurabili in diverse specie durante le fasi di bonifica.

5.3 Gli isopodi oniscidei come bioindicatori e bioaccumulatori

E' già noto da tempo che negli isopodi oniscidei la quasi totalità degli inquinanti assimilati tramite gli alimenti o, comunque, assunti per altre vie dall'ambiente esterno, si accumula nelle ghiandole digestive dette anche ciechi digestivi o epatopancreas.

5.3.1 Epatopancreas ed accumulo di metalli pesanti

L'apparato digerente degli isopodi oniscidei consiste di un breve esofago, dello stomaco o proventricolo, di un lungo intestino e delle ghiandole digestive dette anche ciechi digestivi o epatopancreas.

L'epatopancreas rappresenta l'unico elemento del tratto digerente di origine endodermica. Esso è costituito nella quasi totalità delle specie da due paia di tubicini allungati che si originano dallo stomaco e si estendono caudalmente sino a raggiungere spesso l'ultimo pereionite. In alcune specie, quali ad esempio *Ligia italica*, sono presenti, invece, tre coppie di ghiandole digestive, di cui una caratterizzata da una minore lunghezza.

La parete dell'epatopancreas è caratterizzata da un epitelio monostratificato poggiante su una lamina basale a sua volta circondata da una rete di miociti. Le cellule epiteliali sono di grandi dimensioni e contengono un grande nucleo poliploide (256 C in *Porcellio scaber*; Fogarty e Witkus, 1989). L'estremità terminale cieca presenta spesso cellule di tipo embrionale, frequentemente in mitosi.

Negli isopodi oniscidei l'epitelio dell'epatopancreas contiene due diversi tipi cellulari: le cellule grandi dette pure cellule B (basophilic) o cellule α o cellule R e le cellule piccole dette pure cellule S (small) o cellule β .

Le cellule B presentano l'apice cellulare rivestito da un orletto di fitti e lunghi microvilli e sono caratterizzate da un contenuto in numerose gocce lipidiche, da un apprezzabile sviluppo del RER e da numerosi ribosomi liberi; in esse sono presenti numerosi mitocondri spesso localizzati in prossimità di piccole invaginazioni della membrana in sede basale, piccole vescicole sparse nel citoplasma e granuli di glicogeno. Il loro citoplasma presenta in genere una notevole densità.

Le loro caratteristiche ultrastrutturali non appaiono costanti in quanto strettamente legate alle condizioni di nutrizione dell'animale. Negli animali sottoposti a digiuno il contenuto in lipidi si riduce, ed i mitocondri si riducono di numero e diventano successivamente rigonfi. In condizioni di digiuno prolungato compaiono piccoli vacuoli e autofagosomi ed il RER diventa vescicoloso mentre il glicogeno sparisce del tutto. Quando l'individuo viene rialimentato con cibo ricco in lipidi, le cellule B accumulano rapidamente numerose gocce lipidiche e nel loro citoplasma si ricostituiscono numerosi mitocondri con matrice densa, corpi perossisoma-simili e RER costituito da cisterne estese e disposte concentricamente.

L'organizzazione ultrastrutturale si modifica profondamente anche dopo una dieta carboidratica o dopo una dieta basata esclusivamente su lettiera vegetale, dimostrando così la notevole plasticità dell'attività e dell'organizzazione delle cellule B (Storch, 1984).

Le cellule S presentano un'organizzazione strutturale di base abbastanza simile a quella delle cellule B. Il loro citoplasma è caratterizzato da una densità in genere meno rilevante e da un più ridotto sviluppo del RER. Esse non rispondono però nella stessa maniera delle cellule B agli stress nutrizionali. La loro principale caratteristica differenziale è rappresentata da numerose vescicole delimitate da membrana che rappresentano i siti di accumulo sia di metalli pesanti sia di calcio e urati.

Negli individui prelevati da ambienti non particolarmente inquinati, i metalli che più frequentemente si riscontrano nelle vescicole in esse contenute sono Fe, Cu e Zn. Negli individui prelevati da ambienti inquinati sono stati riscontrati anche Pb, Ni, Cd e Hg (Donadey, 1966; Wieser, 1968; Alikhan, 1972; Witkus et al., 1987; Prosi et

al., 1983; Marcaillou et al., 1986). Il piombo si accumula esclusivamente nella regione anteriore dei ciechi, entro le cellule più vecchie (Prosi et al., 1983). Il nichel, invece, si accumula principalmente (73-89%) nel citoplasma delle cellule S (Alikhan e Storch, 1990).

In una recente indagine sperimentale, condotta su *Porcellio scaber*, Köhler et al. (1996) hanno studiato le risposte ultrastrutturali fornite dalle cellule dell'epitelio dell'epatopancreas dopo somministrazione con cibo contaminato con concentrazioni diverse di sali di cadmio, zinco e piombo. Le alterazioni ultrastrutturali rilevate a carico delle cellule B e delle cellule S sono risultate essere dose dipendenti; le più basse concentrazioni dei metalli hanno determinato moderate e variabili alterazioni dei diversi organuli cellulari, mentre le concentrazioni più elevate si sono tradotte in cambiamenti ben più gravi e patologici. L'insieme degli effetti osservati, a detta dei suddetti autori, potrebbe essere usato come biomarkers di esposizione subcronica alla contaminazione da metalli pesanti.

Le cellule S sono coinvolte, come sopra ricordato, anche nell'assorbimento ed accumulo di diversi cataboliti (ad es., acido urico e solfato di rame); da tale punto di vista esse appaiono simili ai nefrociti degli insetti (Marcaillou et al., 1986).

6. MATERIALI E METODI

La ricerca è stata condotta su individui adulti, sessualmente maturi, di entrambi i sessi, di *Armadillidium granulatum* Brandt, *Armadillidium vulgare* (Latreille) e *Porcellio laevis* Latreille.

Gli esemplari utilizzati per la ricerca sono stati raccolti nel corso di diverse campagne faunistiche in diversi ambienti naturali, non contaminati, della Sicilia orientale e meridionale (Fig. 3) e mantenuti sino all'inizio della ricerca in allevamento in condizioni di temperatura e fotoperiodo naturali ed alimentati con foglie di castagno e con patate.

Per le indagini sperimentali sono stati selezionati individui di entrambi i sessi aventi taglia omogenea avendo cura di selezionare, per quanto riguarda le femmine, individui non in fase riproduttiva (senza marsupio).

Una prima fase dell'indagine è stata rivolta a valutare il metodo di somministrazione dei metalli più efficace per il conseguimento ottimale dei risultati e poiché in letteratura sono state riscontrate due diverse metodiche di somministrazione di cibo contaminato (Köhler et al., 1996; Hornung et al., 1998) è stata, in una prima fase, effettuata una loro valutazione comparativa conducendo la ricerca solo su una specie e precisamente su *Armadillidium granulatum*.

La prima delle due metodiche si è basata sui criteri proposti da Köhler et al. (1996); per ogni tesi a confronto, sono stati utilizzati 60 individui (30 femmine e 30 maschi) che sono stati collocati in box di plastica (20 x 20 x 9 cm) il cui fondo era ricoperto con 10 g di lettiera di foglie di castagno preventivamente sterilizzate ed asciugate in stufa a 90 °C per 24 h e quindi accuratamente imbevute in maniera omogenea con acqua distillata contenente in soluzione i sali dei metalli pesanti saggiati.

Tale lettiera di foglie di castagno ha rappresentato sia il substrato sia il cibo per gli isopodi. Le tesi messe a confronto sono state le seguenti:

- ✓ controllo;
- ✓ 10, 50, 100 mg Cd²⁺ L⁻¹ (come CdCl₂);
- ✓ 100, 500, 1.000 mg Pb²⁺ L⁻¹ (come PbCl₂).

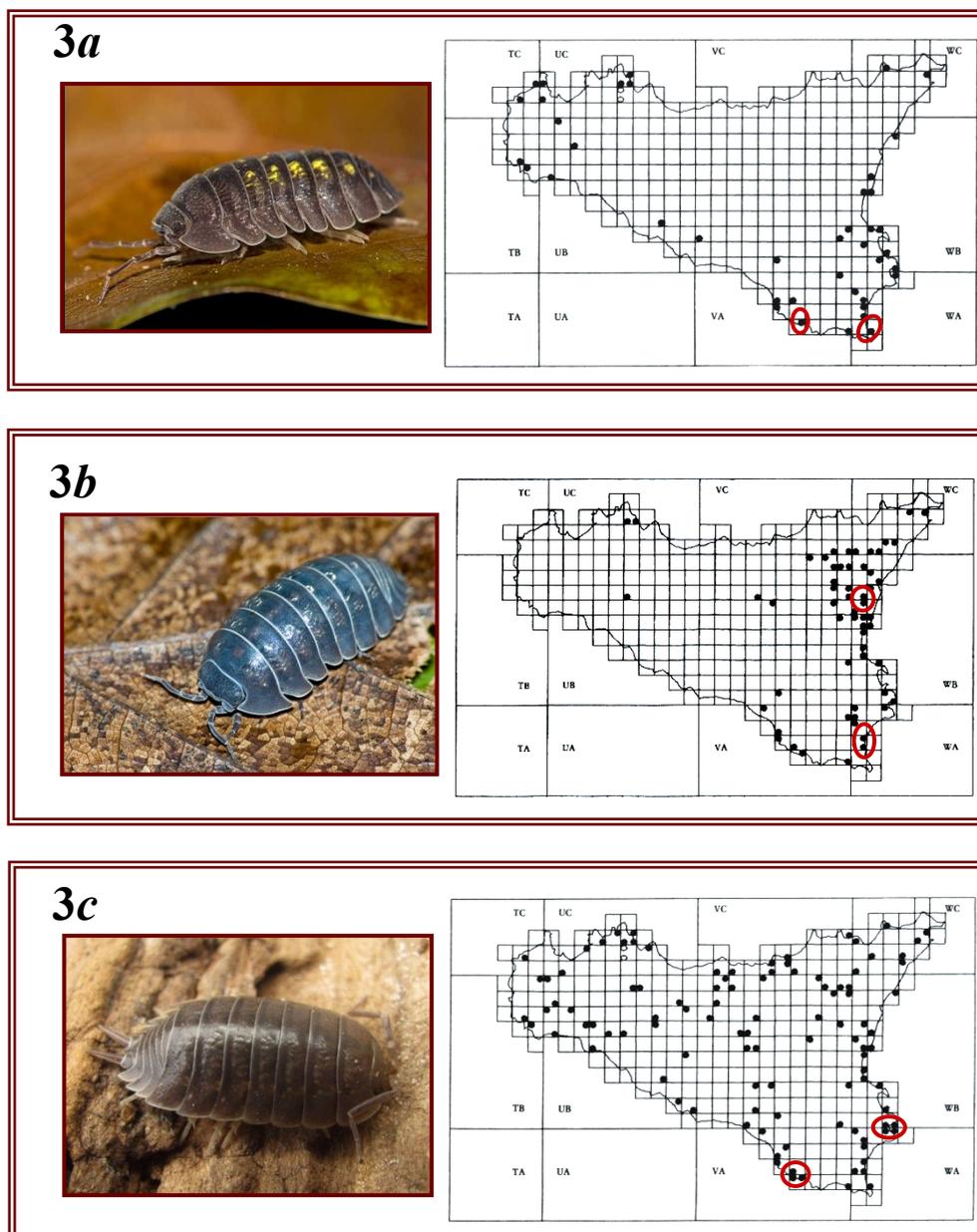


Fig. 3 a, b, c - Specie di isopodi oniscidei (Crustacea) studiate e loro distribuzione in Sicilia:

- a.** *Armadillidium granulatum* Brandt;
- b.** *Armadillidium vulgare* (Latreille);
- c.** *Porcellio laevis* Latreille.

(**Cerchietto rosso**: siti di raccolta). Da: Caruso et al., (1987) - Isopodi terrestri di Sicilia ed Isole circumsiciliane. *Animalia*, 14 suppl., pp. 168, 188, 200.

L'allevamento degli isopodi in presenza della lettiera contaminata si è protratto per 21 giorni. Le concentrazioni dei sali di cadmio e di piombo più elevate sono considerate ben al di sotto della LC_{50} (per un trattamento della durata di 21 giorni), un parametro generalmente utilizzato nei test di tossicità (Crommentuijn et al., 1994; Köhler et al., 1996).

Alla fine del periodo di trattamento gli animali sono stati trasferiti in altri box di plastica con le stesse caratteristiche e nutriti nuovamente con foglie di castagno utilizzate come lettiera sul fondo degli stessi.

La seconda delle due metodiche saggiate si è basata su quanto proposto da Hornung et al. (1998); anche in questo caso, per ogni tesi a confronto sono stati utilizzati 60 individui (30 femmine e 30 maschi) che sono stati collocati in box di plastica (20 x 20 x 9 cm) il cui fondo era ricoperto con uno strato multiplo di carta bibula umidificata con acqua deionizzata.

Gli animali sono stati sottoposti, sempre per 21 giorni, ad un regime alimentare basato sulla somministrazione di una quantità predeterminata di cibo sotto forma di compresse preparate utilizzando una miscela costituita (Hornung et al., 1998) da :

- ✓ 50% di foglie di castagno (preventivamente sterilizzate, essiccate in stufa per 24 h a 70 °C, e finemente triturate);
- ✓ 40% di mangime per conigli nani (anch'esso finemente tritato);
- ✓ 10% di fecola di patate.

Una parte di tale miscela è stata utilizzata per preparare le compresse destinate ad alimentare gli animali utilizzati come controllo.

La rimanente parte della miscela è stata suddivisa in tre frazioni di 10 g ciascuna alle quali sono stati aggiunti 10 ml delle seguenti soluzioni di cloruro di cadmio e di cloruro di piombo:

- ✓ 10, 50, 100 mg Cd^{2+} L⁻¹ (come $CdCl_2$);
- ✓ 100, 500, 1.000 mg Pb^{2+} L⁻¹ (come $PbCl_2$);

La miscela, così imbevuta, è stata asciugata in stufa per 48 h a 70 °C e quindi utilizzata per la preparazione di compresse del peso di 0,5 g ciascuna.

Le compresse di cibo destinate agli animali controllo sono state preparate con miscela imbevuta con acqua deionizzata.

All'inizio del trattamento sono state collocate in ciascun box 5 compresse di miscela che venivano reintegrate ogni qualvolta risultava necessario; nel corso dell'intero periodo di trattamento sono state somministrate complessivamente 20 compresse per ciascuna tesi equivalenti ad un peso totale di 10 g di miscela. Alla fine del periodo di trattamento i residui di cibo non consumato sono stati asportati e pesati e gli animali sono stati nutriti nuovamente con foglie di castagno utilizzate come lettiera sul fondo dei box.

A distanza di tre giorni dal termine del trattamento (periodo necessario per raggiungere la clearance dell'organo), per ciascuna delle modalità di somministrazione del cibo contaminato saggiate, sono state effettuate indagini rivolte a valutare:

- a) la concentrazione del cadmio e del piombo negli ingredienti utilizzati per la preparazione delle compresse, nelle compresse confezionate e nelle foglie di castagno utilizzate, dopo contaminazione con i sali dei metalli, quale fonte di cibo;
- b) la concentrazione del cadmio e del piombo negli animali trattati;
- c) le variazioni dell'organizzazione ultrastrutturale dell'epatopancreas mediante osservazioni condotte subito dopo il termine del trattamento.

Poiché l'impiego delle due metodiche utilizzate non ha prodotto risultati significativamente differenti, per la seconda fase della ricerca la scelta è caduta sulla metodica proposta da Köhler et al. (1996), più semplice da mettere in atto e, oltre ad *A. granulatum*, questa ulteriore fase delle indagini ha riguardato altre due specie di oniscidei, *A. vulgare* e *P. laevis*.

Anche in questo caso sono stati utilizzati, per ciascuna tesi a confronto, 60 individui (30 femmine e 30 maschi) collocati in box di plastica (20 x 20 x 9 cm) il cui fondo era ricoperto con 10 g di lettiera di foglie di castagno preventivamente sterilizzate ed asciugate in stufa a 90 °C per 24 h e quindi accuratamente imbevute in maniera omogenea con acqua distillata contenente in soluzione i sali dei metalli pesanti saggiati utilizzando le stesse concentrazioni precedentemente riportate.

L'allevamento degli isopodi in presenza della lettiera contaminata si è protratto, anche in questo caso, per 21 giorni.

A tre giorni di distanza dal termine del trattamento sono state effettuate indagini rivolte a valutare:

- a) la concentrazione del cadmio e del piombo nelle foglie di castagno utilizzate, dopo contaminazione con i sali dei metalli, quale lettiera e cibo;
- b) la concentrazione del cadmio e del piombo negli animali trattati;
- c) le variazioni relative all'organizzazione morfologica, istologica ed ultrastrutturale dell'epatopancreas;
- d) l'immunolocalizzazione delle metallothioneine e di Hsp70 mediante impiego di anticorpi anti-MT e anti Hsp70;
- e) estrazione di RNA, sintesi di cDNA, RT-PCR, elettroforesi su gel, clonaggio e sequenziamento delle MTs.

6.1 Determinazione della concentrazione dei metalli pesanti

Per la determinazione del contenuto in cadmio e in piombo quattro individui, per ciascuna tesi a confronto, preventivamente pesati con una bilancia analitica, sono stati immersi in vials con tappo a vite da 10 ml contenenti 3 ml di HNO₃ Suprapur al 65% + 1 ml di H₂O₂ (soluzione mineralizzante).

Le vials sono state poi trasferite al Laboratorio di Chimica Ambientale Strumentale del Dipartimento "G. F. Ingrassia" dell'Università di Catania e trattate con la seguente procedura:

- 1) la soluzione di digestione è stata corretta ad un volume totale di 5 ml di HNO₃ ed 1 ml di H₂O₂;
- 2) i campioni sono stati quindi mineralizzati in un mineralizzatore MILESTONE 1200;
- 3) i campioni sono stati saggiati in un ICP-MS PERKIN ELMER ELAN DRC-E per la determinazione del contenuto in Cd ed in Pb.

I valori sono stati riportati a µg (di metallo)/g (di animale, peso secco).

Per evitare che la digestione potesse avere interferenze da parte di metalli non costituenti i campioni, le vessels che dovevano accogliere il campione per la mineralizzazione sono state accuratamente pulite con acqua acidulata (H₂O bidistillata/HNO₃ al 50%).

Lo strumento è stato opportunamente tarato per ogni metallo mediante calibrazione con standards a titolo noto.

6.2 Indagini al microscopio elettronico a trasmissione

Per tali indagini alcuni animali sono stati sacrificati, tre giorni dopo il termine del trattamento, mediante decapitazione e immediatamente immersi in soluzione salina di Ringer modificata per gli isopodi sec. Legrand (Bessè, 1976) al fine di operare il prelievo dell'epatopancreas.

La fissazione è stata effettuata in glutaraldeide 2,5% in tampone fosfato Sörensen 0,1 M, pH 7,4 per 2 h a t. a.; dopo ripetuti lavaggi nello stesso tampone è stata effettuata la post-fissazione in tetrossido di osmio all'1% in tampone fosfato Sörensen 0,1 M, pH 7,4 per 1 h a t. a..

La disidratazione è stata condotta in alcool-ossido di propilene; l'inclusione è stata effettuata in Embed-812 (TAAB).

Sezioni semifini ed ultrasottili sono state realizzate all'ultramicrotomo ULTRACUT LEICA mediante lama di diamante DIATOME.

Le sezioni semifini sono state colorate prevalentemente mediante impiego di blu di toluidina allo 0,5% in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,4; una parte delle sezioni è stata, invece, colorata con violetto di genziana (soluzione idroalcolica all'1%).

Le sezioni ultrasottili, raccolte su griglie di rame-rodio da 200 o 300 meshes, sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo sec. Reynolds (1963).

Le osservazioni sono state condotte con i microscopi elettronici PHILIPS 208 e PHILIPS CM10 a 60 Kv.

6.3 Indagini al microscopio elettronico a scansione

Anche per tali indagini, alcuni individui di entrambi i sessi sono stati sacrificati mediante decapitazione e immediatamente immersi in soluzione salina di Ringer modificata per gli isopodi al fine di operare il prelievo dell'epatopancreas. Immediatamente dopo il prelievo, l'organo è stato fissato in glutaraldeide al 2,5% in tampone Sörensen 0,1 M, pH 7,4 per 2 h a t. a.

Dopo rapido lavaggio in tampone e disidratazione nella serie crescente degli alcoli si è proceduto alla disidratazione mediante EMSCOPE CPD 750 critical point dryer. I campioni sono stati, quindi, montati su stubs e metallizzati con oro mediante SPUTTER COATER, POLARON SC7640.

Le osservazioni sono state condotte presso il Laboratorio di Microscopia Elettronica del Dipartimento “G. F. Ingrassia” dell’Università degli Studi di Catania, con il microscopio elettronico ad emissione di campo HITACHI S4000.

6.4 Indagini immunocitochimiche

Per tali indagini, effettuate presso il laboratorio del Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina dell’Università degli Studi di Messina, con la guida dei proff. Salvatore Fasulo ed Angela Mauceri, diversi esemplari sono stati sacrificati mediante decapitazione ed immediatamente immersi in soluzione salina di Ringer modificata per gli isopodi al fine di operare il prelievo dell’epatopancreas. La fissazione è stata effettuata in paraformaldeide 8% in tampone fosfato, pH 7,4, 0,1 M per 4 h a t. a.

Dopo disidratazione nella serie crescente di alcool etilico e immersione in xilolo, i campioni sono stati inclusi in paraffina e quindi processati con microtomo rotativo per ottenere sezioni spesse 4-5 μm sulle quali sono stati effettuati i tests immunocitochimici finalizzati al rilevamento di metallotioneine e Hsp70.

6.4.1 Immunolocalizzazione delle metallotioneine

Le reazioni immunocitochimiche sono state eseguite mediante metodo indiretto.

Dopo sparaffinatura in xilolo, le sezioni sono state reidratate nella serie decrescente degli alcoli, lavate in acqua distillata e, quindi, permeabilizzate con Triton X-100, 1% in PBS per 1’ e nuovamente lavate in PBS per 10’. E’ stata, quindi, effettuata l’incubazione in NGS (siero normale di capra) per 60’ in camera umida a t. a. al fine di bloccare i siti aspecifici di legame con l’anticorpo.

Le sezioni sono state successivamente incubate in anti-MT mouse monoclonal primary antibody (DAKO, Corp., USA), diluito 1:50 in PBS, in camera umida a 4 °C

overnight. Dopo lavaggio in PBS per 10' è stata effettuata l'incubazione in TRIT-conjugate goat anti-mouse IgG secondary antibody (SIGMA, USA), diluito 1:50 in PBS per 2 h al buio ed a t. a..

Le sezioni, dopo un ultimo lavaggio in PBS, sono state montate in glicerina tamponata e conservate al buio a -20 °C fino al momento dell'osservazione.

La specificità di reazione è stata valutata mediante un controllo negativo, con omissione dell'anticorpo primario, e un controllo positivo, con preassorbimento dell'antigene corrispondente.

I preparati sono stati osservati e fotografati mediante microscopio motorizzato ZEISS AXIO IMAGER Z1 ad epifluorescenza.

6.4.2 Immunolocalizzazione di Hsp70

Le sezioni sono state sparaffinate in xilolo, reidratate nella serie decrescente degli alcoli e quindi lavate in acqua distillata ed infine trattate con Triton X-100, 1% in PBS per 1'. Subito dopo il lavaggio in PBS per 10' è stata eseguita l'incubazione in NGS (siero normale di capra) al 20% in camera umida per 60' a t. a. In seguito le sezioni sono state incubate, in camera umida a 4 °C overnight, in anti-Hsp70 mouse monoclonal primary antibody (ABCAM) diluito 1:100 in PBS. Dopo lavaggio in PBS per 10' è stata effettuata l'incubazione in TRIT-conjugate goat anti-mouse IgG secondary antibody (SIGMA, USA), diluito 1:50 in PBS per 2 h al buio ed a t. a..

Le sezioni, dopo un ultimo lavaggio in PBS, sono state montate in glicerina tamponata e conservate al buio a -20 °C fino al momento dell'osservazione.

Anche in questo caso, per verificare la validità della reazione sono stati effettuati sia il controllo positivo che negativo.

I preparati sono stati osservati e fotografati al microscopio motorizzato ad epifluorescenza ZEISS AXIO IMAGER Z1.

6.5 Estrazione di RNA

Per l'estrazione dell'RNA, alcuni individui, per ciascuno dei trattamenti a confronto, sono stati rapidamente congelati in azoto liquido e conservati a -80 °C.

Utilizzando il protocollo suggerito da Chomczynski e Sacchi (1987), 150 mg di ciascun campione (animali interi) sono stati trattati così come di seguito riportato:

- a) omogeneizzazione mediante ULTRA-TURRAX del tessuto con aggiunta di TRIzol in rapporto 1:100 col peso del campione;
- b) addizione di 300 µl di cloroformio agitando per qualche secondo;
- c) centrifugazione per 15' a 4 °C a 12.000 rpm e recuperare solo la fase acquosa;
- d) precipitazione dell'RNA aggiungendo 750 µl di isopropanolo a 4 °C;
- e) centrifugazione per 10' a 4 °C e a 12.000 rpm ed eliminazione con cautela del surnatante;
- f) lavaggio dell'RNA con aggiunta di etanolo diluito al 75% con acqua DEPC-trattata (Dietilpirocarbonato);
- g) eliminazione dell'etanolo, facendo asciugare il pellet di RNA e risospingendolo in un volume di acqua DEPC-trattata adeguato all'ottenimento della giusta fluidità del campione di RNA.

La purezza e la concentrazione dell'RNA sono state verificate sia mediante spettrofotometria sia mediante elettroforesi su gel di agarosio in condizioni denaturanti. L'analisi elettroforetica è stata effettuata su gel d'agarosio all'1% in tampone TAE (Tris-Acetato-EDTA). La quantificazione spettrofotometrica è stata realizzata tramite misura di assorbanza a 260 nm con l'utilizzo di NANODROP 2000 SPETTROPHOTOMETER (Thermo Scientific). I rapporti 260/280 nm e 260/230 nm sono stati calcolati per valutare eventuali contaminazioni proteiche o da solventi organici.

Considerati non ottimali i risultati ottenuti con tale procedura, in quanto i campioni risultavano contaminati dalla presenza di fenoli, per una più efficace messa a punto del protocollo, l'estrazione dell'RNA è stata eseguita variando sia alcuni steps della metodologia TRIzol LS reagent sia la modalità di omogeneizzazione del materiale tissutale di partenza.

✓ Una seconda prova è stata effettuata utilizzando l'organismo in toto deprivato di esoscheletro ed omogeneizzato con ULTRA-TURRAX.

✓ In una terza prova, il campione è stato omogeneizzato sostituendo l'ULTRA-TURRAX con un pestello costruito ad hoc per l'omogeneizzazione direttamente in

provetta. Tale metodo ha consentito di ridurre notevolmente la perdita del materiale iniziale e di evitare la possibilità di contaminazione tra un campione e l'altro.

✓ Una quarta prova è stata effettuata utilizzando come tessuto di partenza un pool del solo epatopancreas ricavato da quattro individui ed omogeneizzato con pestello.

I campioni di RNA estratto con quest'ultimo approccio sono stati purificati per eliminare eventuali tracce di fenoli utilizzando il seguente protocollo basato sull'uso di cloroformio, etanolo e Na-acetato:

- a) aggiungere un volume di cloroformio e agitare con vortex per 3' - 5';
- b) centrifugare per 5' a 10.000 rpm;
- c) trasferire la fase superficiale acquosa in una nuova provetta;
- d) aggiungere 3 volumi di etanolo freddo ed 1/10 di volume di sodio acetato pH 4,8;
- e) incubare a -20 °C per 1 h;
- f) centrifugare per 30' a 4 °C a 10.000 rpm;
- g) eliminare il surnatante ed aggiungere 1 ml di etanolo al 70%;
- h) centrifugare per 4' a 4 °C a 10.000 rpm;
- i) eliminare il surnatante e lasciare asciugare il pellet;
- j) risospendere in acqua DEPC-trattata.

✓ In una quinta ed ultima prova è stato ulteriormente cambiato il metodo di omogeneizzazione; è stato, infatti, utilizzato il TISSUELYSER (Qiagen) che prevede l'uso di provette contenenti biglie che, in seguito ad un movimento rotatorio generato da un dispositivo rotore associato all'uso del TRIzol, realizza una più accurata omogeneizzazione.

L'RNA è stato estratto dai pool di epatopancreas applicando piccole modifiche al protocollo classico; sono stati effettuati due passaggi in cloroformio (rispetto al singolo passaggio previsto) e l'RNA in etanolo assoluto è stato incubato per 30' a -80 °C (step omissso nel protocollo originale).

Quest'ultima procedura ha portato all'ottenimento di un campione di RNA migliore rispetto ai metodi precedentemente usati, anche se è risultata ancora presente una discreta assorbanza del campione a 230 nm, indice di una persistente lieve contaminazione da solventi organici.

6.6 Sintesi di cDNA

Il cDNA è stato sintetizzato usando 4 µg di RNA totale, 1 µl di oligo dT (150 pmoli/µl), 1 µl di dNTPs 10 mM; la miscela è stata portata ad un volume di 12 µl con acqua DEPC-trattata. La miscela è stata poi denaturata a 65 °C per 5' e posta in ghiaccio per altri 5'.

Successivamente sono stati aggiunti: 4 µl di reverse transcriptase buffer 5X, 2 µl di DTT 0.1 M, 0,5 µl di RNaseOUT™ (40 U/µl) (Invitrogen) e, dopo incubazione per 2' a 37 °C, è stato addizionato 1 µl (200 U) di M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen).

La miscela è stata incubata per 50' a 37 °C e quindi per 15' a 70 °C, per ottenere la disattivazione dell'enzima.

6.7 Reazione a catena della polimerasi (RT-PCR)

La reazione a catena della polimerasi è stata preparata utilizzando 2,5 µl buffer 10X, 1,5 µl MgCl₂, 2 µl primers (10 µM ciascuno), 1 µl cDNA template, 2 µl 10 mM dNTPs e 0,14 µl Eurotaq (5 U/µl) (Euroclone). La soluzione totale è stata portata ad un volume finale di 25 µl con acqua ultra pura.

Il programma usato per amplificare i frammenti si è basato su una denaturazione iniziale a 95 °C per 2' e su 35 cicli di trattamento così strutturati: 95 °C per 30'', temperatura di annealing variabile a seconda dei primers utilizzati per 30'', 72 °C per 1'.

Una fase di extention finale è stata eseguita a 72 °C per 5'.

Questo programma è stato effettuato con la EP-GRADIENT MASTERCYCLER (Eppendorf).

6.8 Disegno dei primers

Tutte le coppie di primers utilizzate sono riportate nella tabella I.

La totale assenza, in banca dati, di sequenze di metallotioneine degli isopodi non ha permesso la costruzione di primers specifici, per cui sono stati disegnati primers degenerati sulle regioni più conservate di allineamenti di sequenza di

metalloioneine di crostacei decapodi per i quali esistono, invece, numerose informazioni in banca dati.

Tab. I - Elenco delle coppie di oligonucleotidi sintetici (primers) saggiate per l'amplificazione in PCR.

Nome	Sequenza nucleotidica	Prodotto atteso (bp)
<i>MT_fwd1</i>	TGTAAGTGCAVNTCCTGYCG	118 bp
<i>MT_rev1</i>	CTAGGGRCAGCAVKWGCAAGG	
<i>MT_iso_fwd2</i>	ATGCCYGRHCCYTGCTGYA	162 bp
<i>MT_iso_rev2</i>	GGCTTGGWRCAKGTCTTG	
<i>MT_iso_fwd3</i>	GAKGAGTGYWCCAAGACSTGC	301 bp
<i>MT_iso_rev3</i>	TGAAANRGACAAYCAAATRTAC	
<i>MT_crab1_fwd</i>	ATGCCHGAYCCYTGCTG	248 bp
<i>MT_crab2_rev</i>	CTAGGGGCAGCAGGAGC	
<i>HSP70_iso_fwd</i>	CGGATTGGTTGGAGGATCTA	347 bp
<i>HSP70_iso_rev</i>	TCATGGCTCTCTCACCTTCA	
<i>ELF_isop_fwd1</i>	CTGCCATCTCYATGTACTTC	312 bp
<i>ELF_isop_rev1</i>	CTCCTGCTCAARCTGCAATTC	
<i>ELF_VU_fwd3</i>	GCTATGCCTTTGCCCGATGAAC	349 bp
<i>ELF_VU_rev3</i>	TGATCTGACCACCTCCACGATG	

Per quanto riguarda le *Hsp70*, essendo presente in GENBANK (NCBI) la sequenza di *P. laevis*, è stato possibile disegnare dei primers specifici.

E' stato, inoltre, considerato il gene referente *Elongation Factor (EF1)* come controllo positivo di amplificazione in PCR.

Per quanto riguarda *A. vulgare*, i primers per l'*EFI* sono stati disegnati in maniera specifica sulla sequenza corrispondente mentre, per le altre specie prese in considerazione è stata applicata la stessa strategia già descritta per le metallotioneine.

E' stata inoltre utilizzata, per l'amplificazione del gene delle *MT*, una coppia di primers disegnata da Leignel et al. (2008) sull'allineamento delle sequenze di tre specie di decapodi.

Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati da MWG-BIOTECH AG.

A causa della qualità non adeguata dell'RNA estratto, il cDNA utilizzato come template nel programma di RT-PCR non ha mai consentito l'amplificazione delle sequenze di nostro interesse e pertanto tale aspetto della ricerca non ha avuto esito positivo.

7. RISULTATI

7.1 Indagini preliminari condotte su *Armadillidium granulatum*

Come premesso nella sezione Materiali e Metodi, una prima fase della ricerca, condotta su *Armadillidium granulatum*, ha riguardato l'individuazione della più efficace metodica di somministrazione dei metalli pesanti attraverso la contaminazione della fonte utilizzata come cibo. In particolare sono state messe a confronto le metodiche suggerite da Köhler et al. (1996) e da Hornung et al. (1998) basate, rispettivamente, sull'impiego di foglie di castagno contaminate con le soluzioni dei sali dei metalli o sull'uso di compresse costituite da un impasto miscelato di foglie di castagno, mangime commerciale per conigli e fecola di patate.

7.1.1 Contenuto in metalli nelle fonti di cibo utilizzate

Le analisi condotte mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) hanno evidenziato un contenuto in metalli pressoché equivalente nelle due diverse fonti di cibo somministrate come risulta dalla Tab. II.

In generale, la concentrazione di metalli riscontrata nelle compresse contaminate utilizzate come fonte di cibo e nelle foglie di castagno contaminate è risultata quasi perfettamente correlata alle concentrazioni dei metalli delle soluzioni utilizzate per la contaminazione (Tab. II, Graf. I).

7.1.2 Contenuto in metalli negli animali trattati

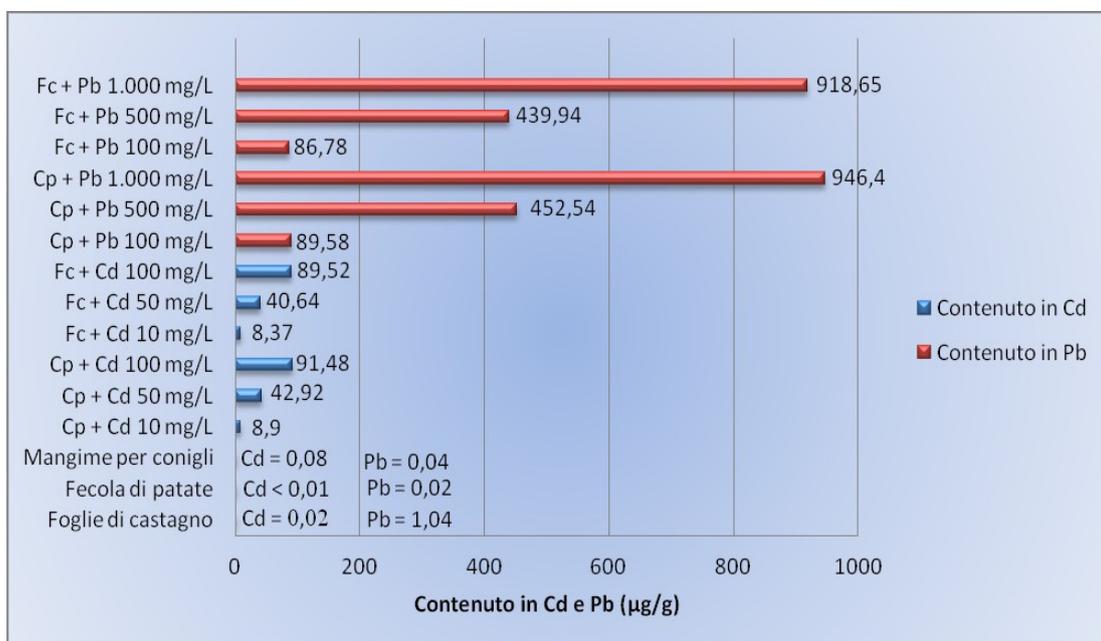
Le analisi condotte mediante ICP-MS su un campione di individui, sacrificati subito dopo le tre settimane di trattamento con le due diverse fonti di cibo contaminato con le crescenti concentrazioni dei due metalli saggiati, hanno messo in rilievo un progressivo accumulo dei metalli che però si è manifestato in modo ben differente dal punto di vista quantitativo tra cadmio e piombo (Tab. III a, b).

Infatti, a fronte di una quantità di Cd riscontrata negli animali controllo, pari a 0,53 µg/g (peso secco) in quelli nutriti con compresse ed a 0,42 µg/g (peso secco) in quelli nutriti con foglie di castagno, negli animali alimentati con compresse

Tab. II – Contenuto in cadmio ($\mu\text{g/g}$) ed in piombo ($\mu\text{g/g}$) dei diversi componenti utilizzati per la preparazione delle compresse di cibo, delle compresse confezionate e delle foglie di castagno trattate con le diverse concentrazioni di CdCl_2 e PbCl_2 .

Componenti	Contenuto in Cd ($\mu\text{g/g}$)	Contenuto in Pb ($\mu\text{g/g}$)
Foglie di castagno	0,02	1,04
Fecola di patate	< 0,01	0,02
Mangime per conigli	0,08	0,04
Miscela finale	0,06	0,59
Comprese + Cd 10 mg L⁻¹	8,90	-
Comprese + Cd 50 mg L⁻¹	42,92	-
Comprese + Cd 100 mg L⁻¹	91,48	-
Comprese + Pb 100 mg L⁻¹	-	89,58
Comprese + Pb 500 mg L⁻¹	-	452,54
Comprese + Pb 1.000 mg L⁻¹	-	946,40
Foglie di castagno + Cd 10 mg L⁻¹	8,37	-
Foglie di castagno + Cd 50 mg L⁻¹	40,64	-
Foglie di castagno + Cd 100 mg L⁻¹	89,52	-
Foglie di castagno + Pb 100 mg L⁻¹	-	86,78
Foglie di castagno + Pb 500 mg L⁻¹	-	439,94
Foglie di castagno + Pb 1.000 mg L⁻¹	-	918,65

Graf. I – Contenuto in Cd e Pb ($\mu\text{g/g}$) dei diversi componenti utilizzati per le preparazioni delle compresse di cibo, delle compresse confezionate (Cp) e delle foglie di castagno (Fc) trattate con le diverse concentrazioni di CdCl_2 e di PbCl_2 .



Tab. III a – Contenuto in cadmio ($\mu\text{g/g}$ peso secco) degli individui di *Armadillidium granulatum* trattati con le diverse concentrazioni del metallo e con le due fonti di cibo contaminato.

Concentrazioni	Individui alimentati con compresse	Individui alimentati con foglie di castagno
Controllo	0,53	0,42
Cd 10 mg L⁻¹	21,60	22,91
Cd 50 mg L⁻¹	68,31	63,54
Cd 100 mg L⁻¹	132,60	125,02

Tab. III b – Contenuto in piombo ($\mu\text{g/g}$ peso secco) degli individui di *Armadillidium granulatum* trattati con le diverse concentrazioni del metallo e con le due fonti di cibo contaminato.

Concentrazioni	Individui alimentati con compresse	Individui alimentati con foglie di castagno
Controllo	0,48	0,59
Pb 100 mg L⁻¹	2,58	3,18
Pb 500 mg L⁻¹	18,90	16,08
Pb 1.000 mg L⁻¹	44,16	38,61

contenenti dosi progressivamente crescenti del metallo sono state riscontrate concentrazioni superiori a quelle della fonte di cibo utilizzata e circa 40, 128 e 250 volte più elevate rispetto agli individui controllo e circa 54, 150 e 295 volte più elevate in quelli alimentati con foglie di castagno contaminate (Graf. II).

Anche per il piombo è stato registrato un accumulo progressivamente crescente del metallo in relazione alla dose somministrata, accumulo che è stato, però, quantitativamente inferiore rispetto a quello prevedibile sulla base della concentrazione del metallo presente nella fonte di cibo. Così, negli animali controllo è stata riscontrata una concentrazione modesta del metallo (0,48 µg/g di peso secco in quelli alimentati con compresse e 0,59 µg/g di peso secco in quelli alimentati con foglie di castagno) mentre in quelli trattati con le due fonti di cibo contaminate con concentrazioni progressivamente crescenti del metallo sono state riscontrate quantità rispettivamente maggiori di circa 5, 40, 92 volte in quelli nutriti con le compresse e 5, 27, 65 maggiori in quelli nutriti con foglie di castagno (Graf. III).

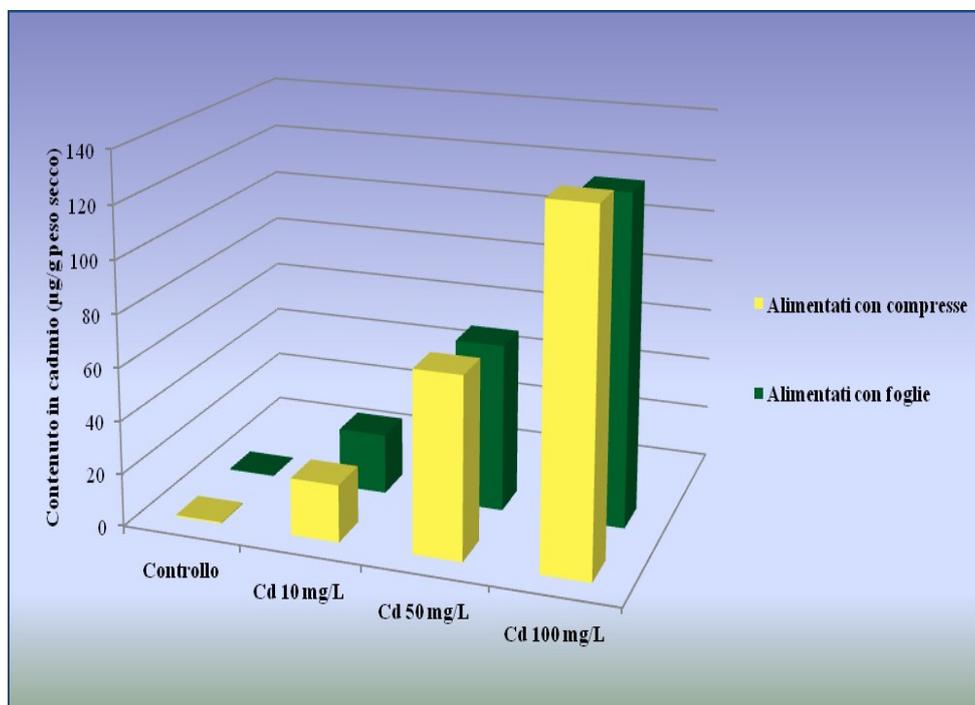
7.2 Indagini su *Armadillidium granulatum*, *Armadillidium vulgare* e *Porcellio laevis*

7.2.1 Contenuto in metalli nella fonte di cibo utilizzata

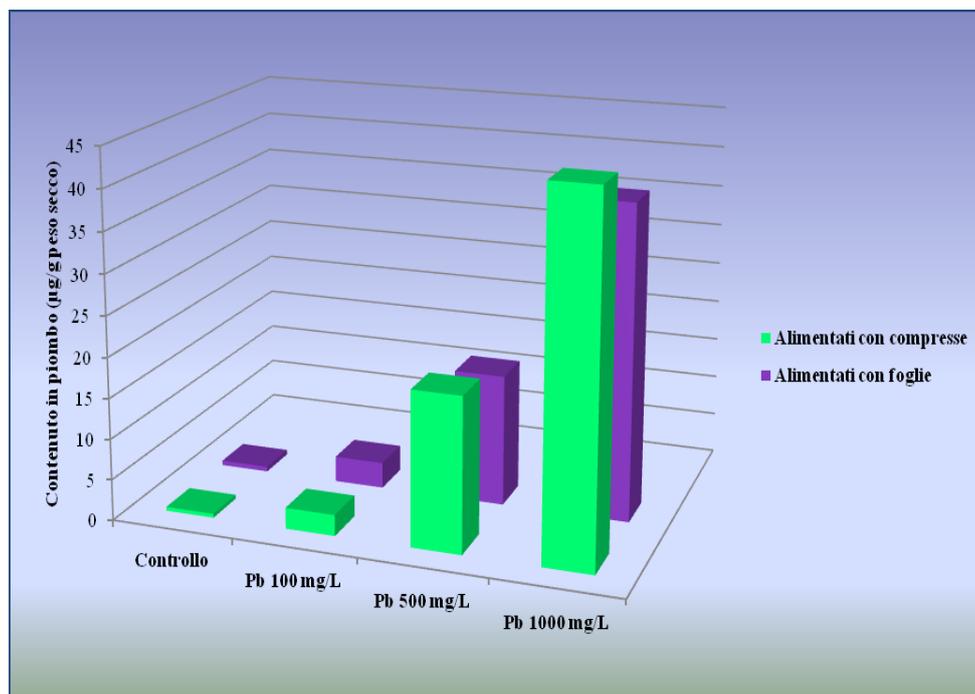
Poiché le due metodiche di somministrazione del cibo contaminato, saggiate nella fase preliminare della ricerca, hanno prodotto risultati non molto dissimili, per questa seconda fase, condotta su tre diverse specie di oniscidei, si è ritenuto opportuno ricorrere alla metodica utilizzata da Köhler et al. (1996), basata sulla somministrazione dei metalli mediante impiego di foglie di castagno imbevute con le diverse soluzioni dei sali adibite a fonte di cibo e lettiera, metodica richiedente una fase di preparazione sicuramente più rapida.

Le analisi, condotte mediante ICP-MS, hanno evidenziato un contenuto in metalli non molto dissimile da quello riscontrato nella precedente fase dell'indagine (Tab. IV a, b).

Graf. II - Contenuto in cadmio ($\mu\text{g/g}$ peso secco) negli individui di *Armadillidium granulatum* alimentati con compresse e foglie di castagno, trattate con le diverse concentrazioni del metallo.



Graf. III - Contenuto in piombo ($\mu\text{g/g}$ peso secco) negli individui di *Armadillidium granulatum* alimentati con compresse e foglie di castagno, trattate con le diverse concentrazioni del metallo.



Tab. IV a – Contenuto in cadmio ($\mu\text{g/g}$ peso secco) delle foglie di castagno e degli individui di *Armadillidium granulatum*, *Armadillidium vulgare* e *Porcellio laevis* trattati con le diverse concentrazioni del metallo.

Concentrazioni	Foglie di castagno	<i>Armadillidium granulatum</i>	<i>Armadillidium vulgare</i>	<i>Porcellio laevis</i>
Controllo	0,04	0,39	0,33	0,36
Cd 10 mg L⁻¹	9,12	19,37	17,49	39,31
Cd 50 mg L⁻¹	44,03	67,42	119,00	183,48
Cd 100 mg L⁻¹	92,24	130,94	233,07	†

Tab. IV b – Contenuto in piombo ($\mu\text{g/g}$ peso secco) delle foglie di castagno e degli individui di *Armadillidium granulatum*, *Armadillidium vulgare* e *Porcellio laevis* trattati con le diverse concentrazioni del metallo.

Concentrazioni	Foglie di castagno	<i>Armadillidium granulatum</i>	<i>Armadillidium vulgare</i>	<i>Porcellio laevis</i>
Controllo	0,78	0,29	0,21	0,16
Pb 100 mg L⁻¹	86,95	3,94	2,47	2,73
Pb 500 mg L⁻¹	465,02	18,77	16,87	9,30
Pb 1.000 mg L⁻¹	923,87	43,04	53,35	27,75

7.2.2 Contenuto in metalli negli animali trattati

Le analisi condotte mediante ICP-MS su un campione di individui, sacrificati subito dopo le tre settimane di trattamento con le concentrazioni crescenti dei due metalli saggiati, hanno messo in rilievo un progressivo accumulo dei metalli che però si è manifestato in modo ben differente dal punto di vista quantitativo sia in relazione al metallo saggiato sia, soprattutto, in relazione alla specie considerata (Tab. IV a, b).

Il contenuto in Cd degli animali trattati con le diverse concentrazioni del metallo si è rivelato, per tutte e tre le specie saggiate, ben superiore rispetto a quello delle foglie di castagno contaminate e utilizzate come cibo (Tab. IV a).

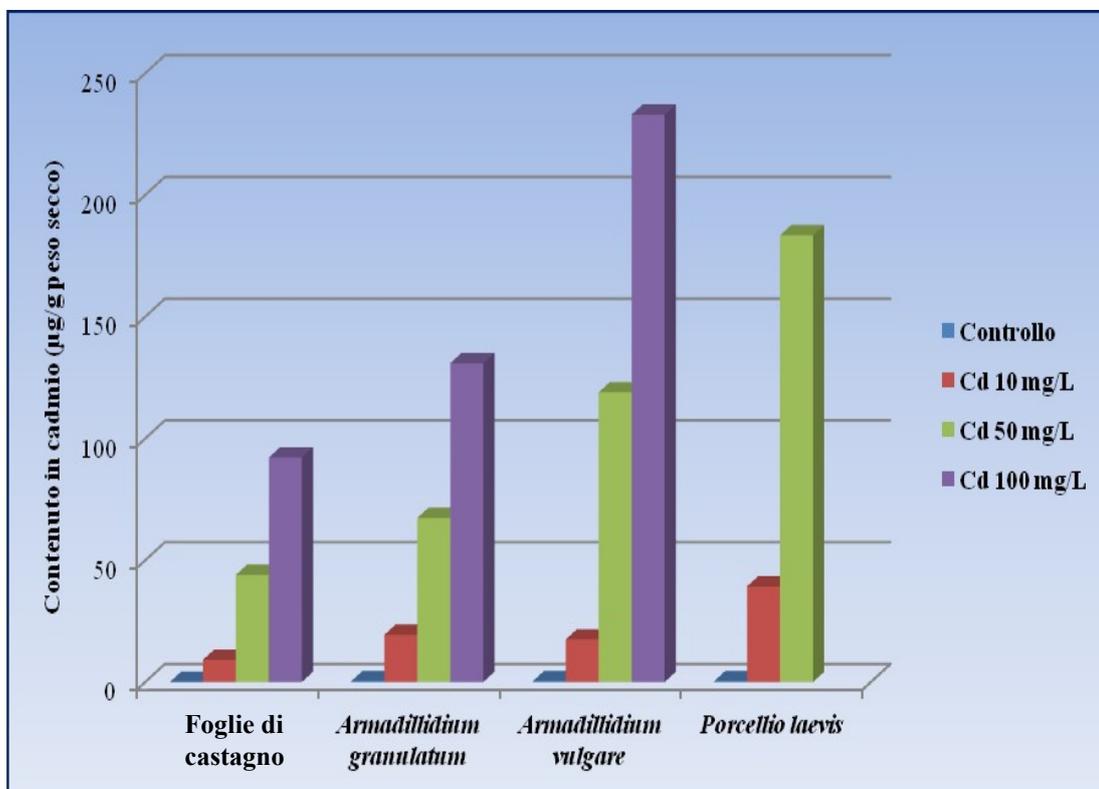
In particolare, la capacità di bioaccumulo del Cd è risultata sempre correlata con la concentrazione del metallo somministrata, ma in modo significativamente differente in relazione alla specie; livelli meno consistenti di accumulo del metallo sono stati sempre riscontrati a carico di *A. granulatum*, quelli ben più elevati a carico di *P. laevis* in cui l'accumulo conseguente al trattamento con la concentrazione Cd 100 mg L⁻¹ si è tradotto nella morte di tutti gli esemplari trattati (Tab. IV a; Graf. IV a). La capacità di accumulo del Pb si è, al contrario, rivelato sempre meno che proporzionale rispetto al contenuto del metallo nelle foglie utilizzate come cibo (Tab. IV b). A differenza di quanto riscontrato per il Cd, anche per ciò che concerne la capacità di accumulo del Pb tra le tre specie saggiate sono state rilevate differenze meno rilevanti anche se ancora significativamente apprezzabili. In particolare, *P. laevis* è risultata la specie dotata di una minore capacità di accumulo mentre *A. vulgare* si è rivelata la specie capace di accumulare più elevate quantità del metallo soprattutto in corrispondenza della massima concentrazione somministrata (Tab. IV b; Graf. IV b).

7.2.3 Indagini morfologiche, istologiche ed ultrastrutturali

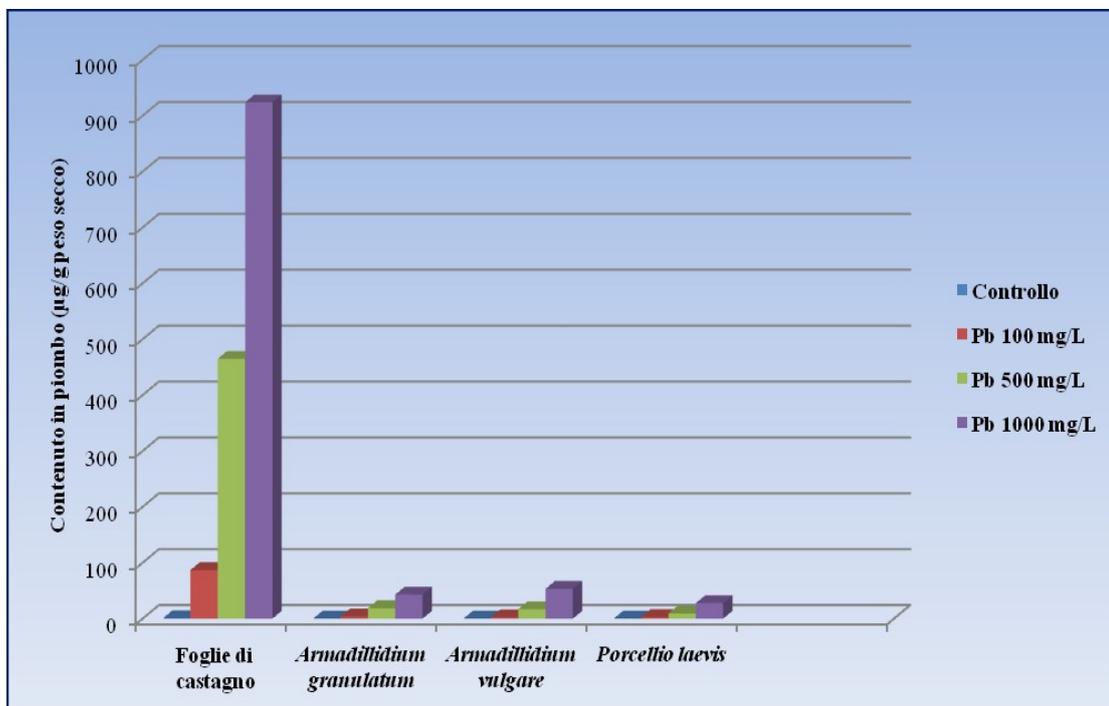
a) *L'epatopancreas negli individui non trattati*

L'epatopancreas degli individui utilizzati come controllo in tutte e tre le specie oggetto di indagine, ha riproposto a livello morfologico ed ultrastrutturale le caratteristiche già note da tempo in letteratura per altre specie di isopodi terrestri (Frenzel, 1884; McMurrich, 1898; Nusbaum-Hilarowicz, 1921; Patrick, 1926;

Graf. IV a - Contenuto in cadmio ($\mu\text{g/g}$ peso secco) delle foglie di castagno e degli individui di *Armadillidium granulatum*, *Armadillidium vulgare* e *Porcellio laevis* trattati con le diverse concentrazioni del metallo.



Graf. IV b - Contenuto in piombo ($\mu\text{g/g}$ peso secco) delle foglie di castagno e degli individui di *Armadillidium granulatum*, *Armadillidium vulgare* e *Porcellio laevis* trattati con le diverse concentrazioni del metallo.



Alikhan, 1971; Clifford e Witkus, 1971; Storch, 1982, 1984; Storch e Štruš, 1989; Wagele, 1992): esso appare, infatti, costituito da due coppie di tubuli allungati a fondo cieco (Fig. 4), avvolti a spirale con un andamento alquanto regolare (Fig. 5) e che decorrono parallelamente all'intestino per tutta la lunghezza del pereion, sino a raggiungere il pleon. I due tubuli di ciascun lato confluiscono cefalicamente in un breve dotto che sbocca sulla superficie ventrolaterale dello stomaco masticatore, al limite tra cephalon e pereion. Ogni tubulo è accompagnato per tutto il suo decorso da una nervo periferico (Fig. 6) che si collega nella regione cefalica con il sistema stomatogastrico ed il cui rivestimento si fonde in più punti con la lamina basale che riveste la superficie dei tubuli (Fig. 7). Il diametro dei tubuli appare leggermente ridotto nella regione prossimale, in vicinanza dello sbocco nello stomaco, per poi dilatarsi modestamente per quasi tutta la sua lunghezza e riassottigliarsi in corrispondenza dell'estremità distale (Fig. 8).

Dalla superficie esterna dei tubuli sporge, più o meno considerevolmente, la regione basale delle cellule che costituiscono l'epitelio della parete dell'organo (Fig. 9); sulla superficie esterna dei tubuli è presente, inoltre, una ricca trama ordinata di miociti (Fig. 10).

La struttura istologica dei tubuli è piuttosto semplice e non presenta variazioni di rilievo per quasi tutta la loro estensione, eccezion fatta per la porzione distale a fondo cieco dove è localizzata la zona germinativa; la loro parete è, infatti, costituita da un epitelio monostratificato le cui cellule poggiano su una lamina basale di spessore ridotto (Fig. 11).

Nello spessore della parete epiteliale sono presenti, in tutte e tre le specie indagate, i due citotipi noti in letteratura come cellule grandi o B e cellule piccole o S (Fig. 11).

Le cellule B hanno forma clavata o a cupola e sporgono nel lume del tubulo per la maggior parte della loro altezza. Le cellule S, che si alternano in maniera più o meno regolare con le cellule B, hanno forma subpiramidale e altezza notevolmente ridotta rispetto alle cellule B.

L'assetto dell'epitelio e, corrispondentemente, l'aspetto del lume del tubulo, variano considerevolmente in relazione al tratto considerato: nella regione prossimale l'altezza dell'epitelio, ed in particolare delle cellule B, è rilevante ed il lume appare

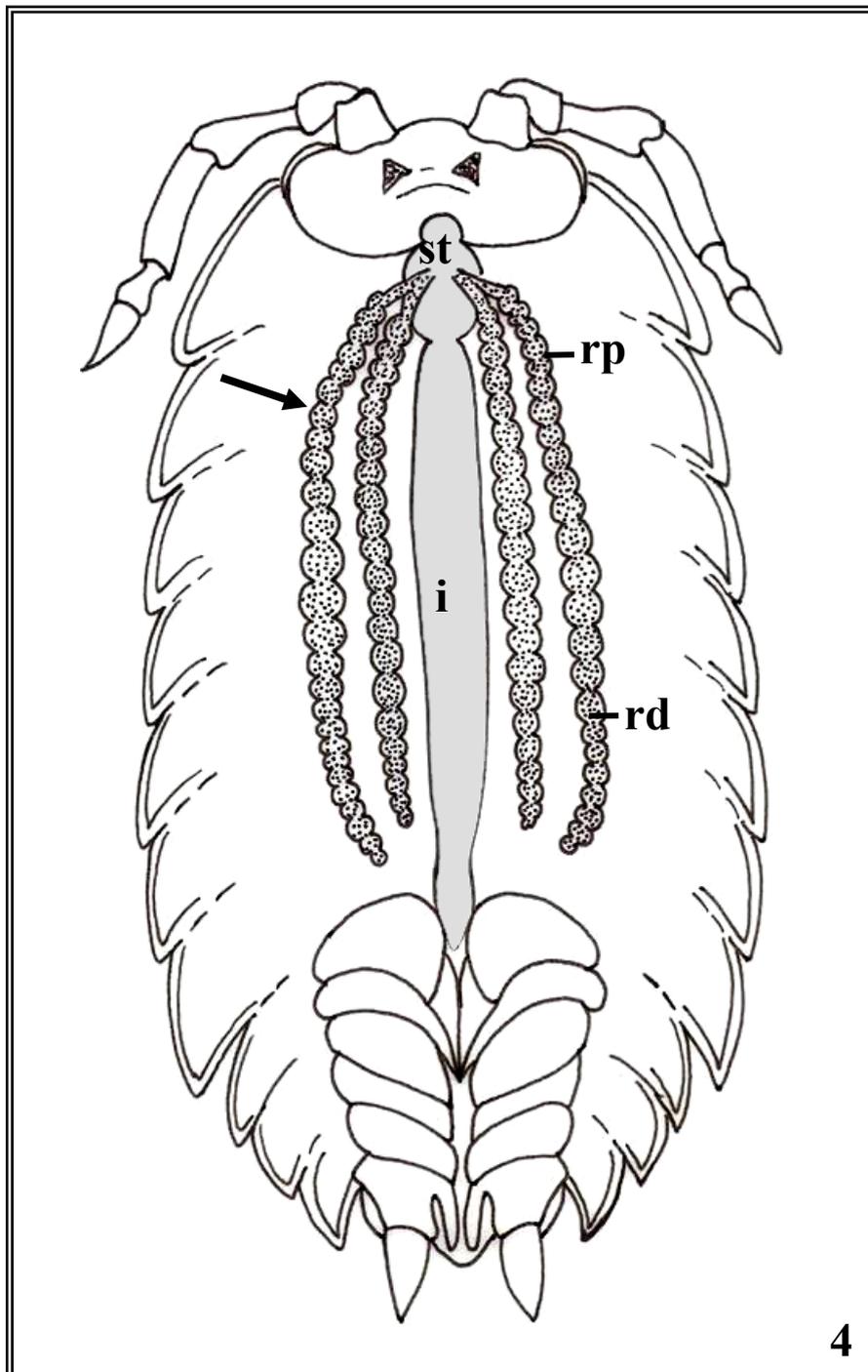
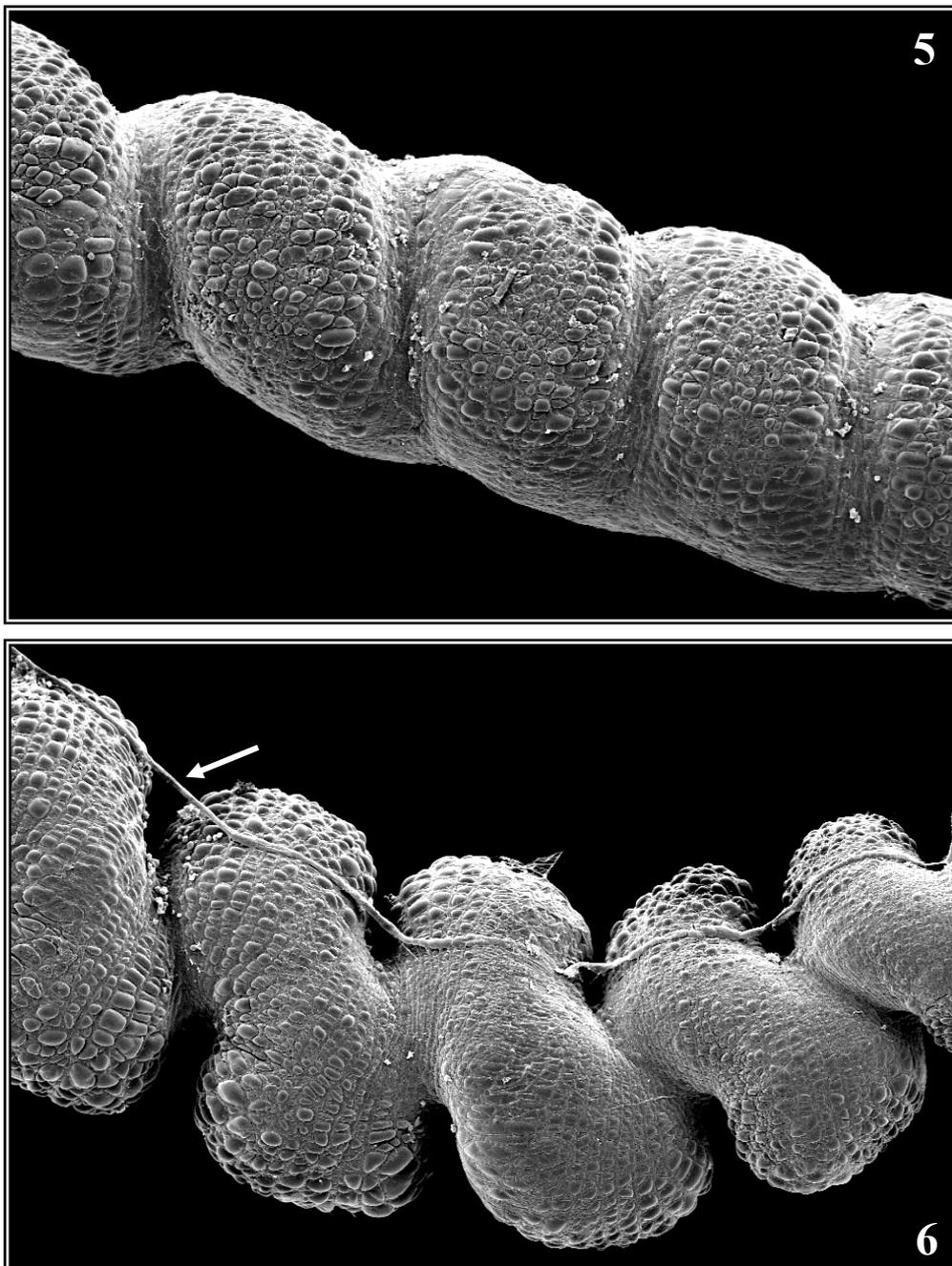
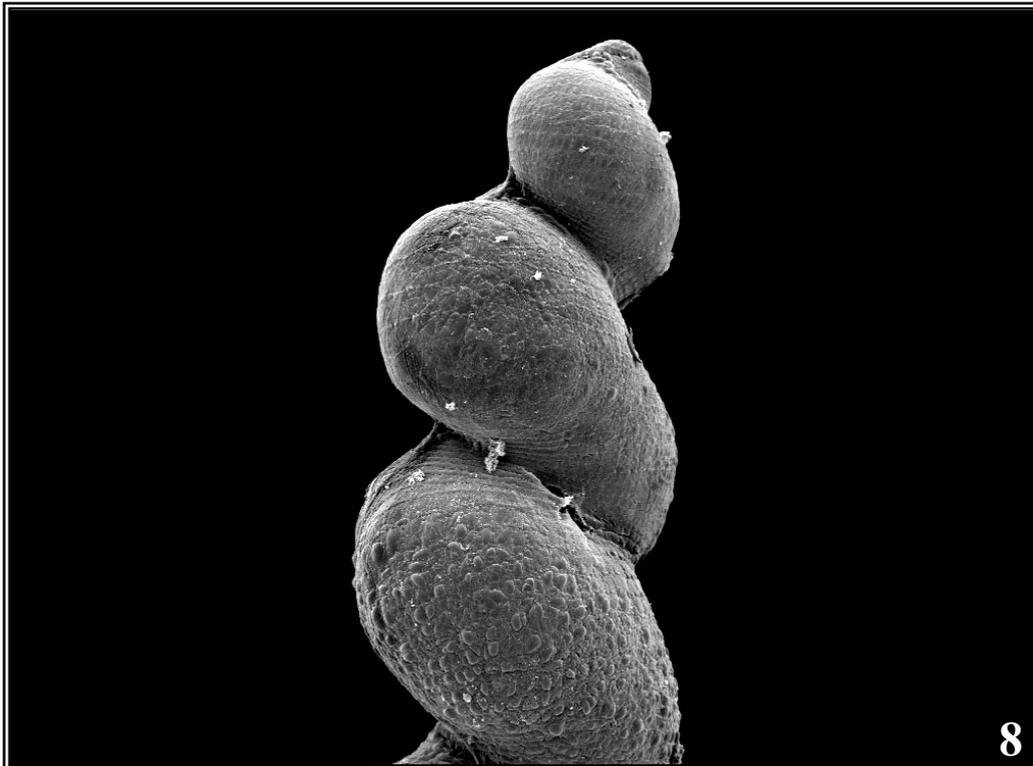
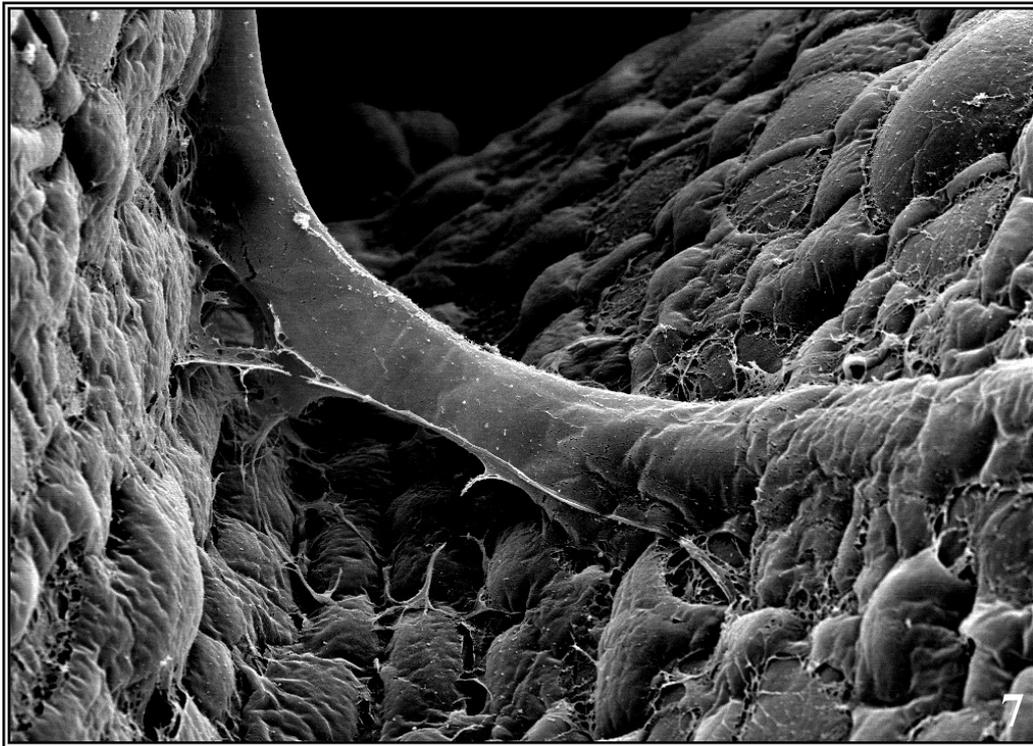


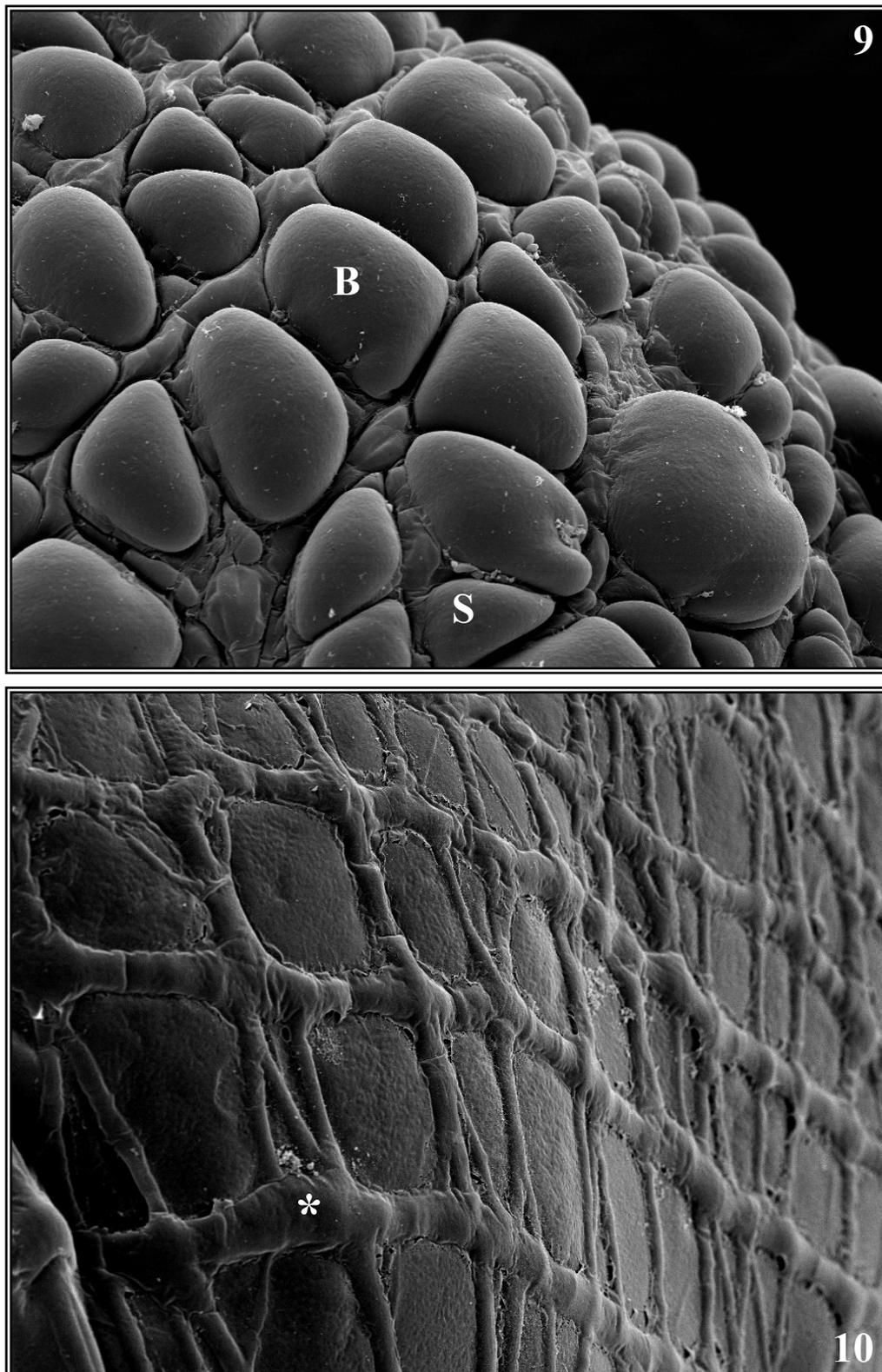
Fig. 4 - Rappresentazione schematica dell'epatopancreas (**freccia**) di un isopode oniscideo; **rp** (regione prossimale), **rd** (regione distale). I tubuli sboccano sulla superficie latero-ventrale dello stomaco masticatore (**st**), che confluisce nell'intestino (**i**).



Figg. 5-6 - Aspetto al MES dei tubuli dell'epatopancreas di individui non trattati. **5.** *Armadillidium granulatum*; (50 x). **6.** *Armadillidium vulgare*; un piccolo nervo accompagna il tubulo per quasi tutta la sua estensione (**freccia**) (100 x).



Figg. 7-8 - *Armadillidium vulgare*; epatopancreas di individui non trattati. **7.** In alcuni punti del suo decorso, il nervo si fonde con la lamina basale che riveste la superficie del tubulo (2.000 x). **8.** Regione distale di un tubulo (150 x).



Figg. 9-10 - *Armadillidium vulgare*. **9.** Dalla superficie del tubulo sporgono le porzioni basali delle cellule B ed S (1.000 x). **10.** Trama muscolare che riveste l'intera superficie del tubulo (*) (1.100 x).

ristretto e frastagliato (Fig. 12); nel tratto intermedio dove, come precedentemente accennato, il diametro dei tubuli tende ad aumentare, l'altezza dell'epitelio si riduce progressivamente ed il lume appare notevolmente dilatato (Fig. 13); nel tratto distale le caratteristiche dell'epitelio e del lume si sovrappongono a quelle della porzione prossimale.

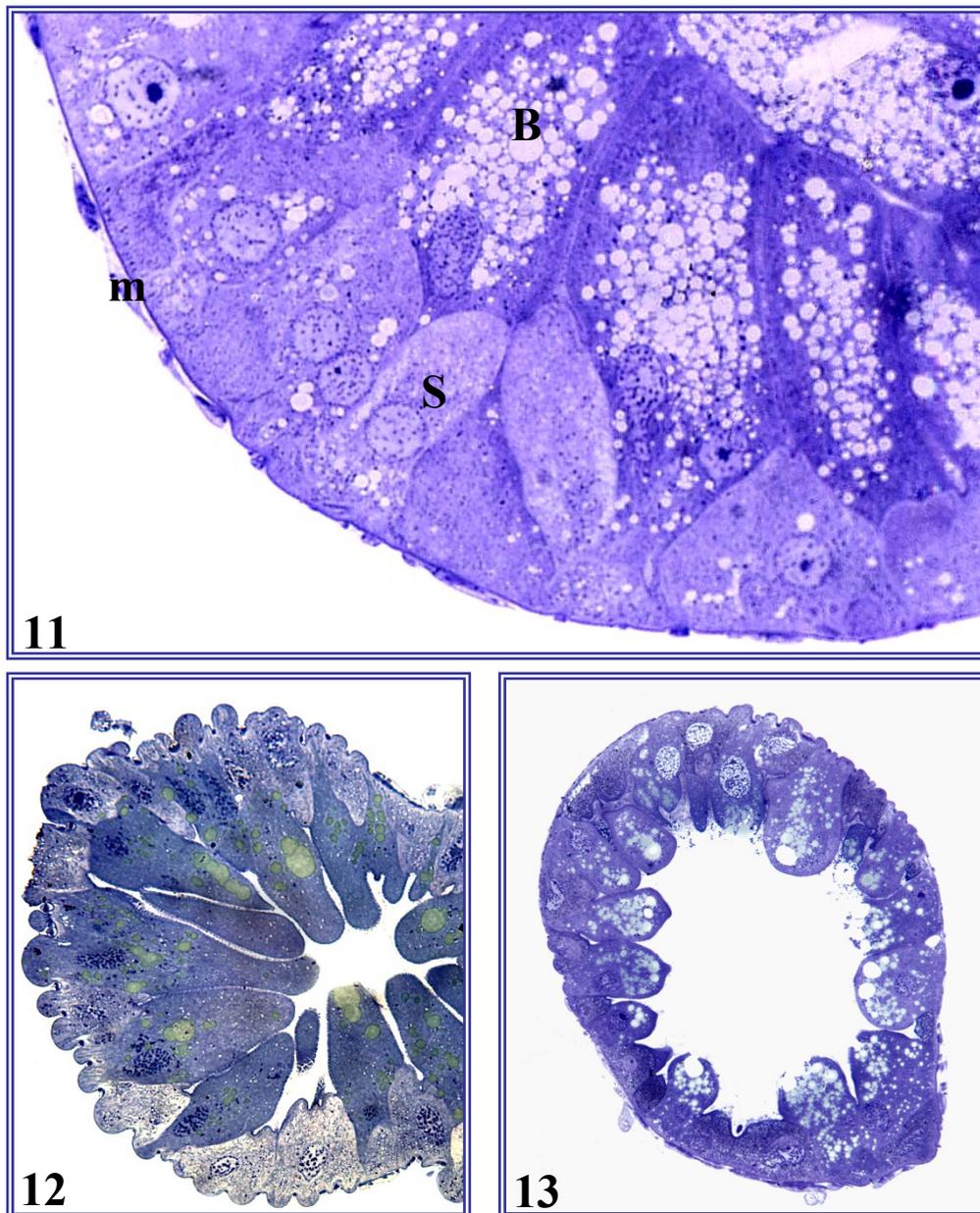
Non sono emerse, a carico di tutte e tre le specie studiate, differenze significative nell'organizzazione ultrastrutturale di entrambi i tipi cellulari e nessuna differenza apprezzabile è stata riscontrata, sempre a loro carico, nei diversi tratti, prossimale e distale, dei tubuli.

a.1 - Le cellule B

Le cellule B poggiano, in genere con una larga base di impianto, su una sottile lamina basale, spessa circa 0,4 μm , dall'aspetto finemente fibrillare (Fig. 14). La superficie a contatto con la lamina basale forma un tipico labirinto membranoso, caratterizzato da una rilevante serie di invaginazioni della membrana plasmatica (Figg. 14, 15).

Il nucleo delle cellule B è voluminoso, di forma rotondeggiante e collocato nella maggior parte delle cellule in posizione basale mentre in alcune si trova in posizione pressoché centrale. All'interno del nucleo la cromatina appare in larga parte notevolmente decondensata ed è sempre evidente un nucleolo accompagnato da una grossa zolla di eterocromatina nucleolo-associata (Fig. 16).

Nel citoplasma delle cellule B - caratterizzato da una apprezzabile densità, soprattutto nelle aree circostanti il nucleo - sono presenti numerosissimi mitocondri, di forma e dimensioni estremamente variabili e caratterizzati da una matrice di notevole densità. Molti di essi sono localizzati in sede basale, in stretto rapporto di vicinanza con le invaginazioni del plasmalemma (Fig. 17) o al di sotto dell'apice cellulare (Fig. 18). Molto sviluppato è pure il RER che appare costituito da cisterne piccole e notevolmente appiattite, per lo più disposte in vicinanza del nucleo o raggruppate in aree circoscritte alla periferia della cellula (Fig. 19), mentre sporadiche e di ridotta estensione sono le strutture di tipo golgiano (Fig. 20).



Figg. 11-13 - Sezione trasversale del tratto iniziale dei tubuli di individui non trattati. **11.** *Armadillidium granulatum*; le cellule B sono ripiene di grosse gocce lipidiche. **B**, cellule B; **S**, cellule S; **m**, cellule muscolari (sezione semifine, blu di toluidina, 500 x). **12.** *Porcellio laevis*; nella regione più apicale del tubulo il lume appare ristretto e frastagliato (sezione semifine, blu di toluidina, 200 x). **13.** *Porcellio laevis*; nella regione intermedia del tubulo il lume è, invece, molto ampio (sezione semifine, blu di toluidina, 200 x).

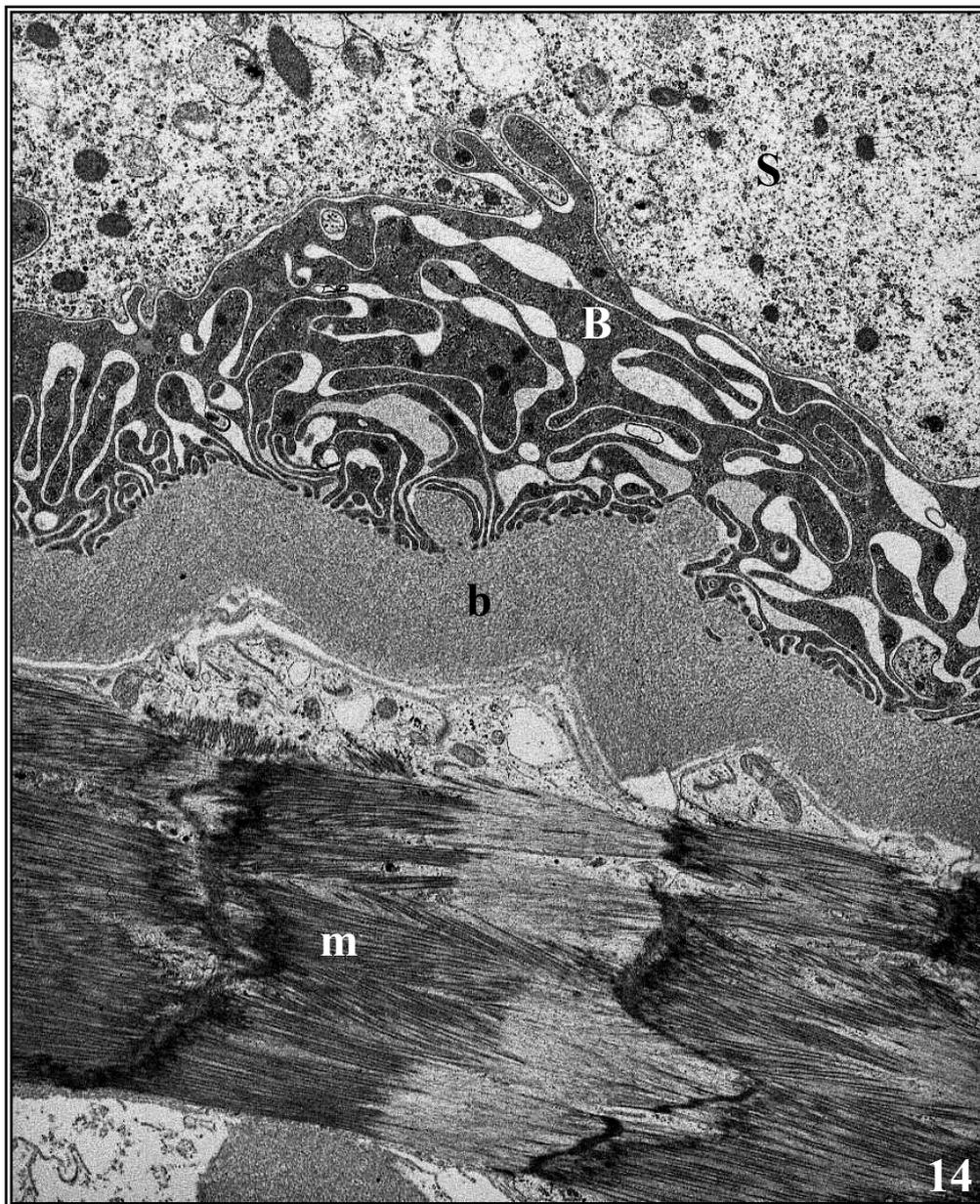
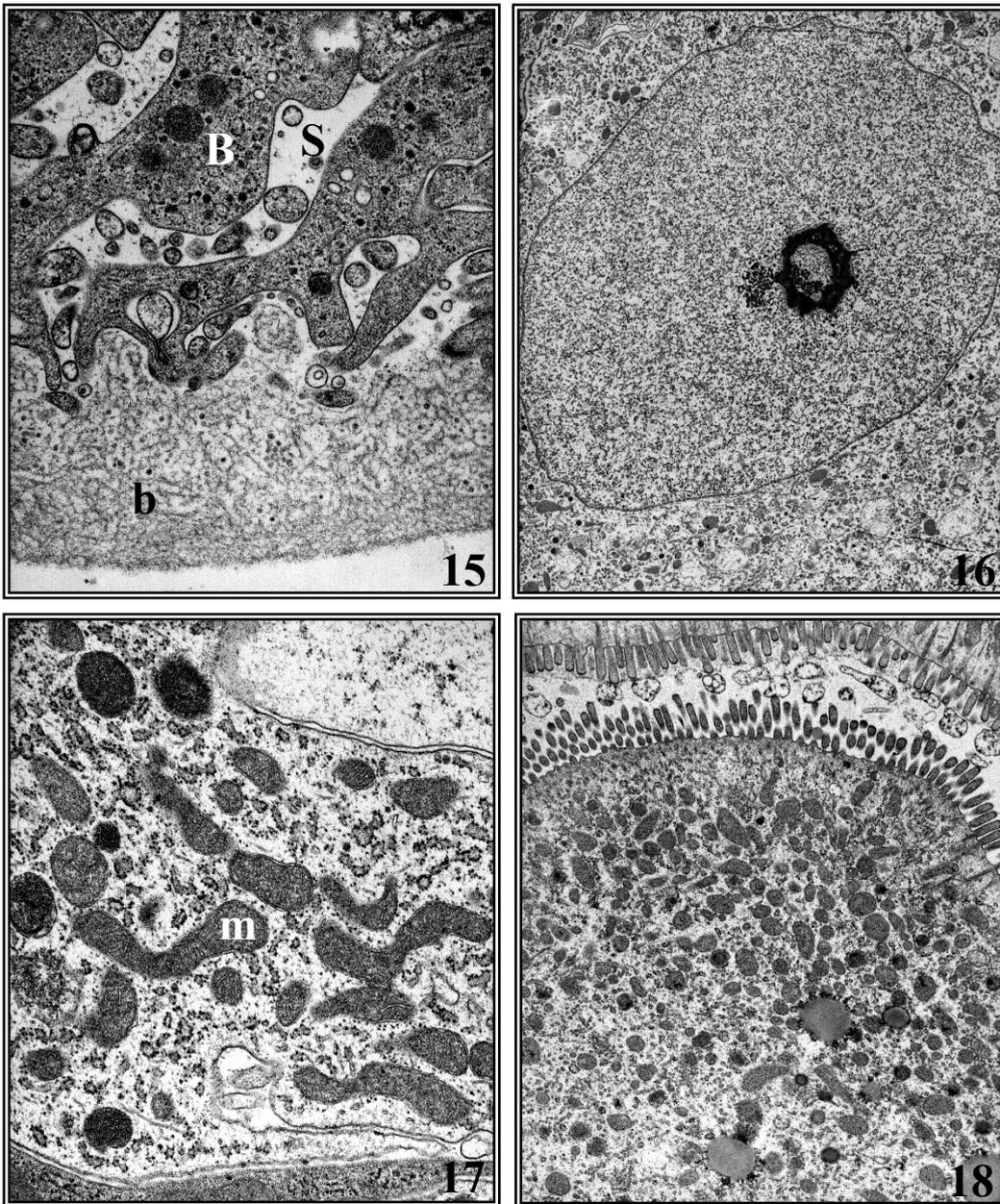
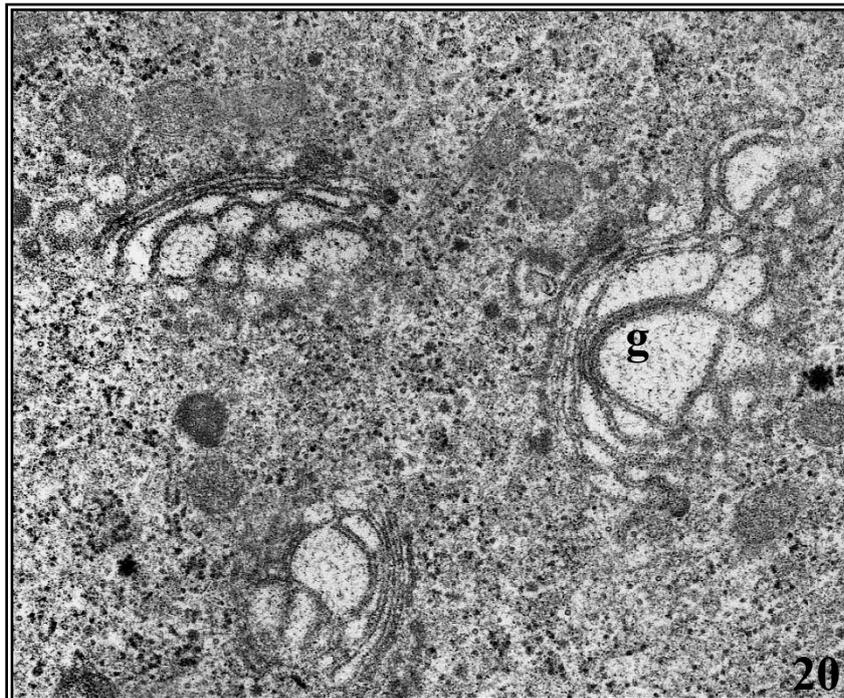
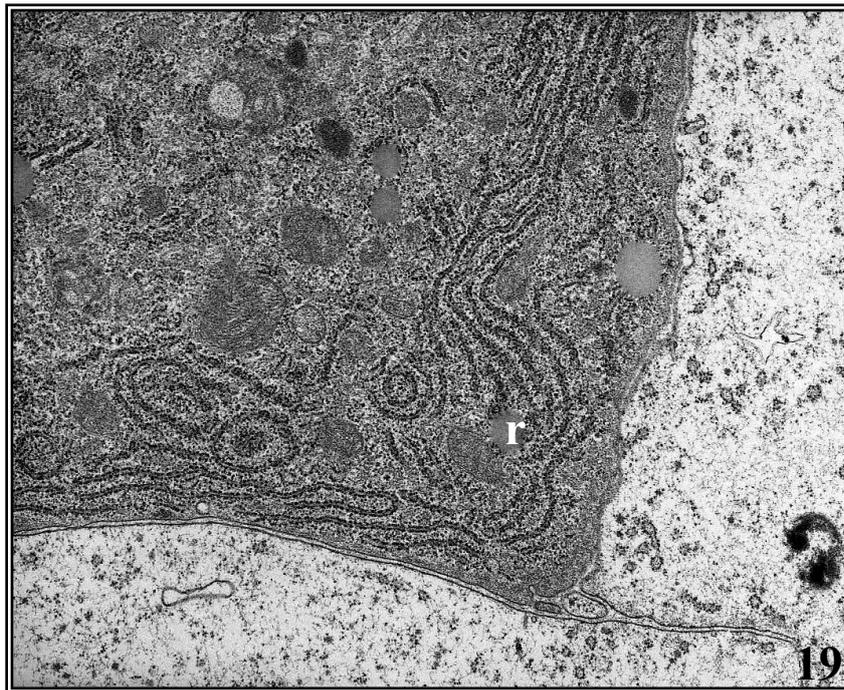


Fig. 14 - *Armadillidium granulatum*; epatopancreas di un individuo non trattato. Si osservano la lamina basale (**b**) ed il labirinto da essa formato all'interno di una cellula B (**B**) insinuata al di sotto di una cellula S (**S**); **m**, cellula muscolare (8.000 x).



Figg. 15-18 - Epatopancreas di individui non trattati. **15.** *Armadillidium vulgare*; le regioni basali delle cellule B (**B**) e delle cellule S (**S**) formano numerose invaginazioni ed interdigitazioni; **b**, lamina basale (16.000 x). **16.** *Porcellio laevis*; il nucleo contiene cromatina in larga parte decondensata e un nucleolo accompagnato da una grossa zolla di eterocromatina nucleolo-associata (3.200 x). **17.** *Armadillidium vulgare*; citoplasma della regione basale di una cellula B ricco di mitocondri (**m**) (16.000 x). **18.** *Armadillidium granulatum*; nella regione apicale della cellula sono localizzati numerosi, piccoli mitocondri (6.300 x).



Figg. 19-20 - Epatopancreas di individui non trattati. **19.** *Armadillidium granulatum*; citoplasma di cellula B in cui è presente un esteso RER costituito da cisterne appiattite (**r**) localizzate alla periferia cellulare (10.000 x). **20.** *Armadillidium granulatum*; le cellule B contengono isolate, piccole strutture golgiane (**g**) (20.000 x).

In alcune aree citoplasmatiche, per lo più localizzate nella regione centrale della cellula, si può osservare la presenza di abbondanti ribosomi liberi frammisti ad accumuli di glicogeno (Fig. 21).

La caratteristica più evidente delle cellule B è rappresentata dalla presenza di una grande quantità di gocce lipidiche, meno numerose e di ridotte dimensioni in sede basale, più abbondanti e voluminose nella regione sopranucleare così da infarcire quasi tutto il corpo cellulare (Figg. 11, 22).

Nel citoplasma delle cellule B sono, infine, presenti numerose vescicole, rotondeggianti, di varia dimensione ed a contenuto fortemente disomogeneo per aspetto e densità, quasi sicuramente riconducibili a lisosomi secondari, che si ritrovano, sparse, prevalentemente nella regione apicale della cellula (Fig. 23).

L'apice cellulare è sormontato da un fitto orletto di microvilli (Fig. 24) che, nelle zone in cui due cellule B vengono a contatto, si affrontano regolarmente con quelli della cellula adiacente. La superficie cellulare è rivestita da un glicocalice rado ma sempre evidente (Fig. 25).

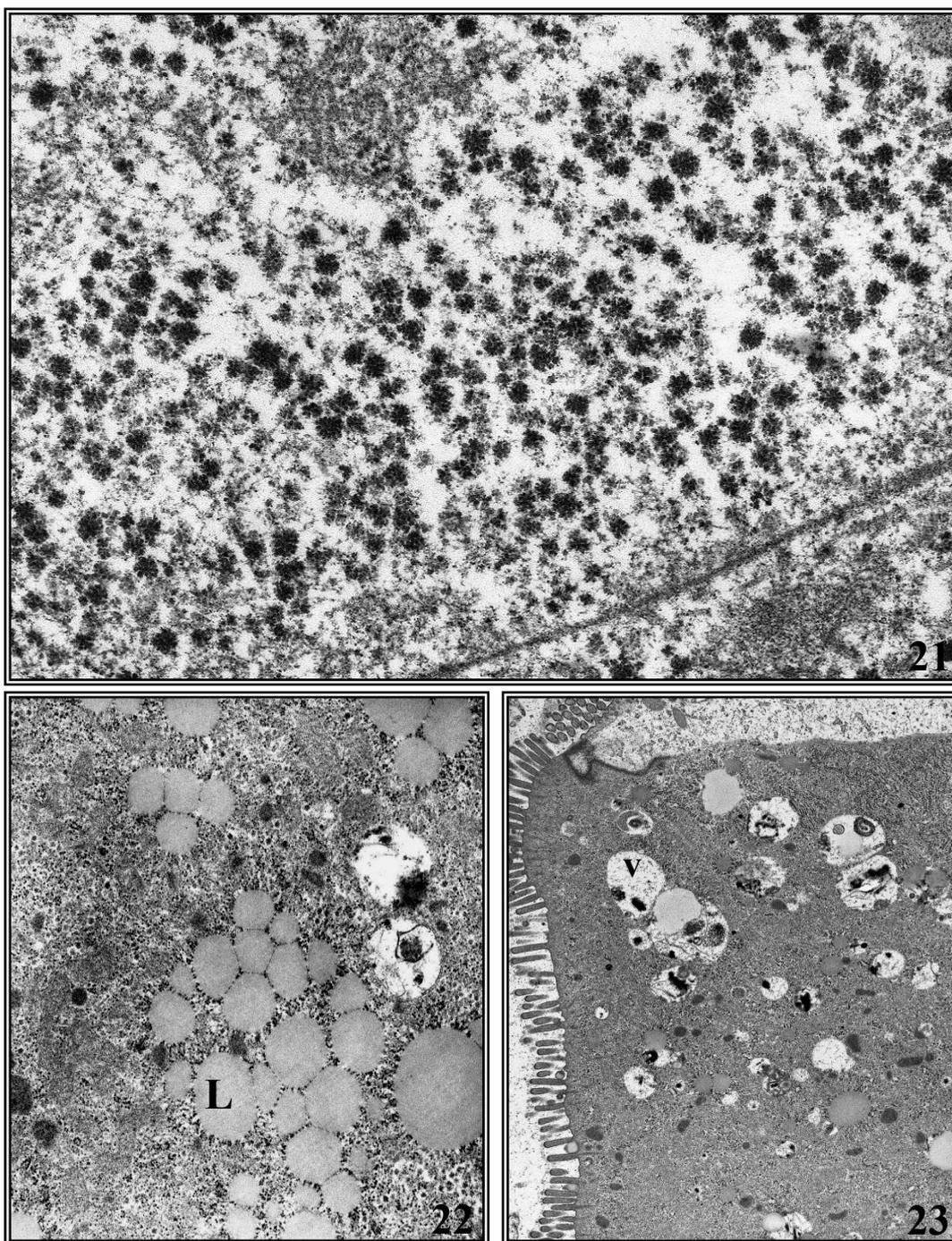
Nel lume è sempre possibile osservare la presenza di numerosi microrganismi verosimilmente identificabili come batteri (Fig. 26).

a.2 - Le cellule S

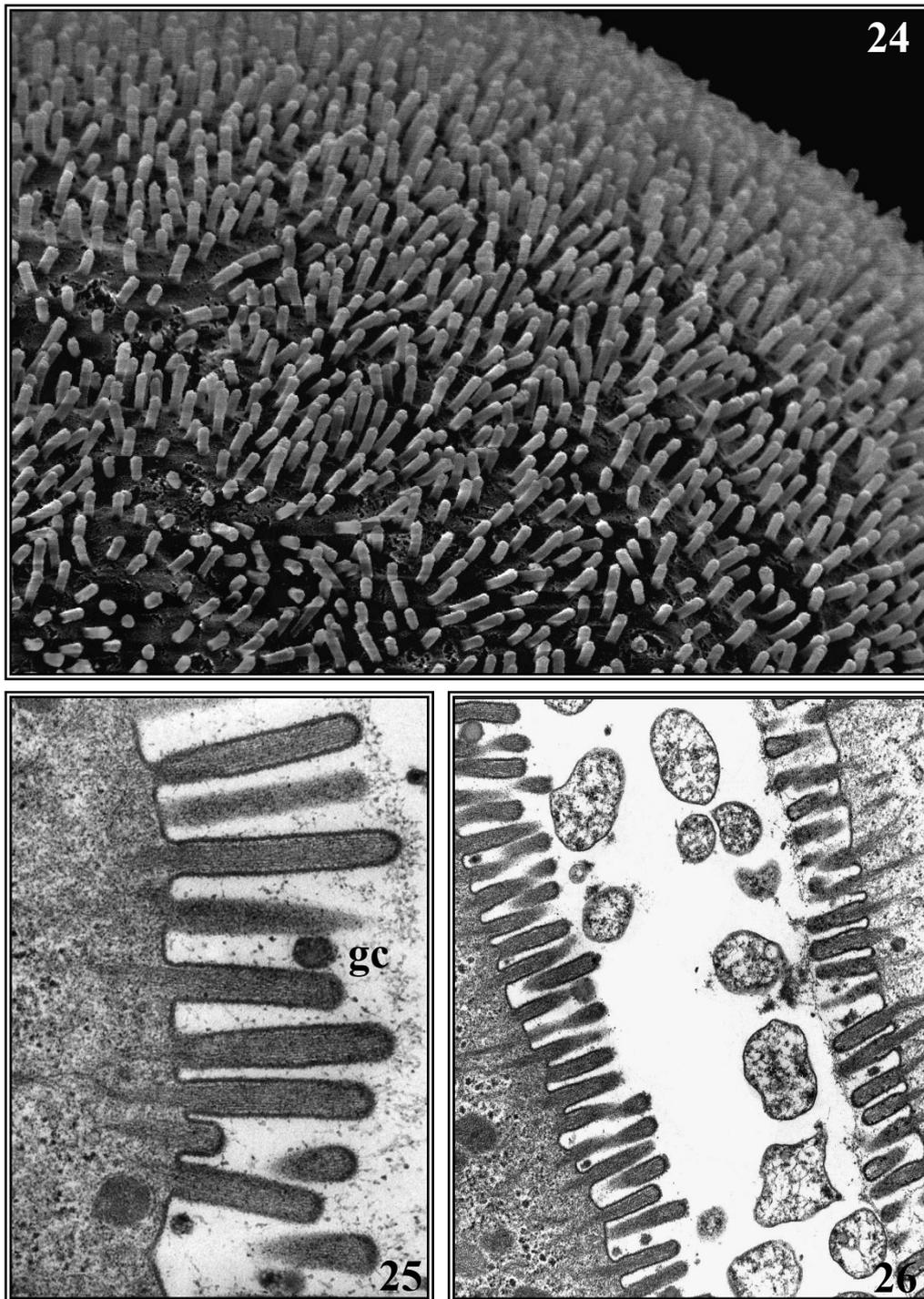
Le cellule S sono caratterizzate, oltre che dalle dimensioni più ridotte, anche da un citoplasma chiaramente meno denso di quello delle cellule B (Figg. 11, 19) ma presentano un assetto organizzativo in parte sovrapponibile a quello di queste ultime.

In sede basale, anche nelle cellule S la membrana plasmatica assume un andamento irregolare, dando luogo ad una serie di numerose invaginazioni che, spesso, formano una ricca serie di interdigitazioni con le corrispondenti invaginazioni delle cellule B (Fig. 27).

Il nucleo, sempre voluminoso e rotondeggiantissimo, è, anche in tali cellule, largamente eucromatico e collocato in sede basale (Fig. 11); numerosi sono, anche nelle cellule S, i mitocondri, sparsi in tutto il corpo cellulare e particolarmente localizzati nella regione basale (Fig. 28) mentre poco è il RER che è presente sotto forma di piccole e isolate strutture di forma prevalentemente tubulare (Fig. 29).



Figg. 21-23 - Epatopancreas di individui non trattati. **21.** *Porcellio laevis*; nel citoplasma delle cellule B sono presenti numerosi ribosomi liberi ed accumuli di glicogeno (20.000 x). **22.** *Armadillidium granulatum*; numerosi aggregati di gocce lipidiche (L) nel citoplasma delle cellule B (13.000 x). **23.** *Armadillidium granulatum*; vescicole dal contenuto eterogeneo (v) sono localizzate prevalentemente in prossimità dell'apice cellulare delle cellule B (10.000 x).



Figg. 24-26 - Epatopancreas di individui non trattati. **24.** *Armadillidium granulatum*; aspetto al MES del fitto orletto microvillare di una cellula B (9.000 x). **25.** *Armadillidium vulgare*; sulla superficie di una cellula B, rivestita da un fitto orletto di microvilli, è evidente la presenza del glicocalice (**gc**) (60.000 x). **26.** *Armadillidium granulatum*; nel lume del tubulo sono presenti numerosi batteri (8.000 x).

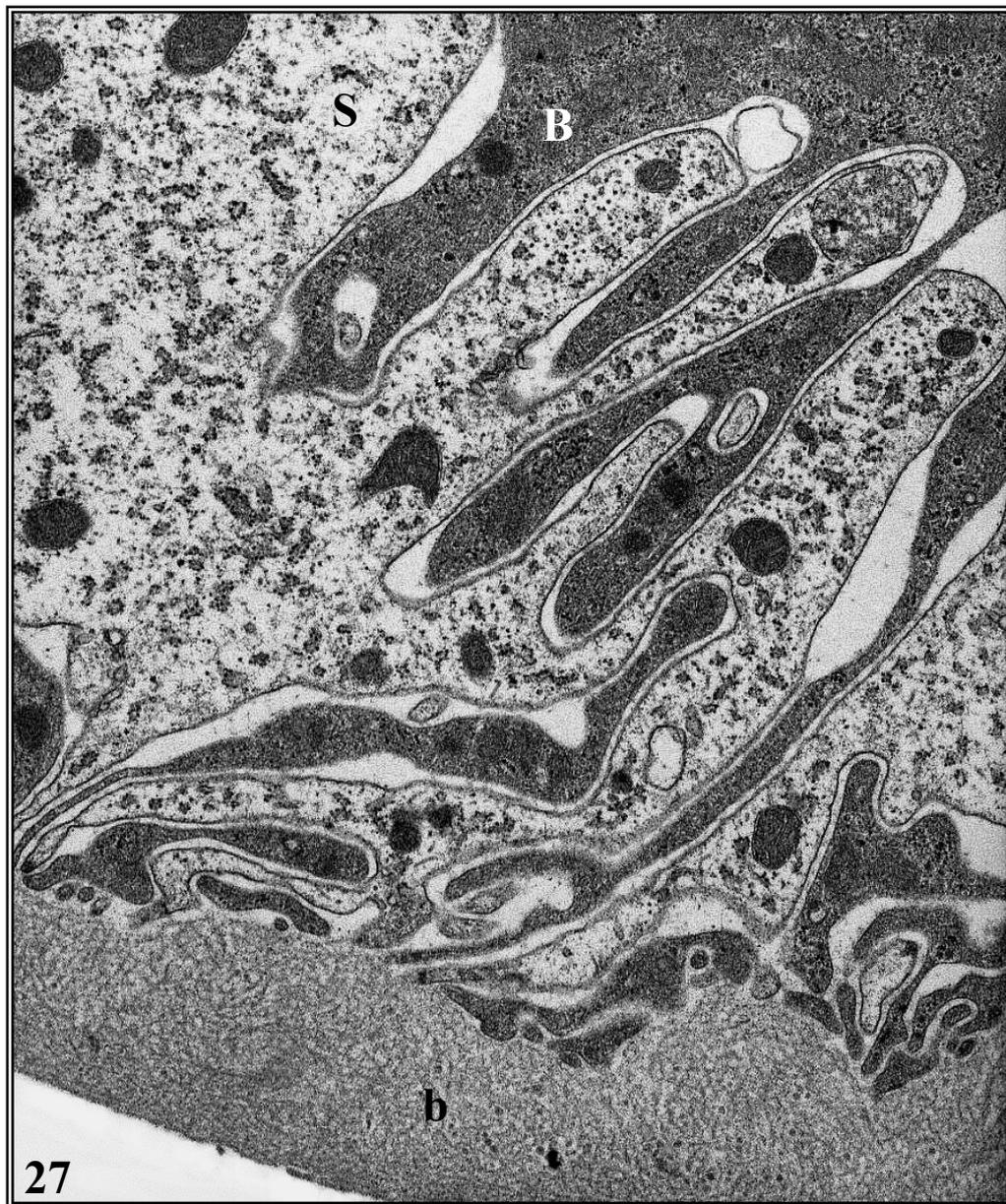


Fig. 27 - Epatopancreas di individuo non trattato. *Armadillidium vulgare*; regione basale di cellula S (S) formante ricche interdigitazioni con una cellula B (B); b, lamina basale (10.000 x).

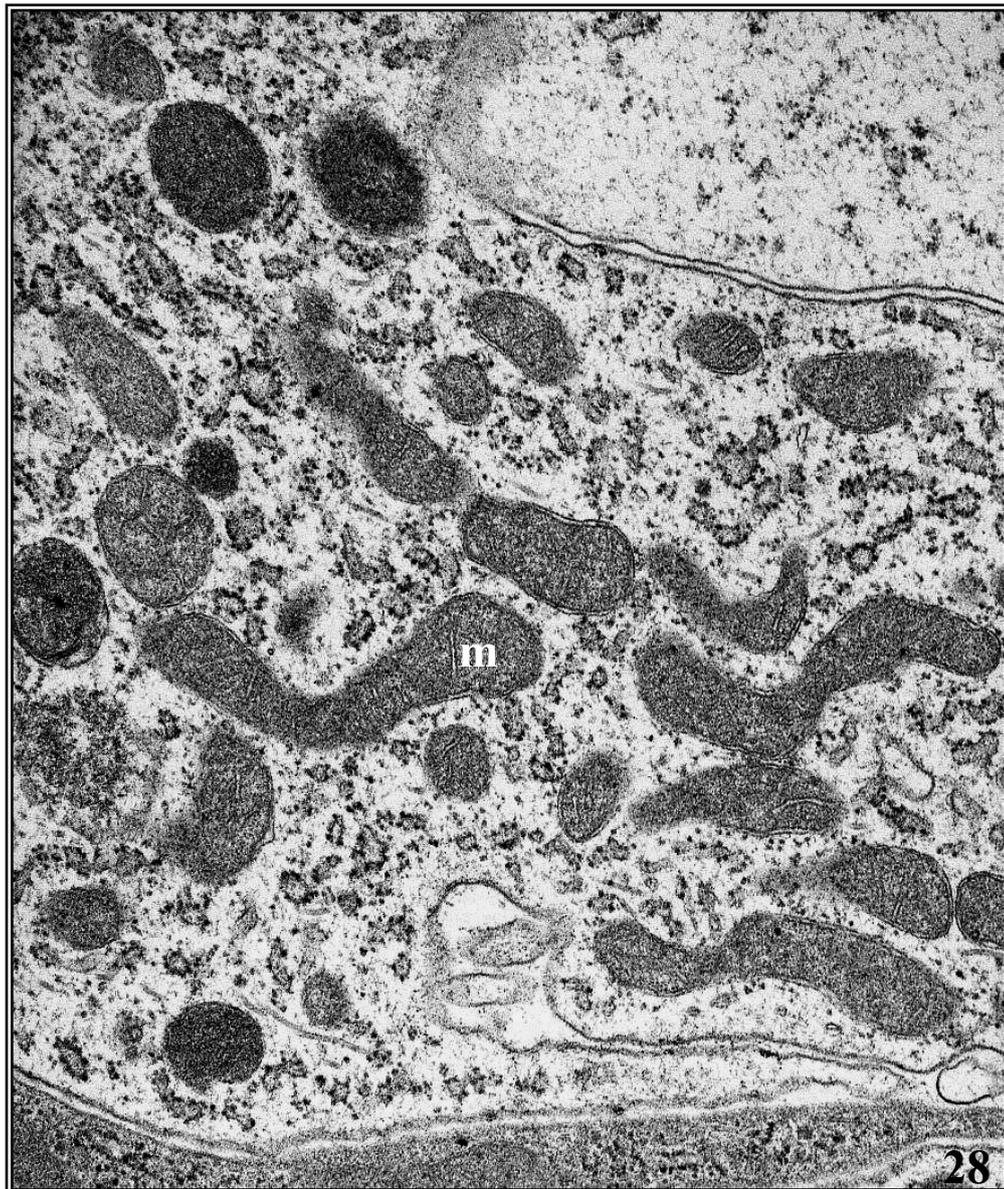


Fig. 28 - Epatopancreas di individuo non trattato. *Armadillidium granulatum*; citoplasma della regione basale di una cellula B ricco di mitocondri (**m**) (16.000 x).

Le inclusioni lipidiche sono del tutto sporadiche, mentre è rilevante la presenza di numerose vescicole, molte delle quali dall'aspetto particolare; esse presentano, infatti, al di sotto della loro membrana un anello di materiale denso ed eterogeneo che circonda una cavità centrale, delimitata da un'ulteriore membrana, all'interno della quale è presente un materiale debolmente flocculento (Fig. 30). Tali vescicole sono, probabilmente, coinvolte nei meccanismi di sequestro ed accumulo dei metalli. Sparsi, in sede basale, sono presenti alcuni granuli a contenuto fortemente elettrondenso (Fig. 31).

La superficie laterale delle cellule S si addossa per lungo tratto a quella delle cellule B contigue, per cui soltanto una esigua porzione distale del loro corpo si affaccia sul lume del tubulo (Fig. 32).

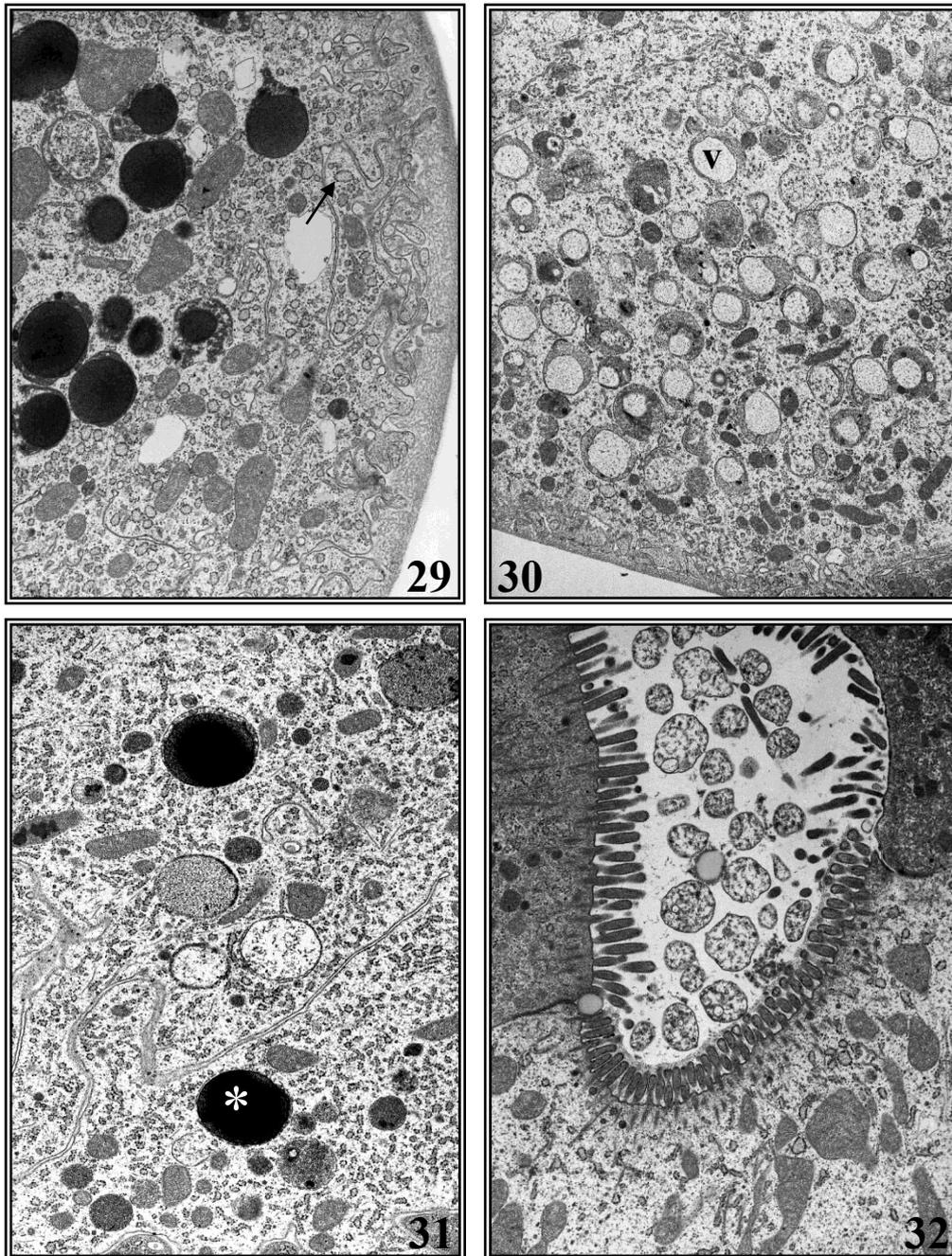
b) *L'epatopancreas negli individui esposti al cadmio*

Negli individui di tutte e tre le specie l'esposizione alle diverse concentrazioni del sale di cadmio si è tradotta in alterazioni a carico e della generale morfologia dei tubuli epatopancreatici e della loro organizzazione istologica ed ultrastrutturale.

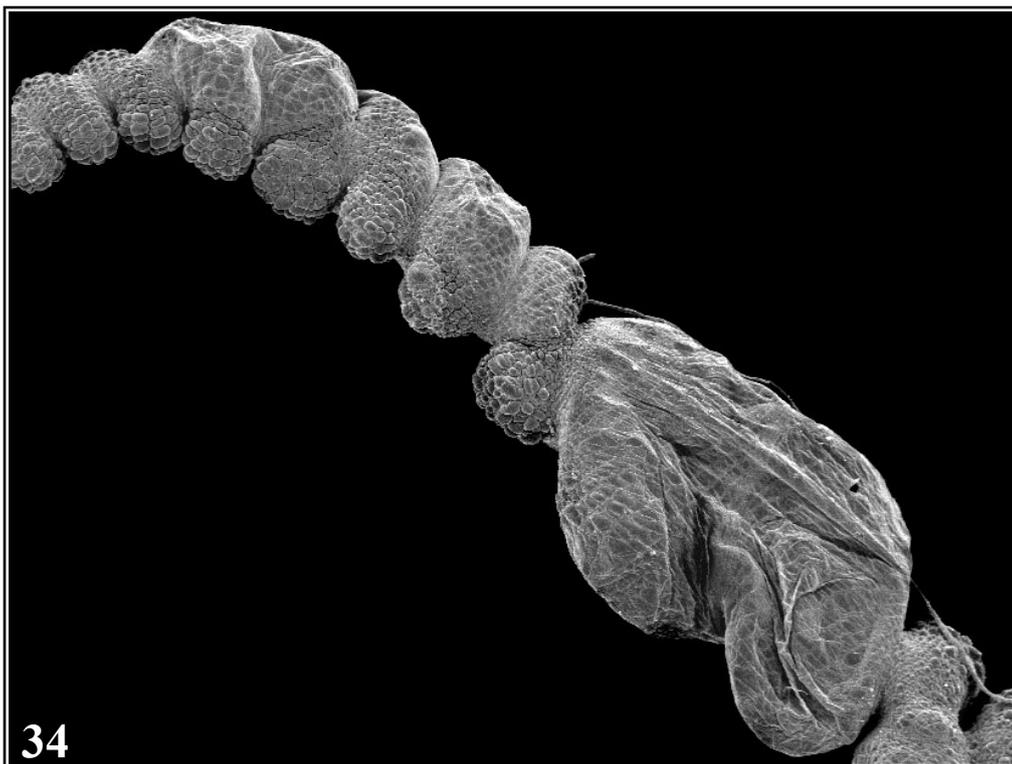
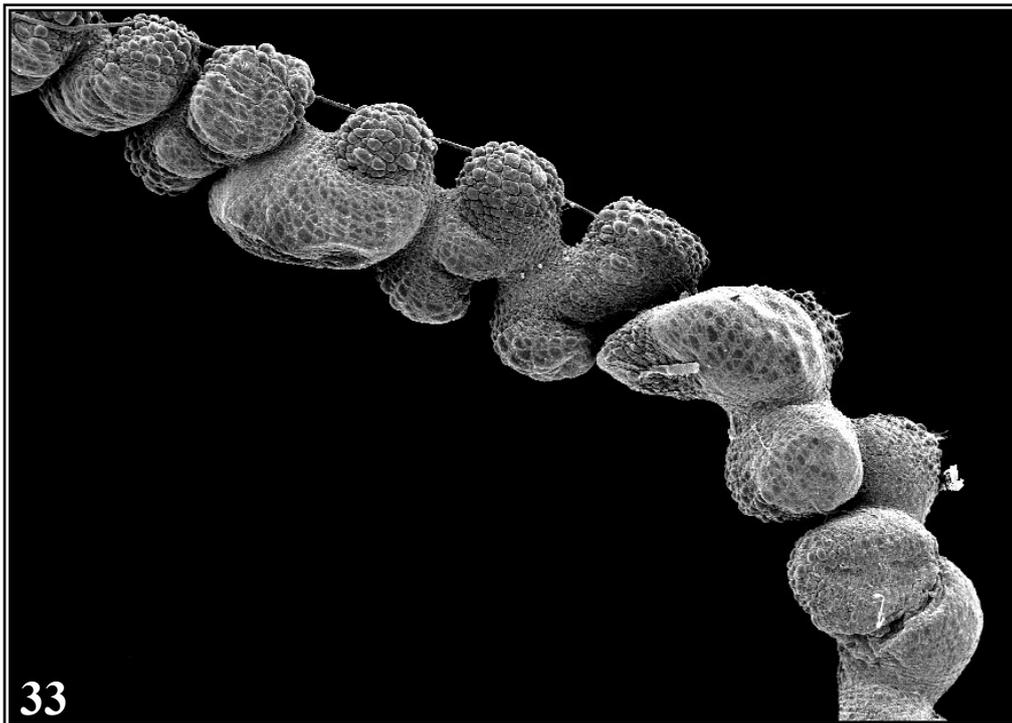
Alla concentrazione più bassa utilizzata per la contaminazione del cibo - Cd 10 mg L⁻¹ - tali alterazioni non sono risultate sempre apprezzabili a livello morfologico ma soltanto a livello ultrastrutturale, mentre alle concentrazioni più elevate - Cd 50 mg L⁻¹ e Cd 100 mg L⁻¹ - gli effetti si sono manifestati in maniera evidente anche a carico della generale morfologia dei tubuli. In particolare, essi si sono tradotti in una profonda modificazione dell'andamento della spire dei tubuli (Figg. 33, 34) nella profonda deformazione morfologica di alcuni tratti degli stessi (Fig. 35), con formazione di evidenti rigonfiamenti della loro superficie (Fig. 36), e in una pronunciata protrusione della regione basale delle cellule alla superficie esterna dell'organo (Fig. 37).

Le alterazioni morfologiche appaiono evidenti anche a livello istologico, sotto forma di un'apprezzabile modificazione del profilo dei tubuli in sezione trasversale (Figg. 38, 39).

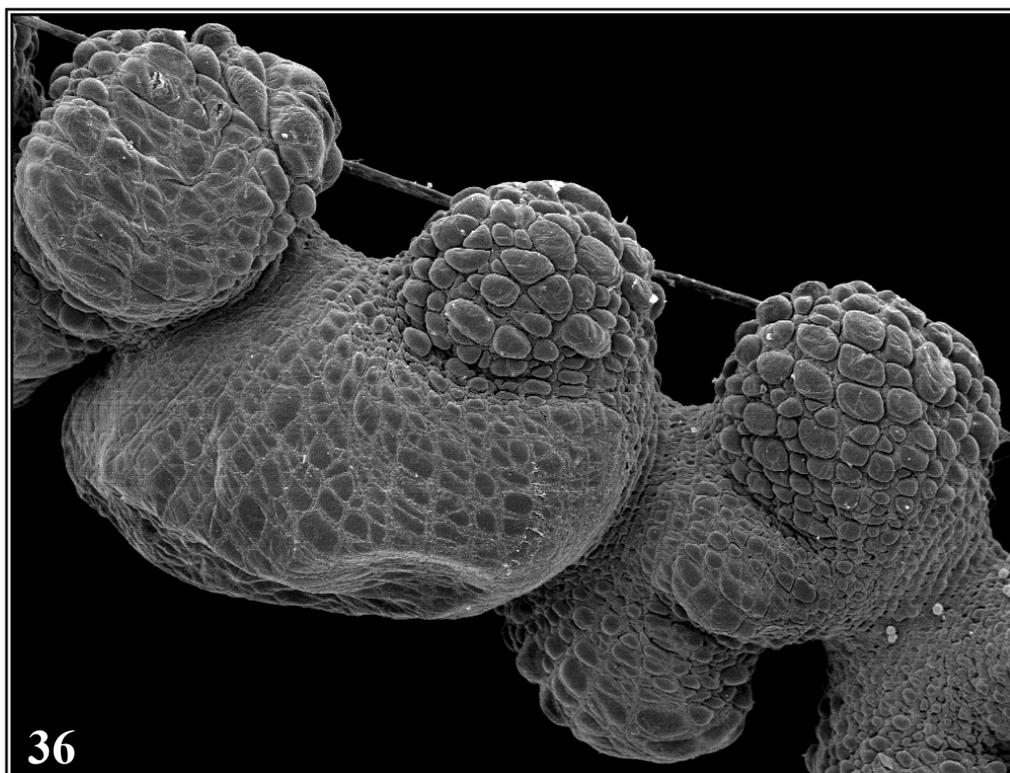
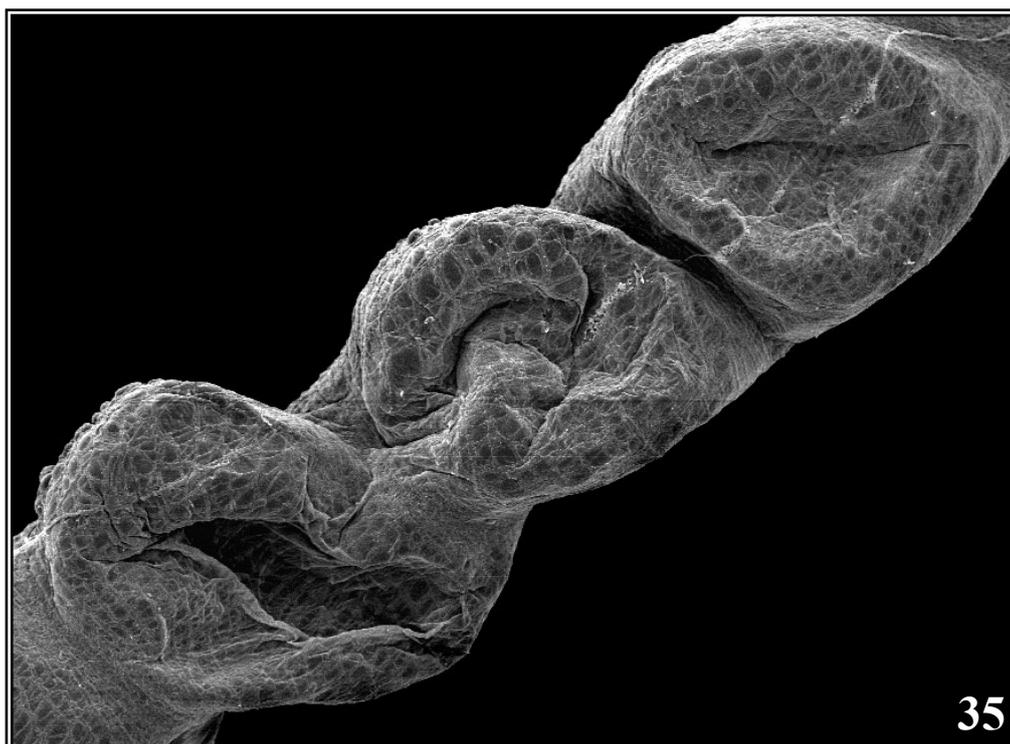
Sempre a livello istologico si evidenzia un progressivo aumento della presenza di granulazioni dense localizzate prevalentemente nella regione basale delle cellule S



Figg. 29-32 - Epatopancreas di individui non trattati. **29.** *Armadillidium granulatum*; citoplasma di cellula S con RER presente sotto forma di piccole e isolate strutture di forma tubulare (**freccia**) (8.000 x). **30.** *Armadillidium granulatum*; vescicole (v) con contenuto debolmente flocculento presenti in cellule S (6.300 x). **31.** *Armadillidium vulgare*; granuli dal contenuto fortemente elettrondenso (*), sparsi in sede basale nelle cellule S (8.000 x). **32.** Superficie apicale di cellule B ed S (8.000 x).



Figg. 33-34 - Aspetto al MES di un tubulo dell'epatopancreas di individui trattatati con sali di cadmio. Sia la generale morfologia del tubulo sia l'andamento delle spire appaiono notevolmente alterati. **33.** *Armadillidium granulatum*; Cd 100 mg L⁻¹ (50 x). **34.** *Porcellio laevis*; Cd 50 mg L⁻¹ (50 x).



Figg. 35-36 - Aspetti particolari delle alterazioni morfologiche dei tubuli epatopancreatici indotte dal trattamento con le più elevate concentrazioni di cadmio. **35.** *Armadillidium granulatum*; Cd 100 mg L⁻¹ (100 x). **36.** *Armadillidium vulgare*; Cd 100 mg L⁻¹ (150 x).

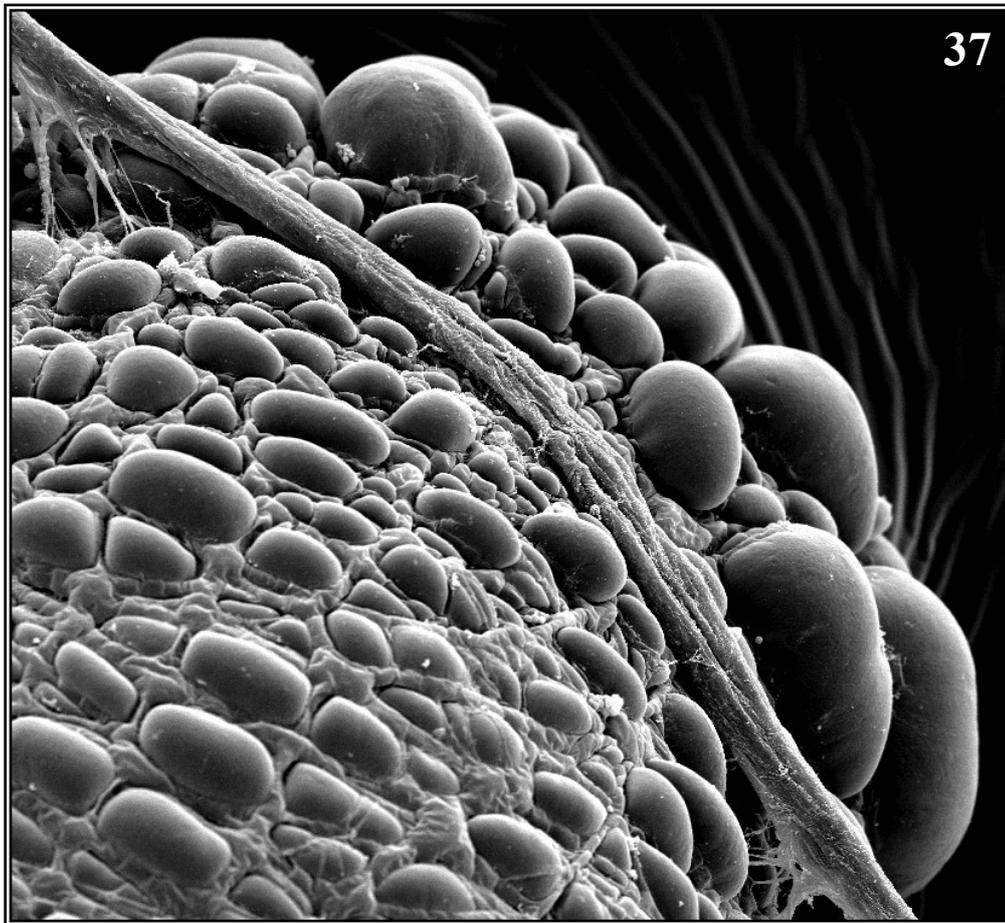
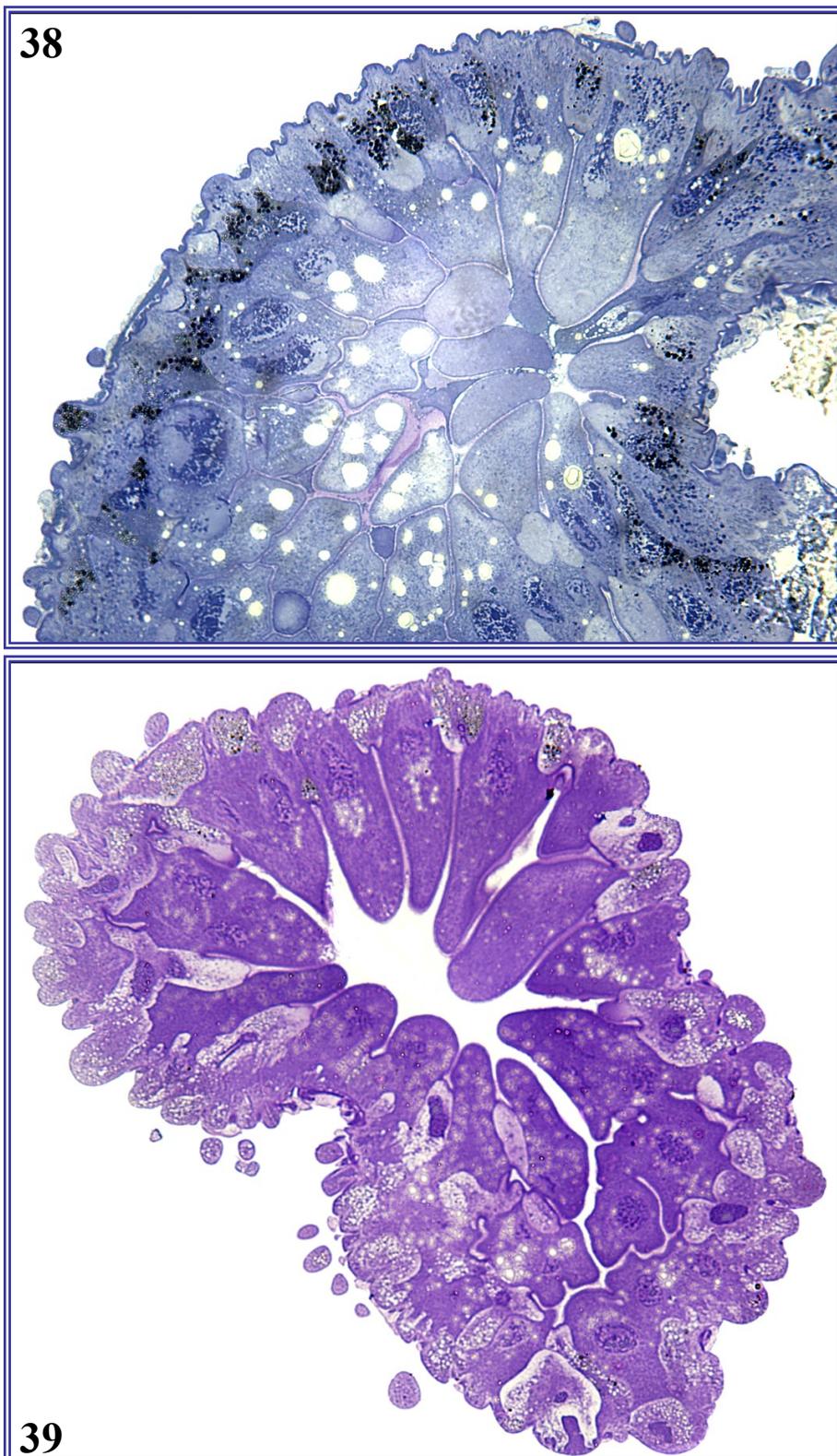


Fig. 37 - *Armadillidium granulatum*. Aspetto particolare delle alterazioni morfologiche dei tubuli epatopancreatici indotte dal trattamento con la più elevata concentrazione - Cd 100 mg L⁻¹. Pronunciata protrusione della regione basale delle cellule B ed S, sulla superficie esterna del tubulo (600 x).



Figg. 38-39 - Sezioni trasversali di tubuli dell'epatopancreas di individui trattati con sali di cadmio. Appare evidente la loro notevole alterazione morfologica **38**. *Armadillidium granulatum*; Cd 100 mg L⁻¹, (blu di toluidina, 400 x). **39**. *Armadillidium vulgare*; Cd 100 mg L⁻¹, (violetto di genziana, 400 x).

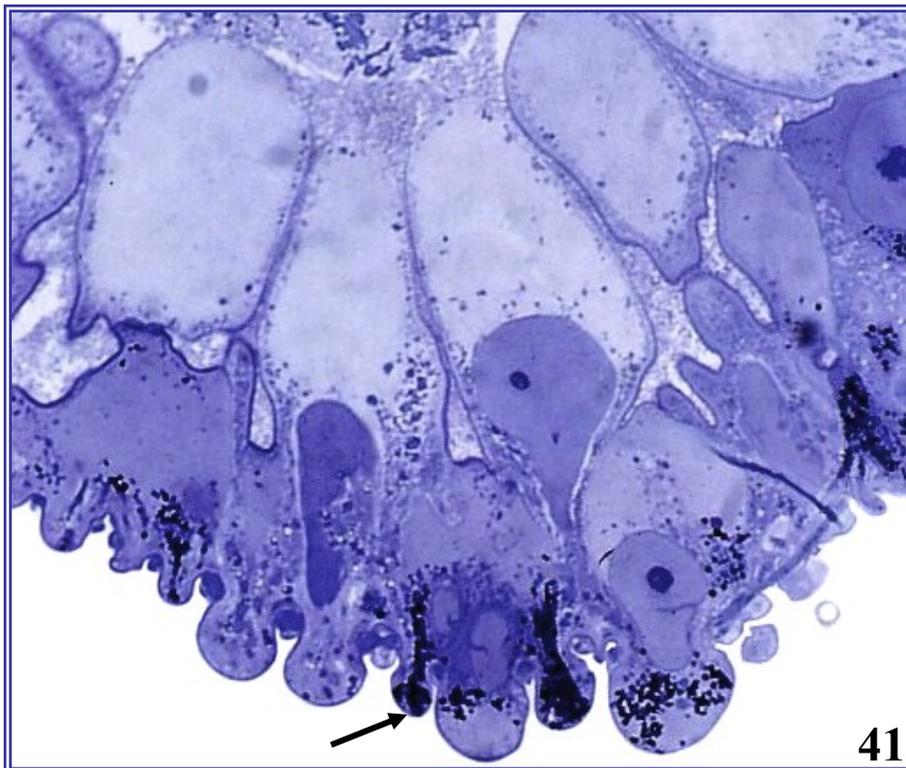
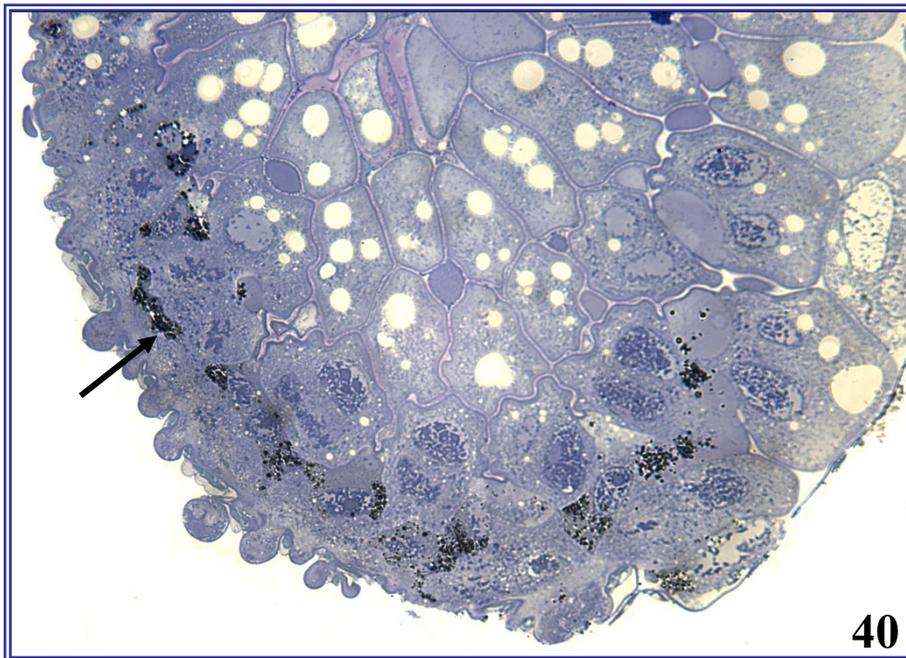
(Figg. 40, 41, 42) che, in alcuni tratti dei tubuli, appaiono anche ricche di aree vacuolizzate (Fig. 43).

Le alterazioni a livello cellulare sono risultate ben più drammatiche negli individui di *P. laevis* e già in seguito al trattamento con la dose più bassa del sale si è evidenziato un quadro di parziale disorganizzazione a carico di entrambi i tipi cellulari, sotto forma di una apprezzabile vescicolazione del citoplasma e nelle cellule B anche della tendenza alla coagulazione di ampie porzioni dello stesso in sede apicale che appare del tutto priva di organuli cellulari (Fig. 44). Negli individui trattati con la dose Cd 50 mg L⁻¹ è stata osservata un'abnorme presenza di granuli di accumulo del metallo nelle cellule S, tale da tradursi, in numerosi casi, nella totale disorganizzazione della cellula con fuoriuscita nel lume del suo contenuto (Fig. 45).

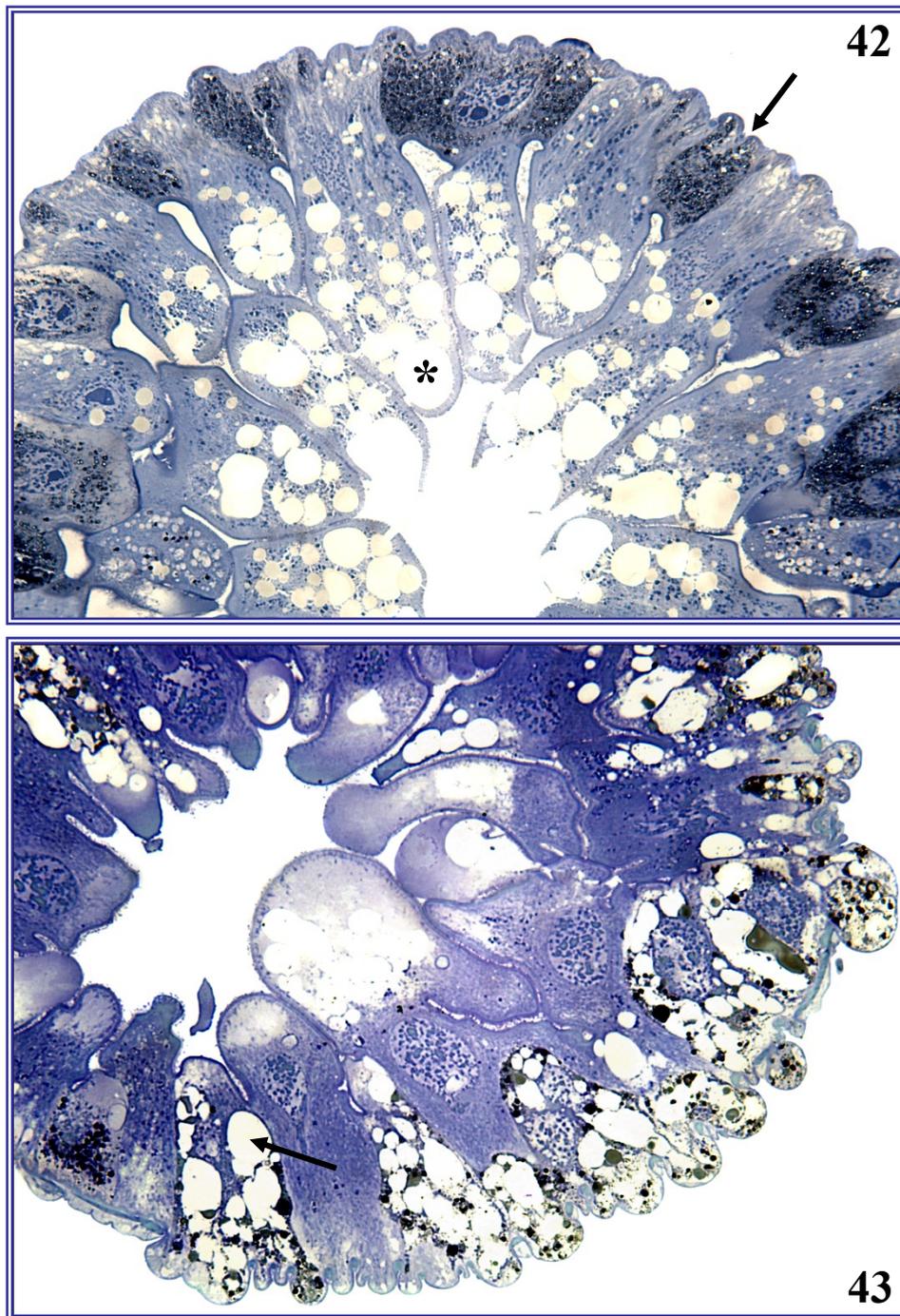
A livello ultrastrutturale, le alterazioni conseguenti al trattamento con le diverse concentrazioni di Cd, si sono manifestate in modo pressoché equivalente lungo tutto il decorso dei tubuli ma non hanno coinvolto nella stessa misura tutte le cellule; infatti, alcune di esse, anche negli individui trattati con le concentrazioni più elevate del metallo, non hanno mai evidenziato variazioni di rilievo rispetto a quelle degli individui controllo, mentre la maggior parte delle cellule è andata invece incontro a modificazioni della propria organizzazione ultrastrutturale quasi sempre ben correlate con la concentrazione del metallo impiegata. Le alterazioni sono risultate del tutto modeste alla più bassa concentrazione di Cd somministrata, ben più evidenti e differenziate, in relazione al tipo cellulare, in seguito al trattamento con le concentrazioni più elevate del metallo che, nel caso di *P. laevis* hanno addirittura determinato, come precedentemente ricordato, la morte di tutti gli individui trattati.

b.1 - Alterazioni ultrastrutturali a carico delle cellule B

Tre settimane di trattamento con la dose minima saggiata - Cd 10 mg L⁻¹ - non hanno determinato alterazioni significative dell'organizzazione ultrastrutturale delle cellule B in tutte le specie indagate. Infatti, l'aspetto della loro regione basale è rimasto praticamente immutato rispetto agli individui non trattati mentre a carico del nucleo è stata evidenziata soltanto una modesta condensazione della cromatina (Fig. 46); più significativo è risultato l'aumento del numero di lisosomi secondari (Fig. 47) e, soprattutto, un moderato danno all'orletto microvillare (Fig. 48).



Figg. 40-41 - Sezioni trasversali di tubuli dell'epatopancreas di individui trattati con $\text{Cd } 100 \text{ mg L}^{-1}$. La regione basale delle cellule S appare ricca in granuli di accumulo elettrondensi, corrispondenti alle vescicole di accumulo del metallo (**freccia**). **40.** *Armadillidium vulgare*; (blu di toluidina, 400 x). **41.** *Armadillidium granulatum*; (blu di toluidina, 600 x).



Figg. 42-43 - Sezione trasversale di tubuli dell'epatopancreas di individui trattati con Cd 100 mg L^{-1} . **42.** *Armadillidium granulatum*; sono evidenti, nelle cellule S, abbondanti granulazioni dense corrispondenti alle vescicole di accumulo del metallo (**freccia**), mentre il citoplasma delle cellule B è infarcito di gocce lipidiche (*) (blu di toluidina, 400 x). **43.** *Armadillidium vulgare*; nelle cellule S, oltre ai granuli densi, sono presenti numerose aree vacuolizzate (**freccia**) (blu di toluidina, 400 x).

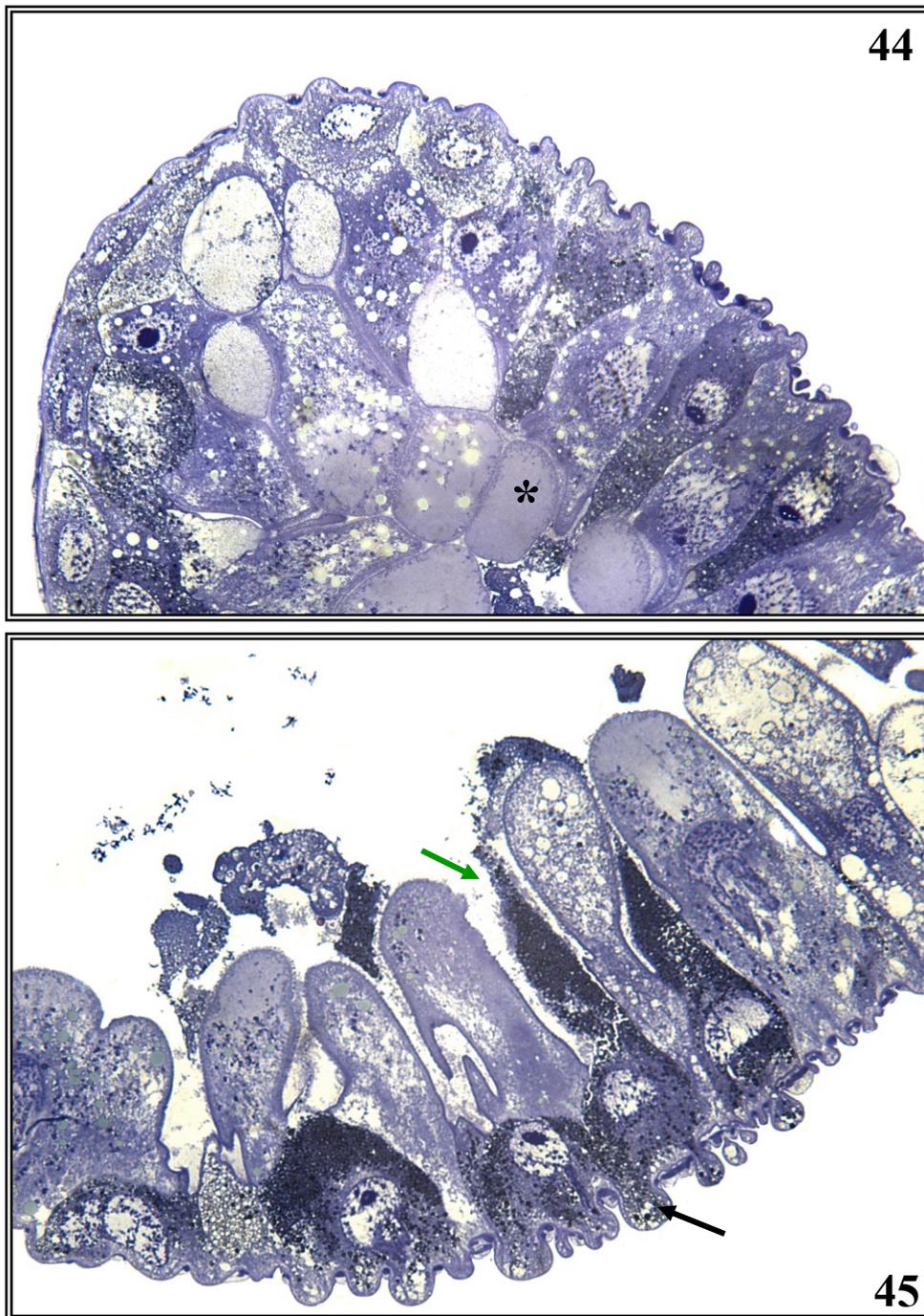
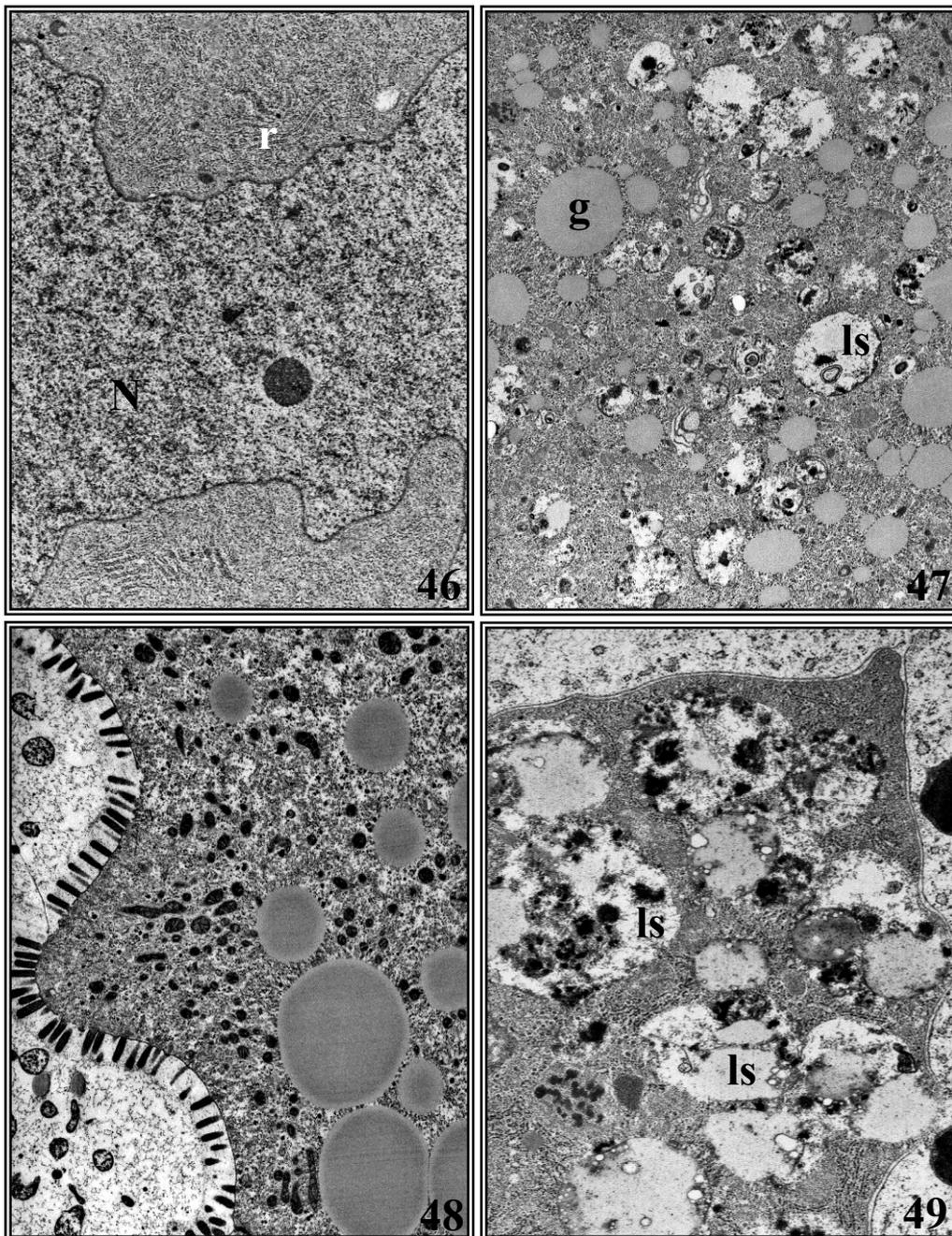


Fig. 44-45 - Sezione trasversale di tubuli dell'epatopancreas di *Porcellio laevis* trattato con sali di cadmio. **44.** Oltre ad un'evidente vescicolazione del citoplasma delle cellule B ed S è apprezzabile, a carico delle cellule B, una tendenza alla coagulazione di ampie porzioni del citoplasma in sede apicale che appare del tutto privo di organuli cellulari (*) (Cd 10 mg L^{-1} , blu di toluidina, 40 x). **45.** Si osserva nelle cellule S un'abnorme presenza di granuli di accumulo del metallo (**freccia nera**), ed una totale disorganizzazione di alcune cellule con fuoriuscita nel lume del loro contenuto (**freccia verde**) (Cd 50 mg L^{-1} , blu di toluidina, 40 x).



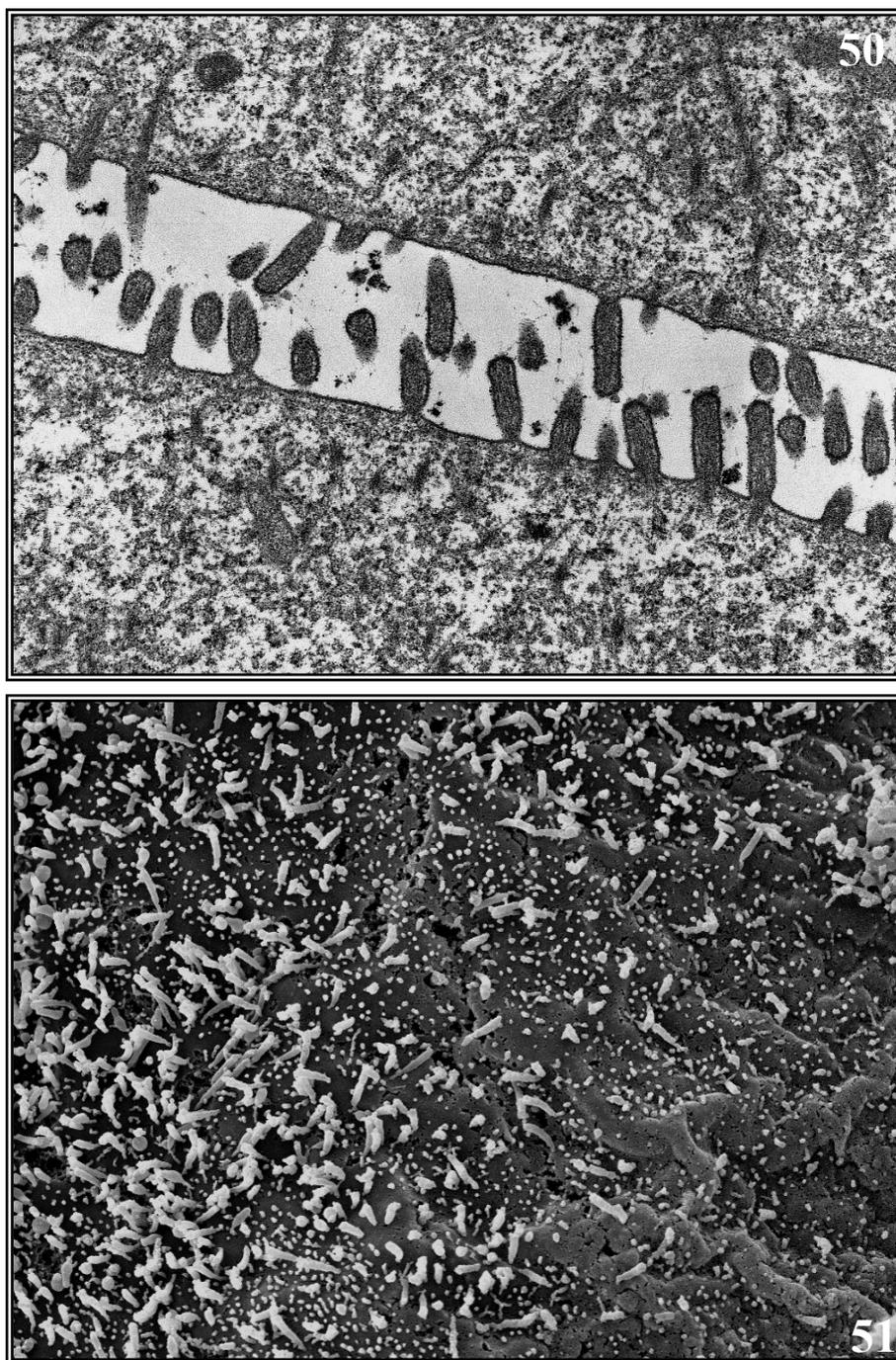
Figg. 46-49 - Epatopancreas di individui trattati con sali di cadmio. **46.** *Porcellio laevis*; nucleo (N) di cellula B con cromatina moderatamente addensata; r, piccoli gruppi di cisterne appiattite del RER (Cd 10 mg L⁻¹, 6.300 x). **47.** *Armadillidium vulgare*; citoplasma di cellula B infarcito di piccole gocce lipidiche (g) e lisosomi secondari (ls) (Cd 10 mg L⁻¹, 5.000 x). **48.** *Armadillidium granulatum*; regione apicale di cellula B con orletto microvillare parzialmente danneggiato (Cd 10 mg L⁻¹, 10.000 x). **49.** *Armadillidium granulatum*; citoplasma di cellula B ricco in lisosomi secondari (ls) (Cd 50 mg L⁻¹, 10.000 x).

Ancor più rilevanti sono apparse le alterazioni riscontrate a livello cellulare negli individui trattati con la dose Cd 50 mg L⁻¹; la regione basale appare meno ricca in invaginazioni della membrana, aumenta ulteriormente il numero dei lisosomi secondari (Fig. 49) e, soprattutto, aumentano in maniera considerevole i segni di danno a carico dell'orletto microvillare; i microvilli appaiono, infatti, notevolmente diradati e l'organizzazione dei microfilamenti risulta alterata soprattutto a livello della trama terminale (Fig. 50).

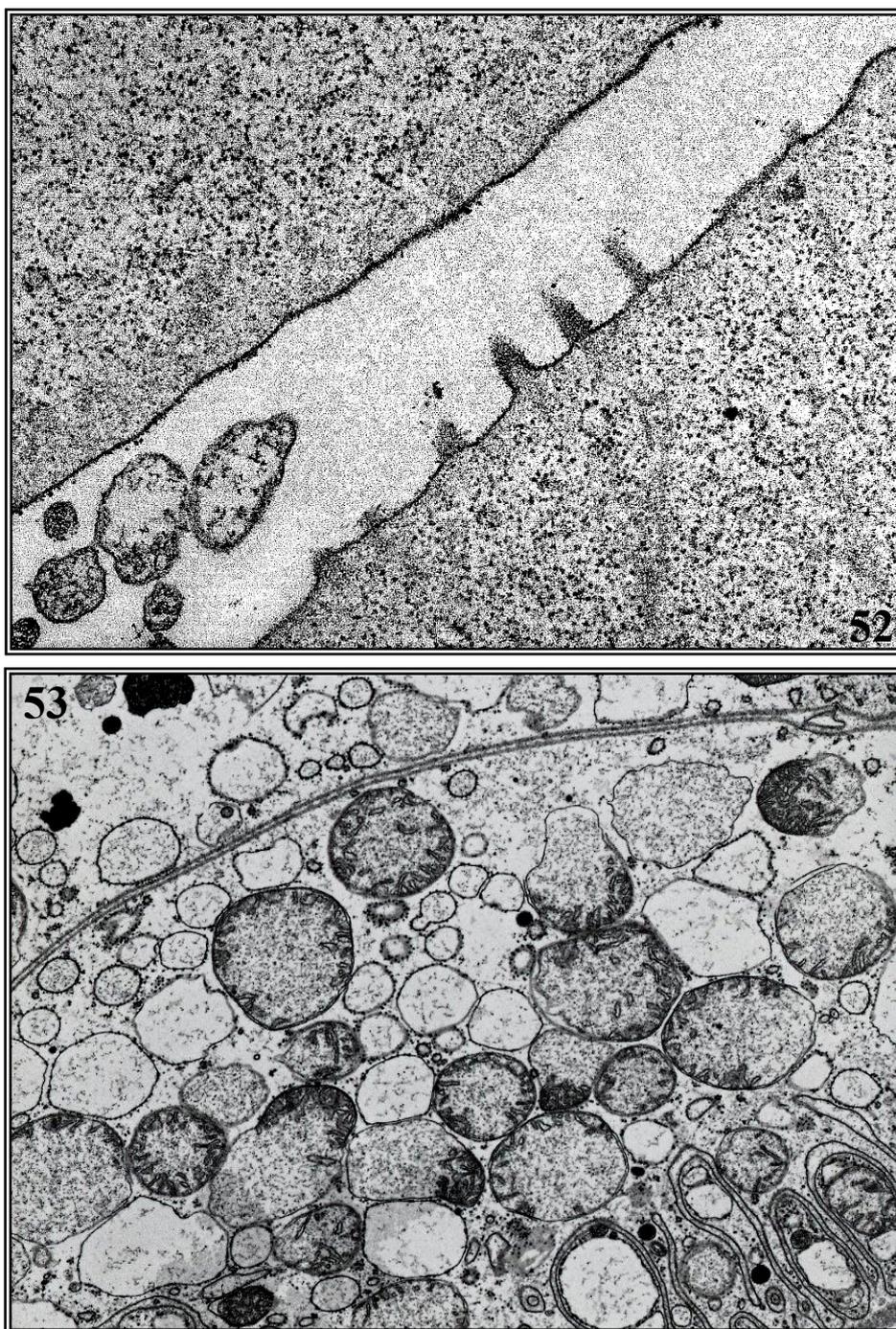
Alterazioni più consistenti a livello cellulare sono emerse a carico degli individui contaminati con la dose Cd 100 mg L⁻¹ riproponendo aspetti descritti per la dose Cd 50 mg L⁻¹; il danno all'orletto microvillare è apparso ancor più consistente (Fig. 51) ed in diverse cellule B i microvilli sono risultati, addirittura, quasi del tutto assenti (Fig. 52), i mitocondri sono rigonfi e presentano un ridotto sviluppo delle creste mitocondriali (Fig. 53) mentre le cisterne del RER in alcune cellule si dispongono sotto forma di regolari file parallele (Fig. 54), in altre assumono l'aspetto di cerchi concentrici (Fig. 55) ed, in altre ancora, appaiono chiaramente dilatate (Fig. 56). Interessato è anche il nucleo, a carico del quale si è evidenziata una più marcata condensazione della cromatina, sotto forma di numerose zolle localizzate per lo più in prossimità della parete nucleare. In numerose cellule B, sono stati osservati anche segni di disorganizzazione delle gocce lipidiche, consistenti in una variazione della densità della loro regione più periferica, accompagnata dalla presenza di piccoli aggregati di materiale elettrondenso associati alla loro superficie (Fig. 57). Notevolmente incrementato è risultato, infine, il numero di lisosomi secondari sparsi in tutto il citoplasma (Fig. 58). Parte delle cellule B ha mostrato segni ancor più evidenti di alterazione, andando incontro ad una pressoché totale disorganizzazione del citoplasma sotto forma di una sua estesa ed eterogenea vescicolazione (Fig. 59).

b.2 - Alterazioni ultrastrutturali a carico delle cellule S

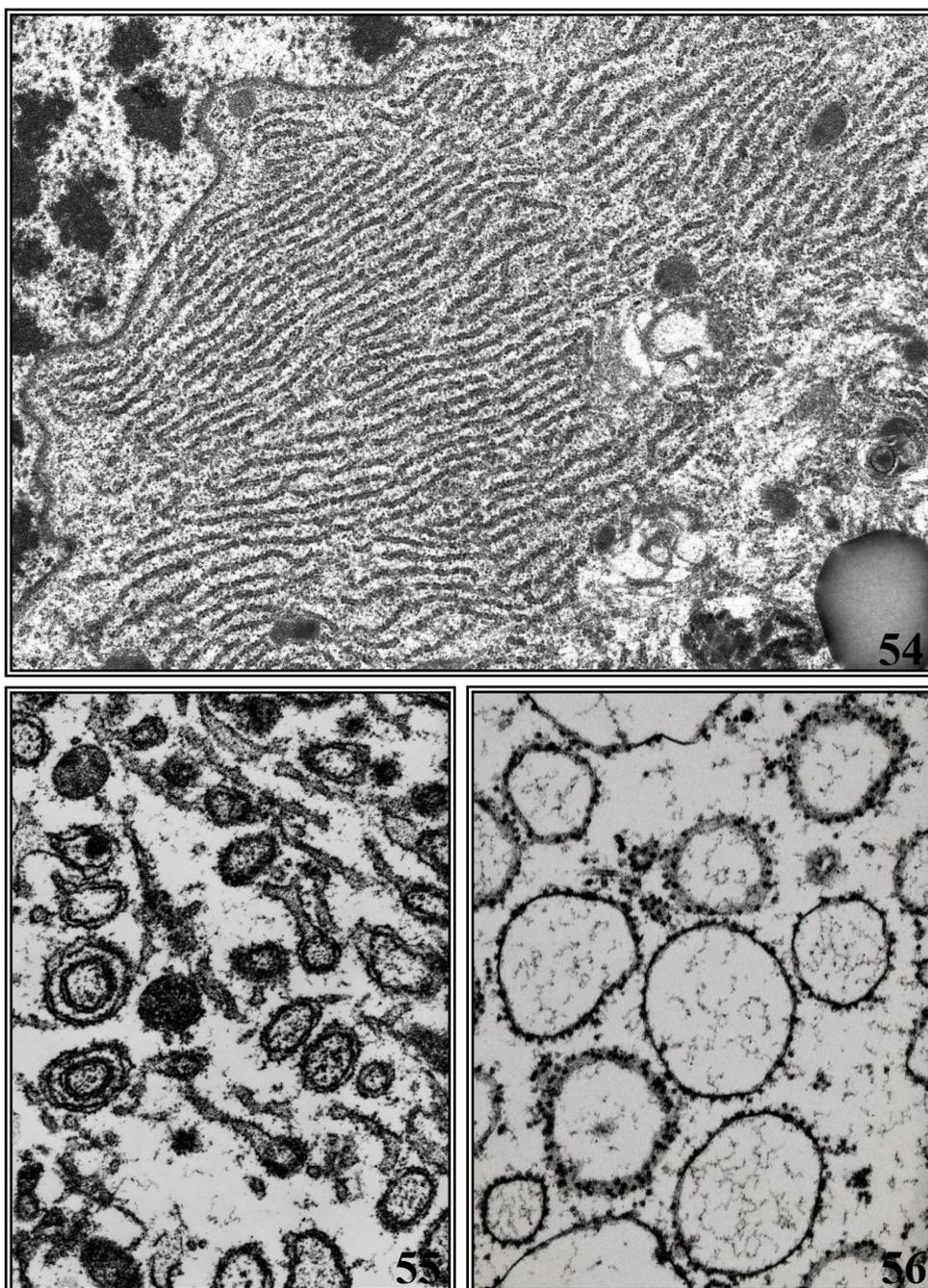
L'assetto organizzativo delle cellule S è risultato ancor meno compromesso dalla dose minima del metallo somministrata: l'aspetto del nucleo è risultato pressoché immutato e si è tutto al più rilevato solo un modesto aumento, per altro a carico solo di alcune cellule S, del numero delle vescicole di accumulo del metallo, caratterizzate da un contenuto ancora alquanto elettrone-trasparente (Fig. 60).



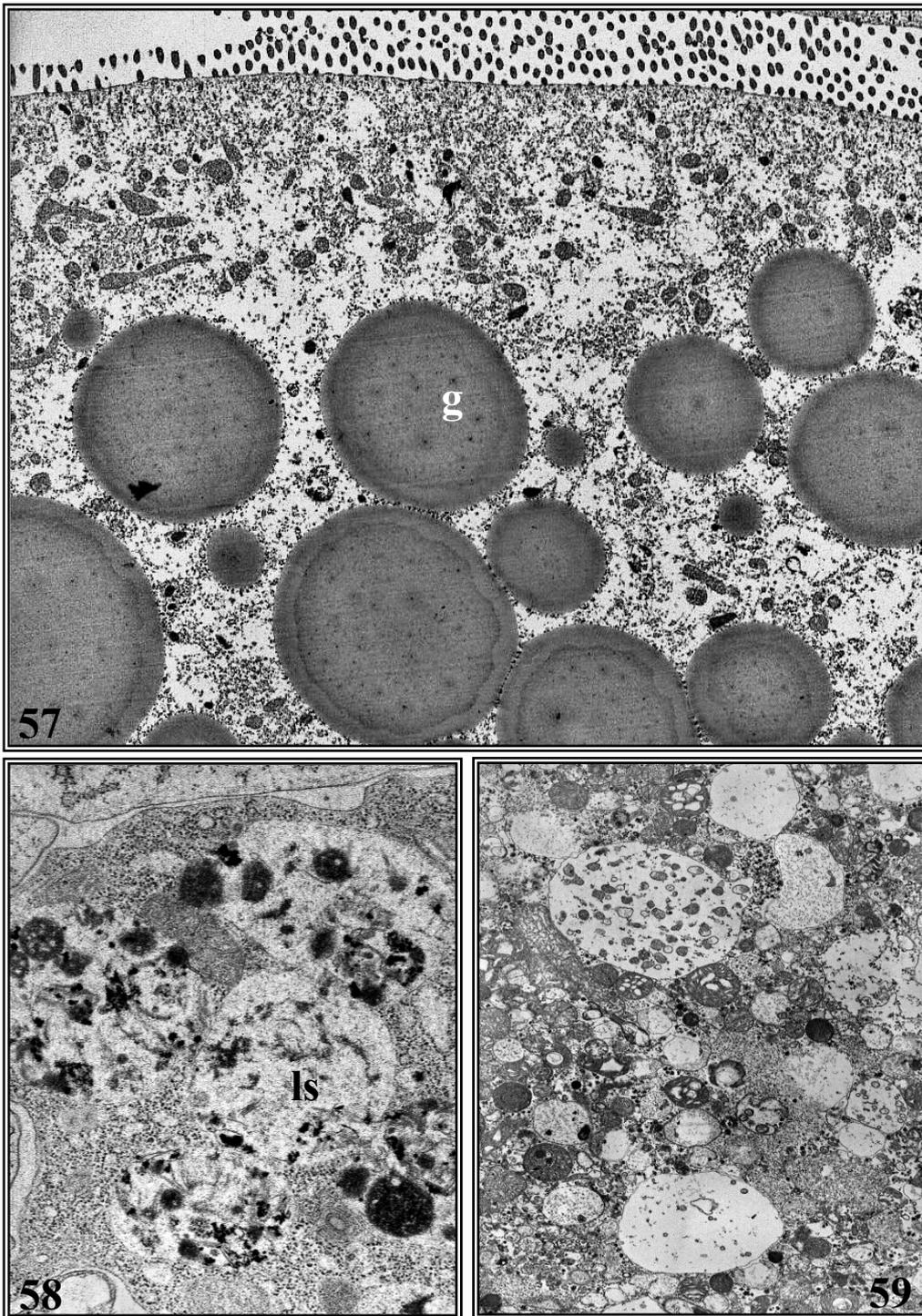
Figg. 50-51 - Epatopancreas di individui di *Armadillidium granulatum*, trattati con sali di cadmio. Sia al MET (50. Cd 50 mg L⁻¹, 16.000 x), sia al MES (51. Cd 100 mg L⁻¹, 7.000 x) l'orletto microvillare di numerose cellule B appare notevolmente danneggiato.



Figg. 52-53 - Epatopancreas di individui di *Armadillidium granulatum* trattati con Cd 100 mg L^{-1} . **52.** Alla superficie di numerose cellule B l'orletto microvillare è quasi totalmente assente (20.000 x). **53.** Nelle cellule B i mitocondri appaiono dilatati e quasi del tutto privi di creste mitocondriali (13.000 x).



Figg. 54-56 - Epatopancreas di individui trattati con $\text{Cd } 100 \text{ mg L}^{-1}$. Vari aspetti assunti dal RER in differenti cellule B delle diverse specie studiate. **54.** *Armadillidium vulgare*; sottili cisterne del RER disposte in regolari file parallele (8.900 x). **55.** *Porcellio laevis*; RER sotto forma di piccole cisterne concentriche (15.500 x). **56.** *Armadillidium granulatum*; cisterne del RER notevolmente dilatate (6.300 x).



Figg. 57-59 - Epatopancreas di individui trattati con Cd 100 mg L⁻¹. **57.** *Armadillidium granulatum*; accumulo di gocce lipidiche (g) in via di degradazione nelle cellule B (3.200 x). **58.** Cellula B contenente numerosi lisosomi secondari (ls) (16.000 x). **59.** Estesa ed eterogenea vescicolazione del citoplasma di una cellula B in via di totale disorganizzazione (6.300 x).

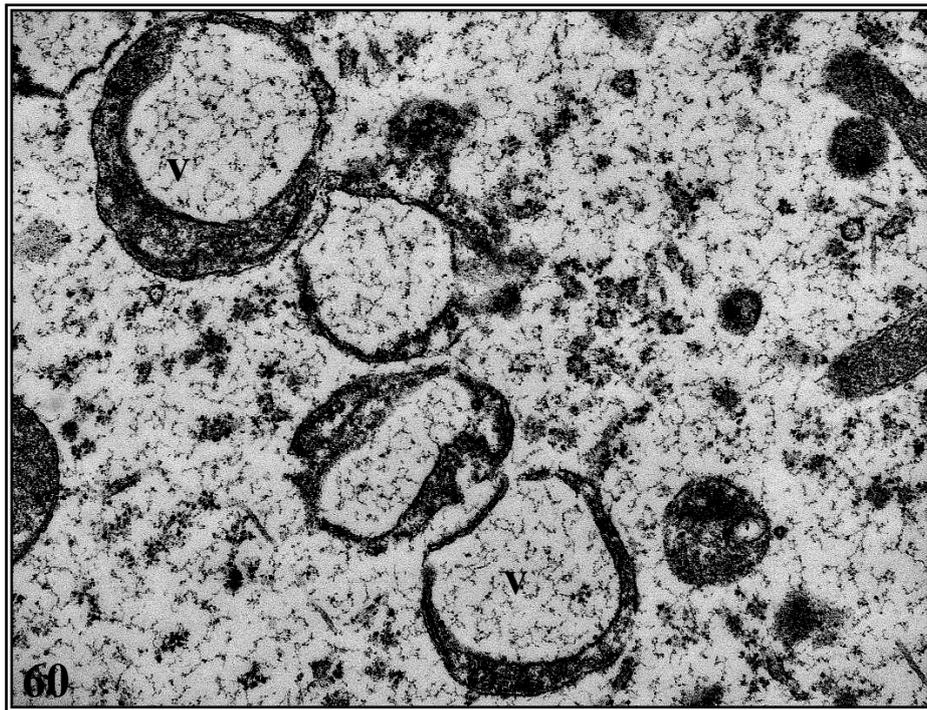
Anche in questo caso le alterazioni più significative sono state riscontrate negli individui trattati con le dosi più elevate del sale di Cd.

La risposta delle cellule S è stata, comunque, diversamente modulata e disomogenea; alcune cellule S hanno presentato un normale aspetto della regione basale, caratterizzata sempre da un ricco sistema di invaginazioni della membrana plasmatica, così come osservato negli individui non trattati (Fig. 61), mentre a livello del citoplasma è stato riscontrato solamente un aumento del contenuto in depositi di glicogeno (Fig. 62) e, soprattutto, del numero di vescicole di accumulo del metallo con un contenuto in materiale di maggiore densità agli elettroni rispetto a quello riscontrato negli individui trattati con la dose di metallo più bassa (Fig. 63). Alcune cellule S, localizzate prevalentemente nel tratto intermedio dell'organo, sono andate incontro ad alterazioni più marcate, consistenti in una pronunciata condensazione della cromatina (Fig. 64) e in un evidente quadro di involuzione del citoplasma.

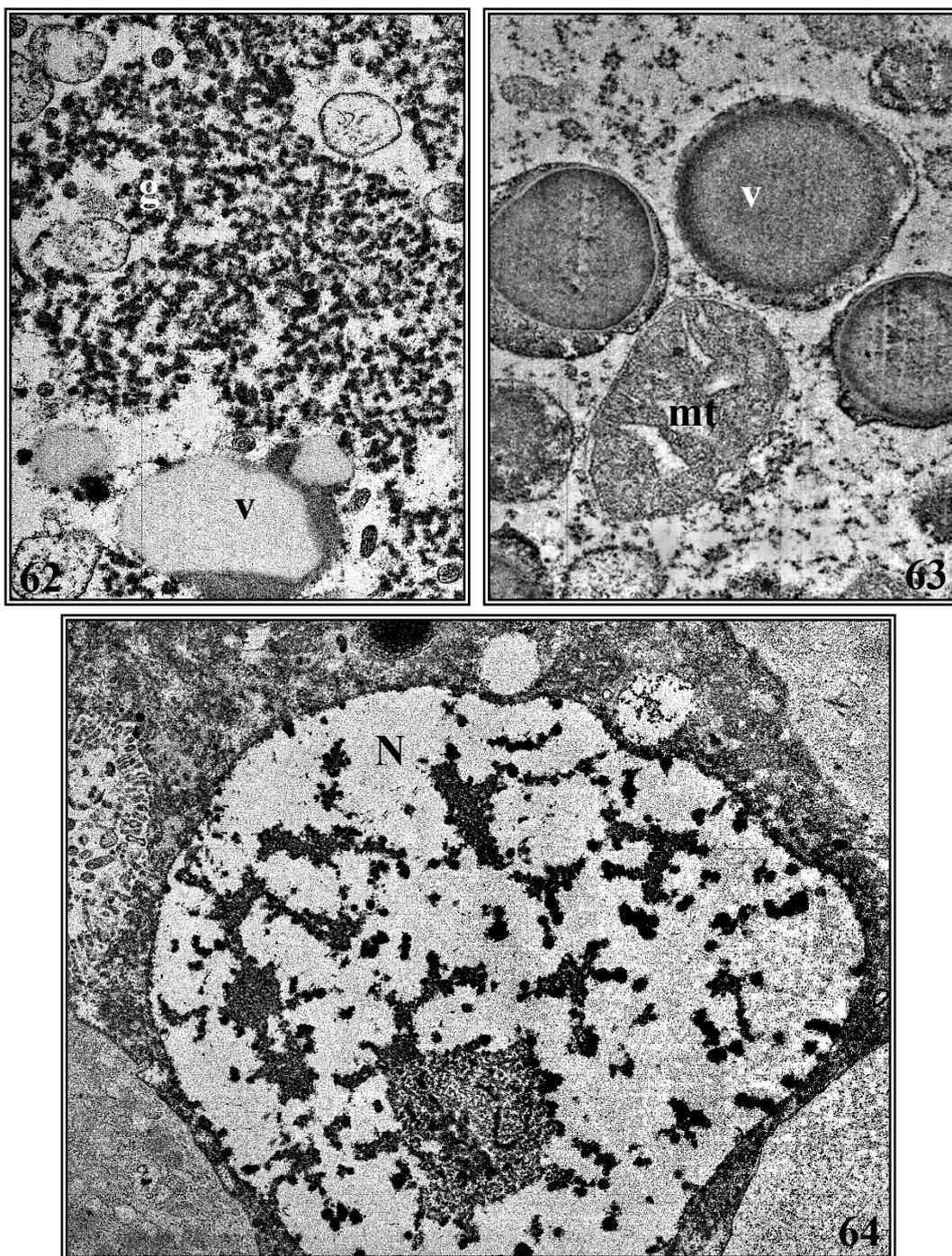
Ben più drammatiche sono risultate le alterazioni a livello cellulare emerse a carico degli individui trattati con la dose più elevata del sale di Cd. In quasi tutte le cellule, oltre al danno a carico dell'orletto microvillare, danno variamente modulato ma sempre consistente (Fig. 65), sono stati riscontrati segni di un'ancor più marcata involuzione dell'assetto organizzativo del nucleo e del citoplasma.

Uno degli aspetti più rilevanti, conseguenti all'impiego della concentrazione più elevata del sale di Cd, è, però, certamente rappresentato dall'incredibile aumento del numero di vescicole di accumulo del metallo che in alcune cellule arrivano ad infarcire totalmente estese porzioni del citoplasma (Figg. 42, 43, 66).

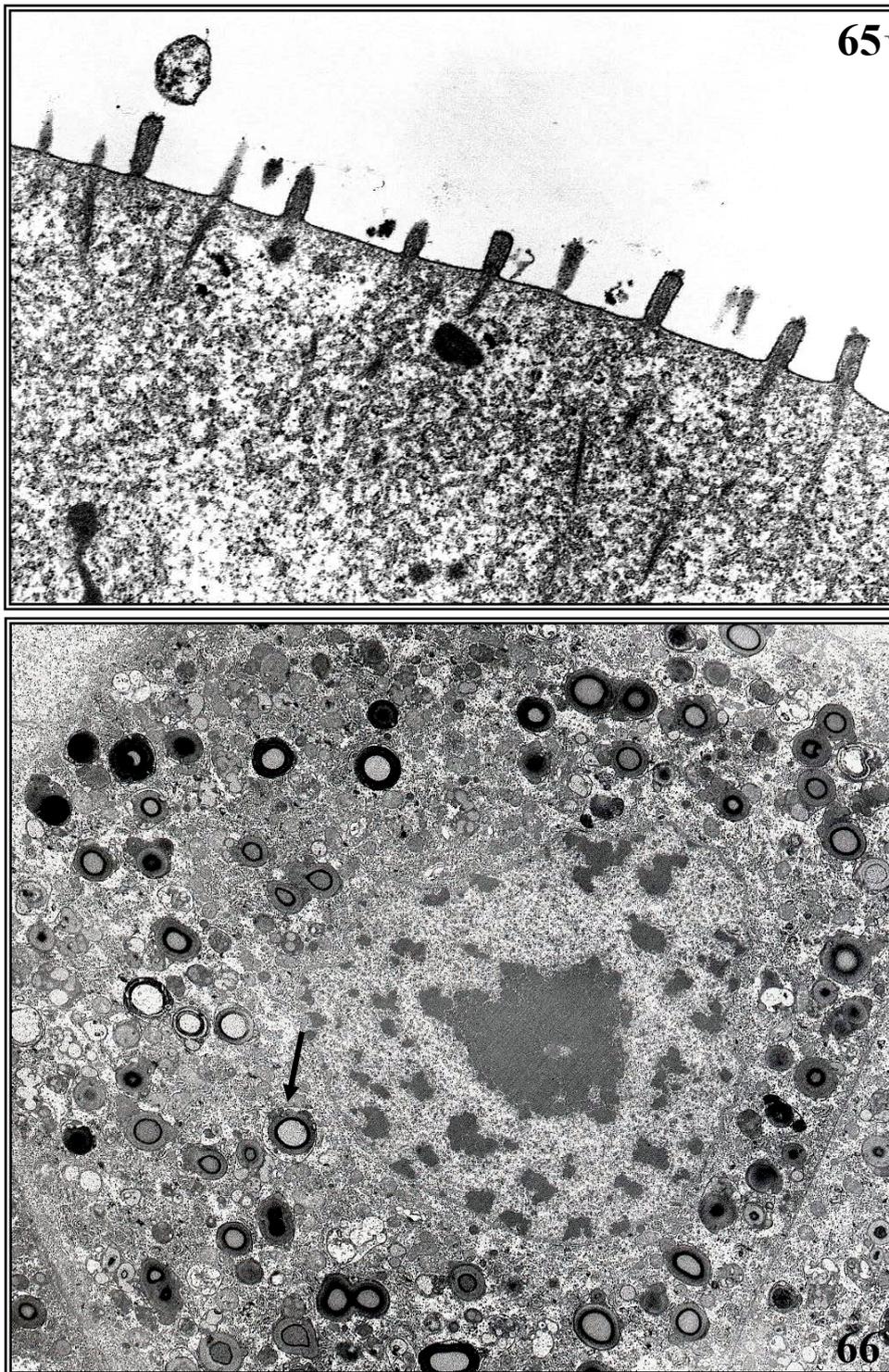
In alcune cellule S, tali vescicole mostrano un aspetto ancora molto simile a quello riscontrato nell'epatopancreas degli animali trattati con le dosi meno elevate di cloruro di cadmio: esse, cioè, presentano una regione periferica di apprezzabile densità che circonda, in modo irregolare, il lume centrale dove si localizza un materiale moderatamente elettrondenso e largamente disperso (Fig. 67). Parte di tali vescicole va incontro, invece, ad un progressivo accumulo di materiale elettrondenso tale da riempire parzialmente (Figg. 68, 69) o totalmente il loro lume (Fig. 70).



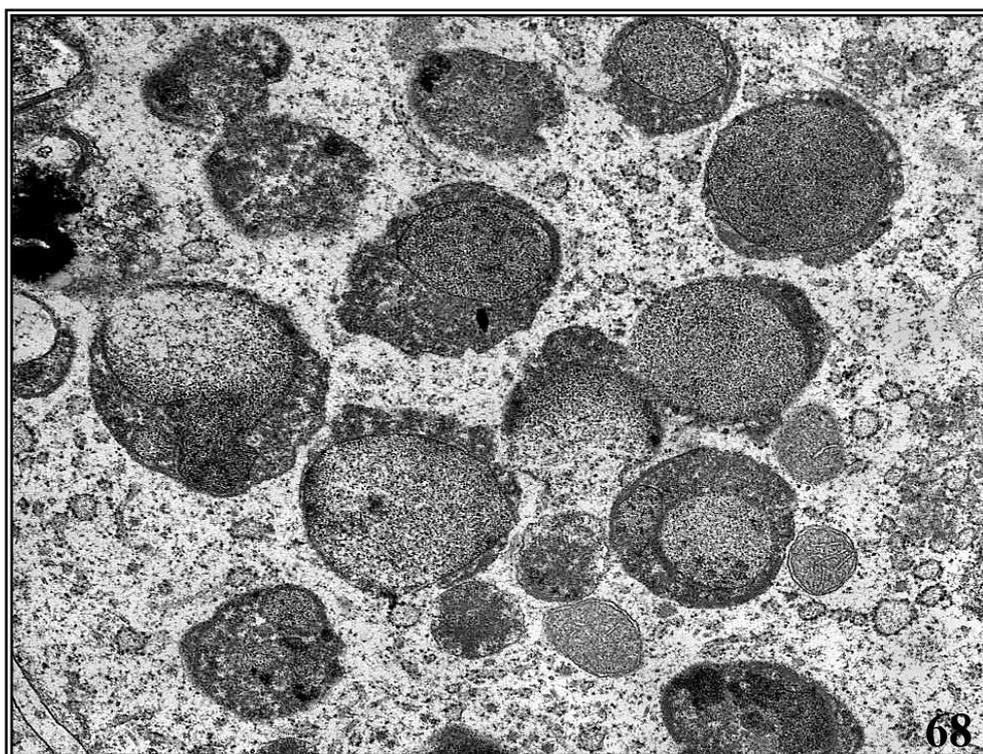
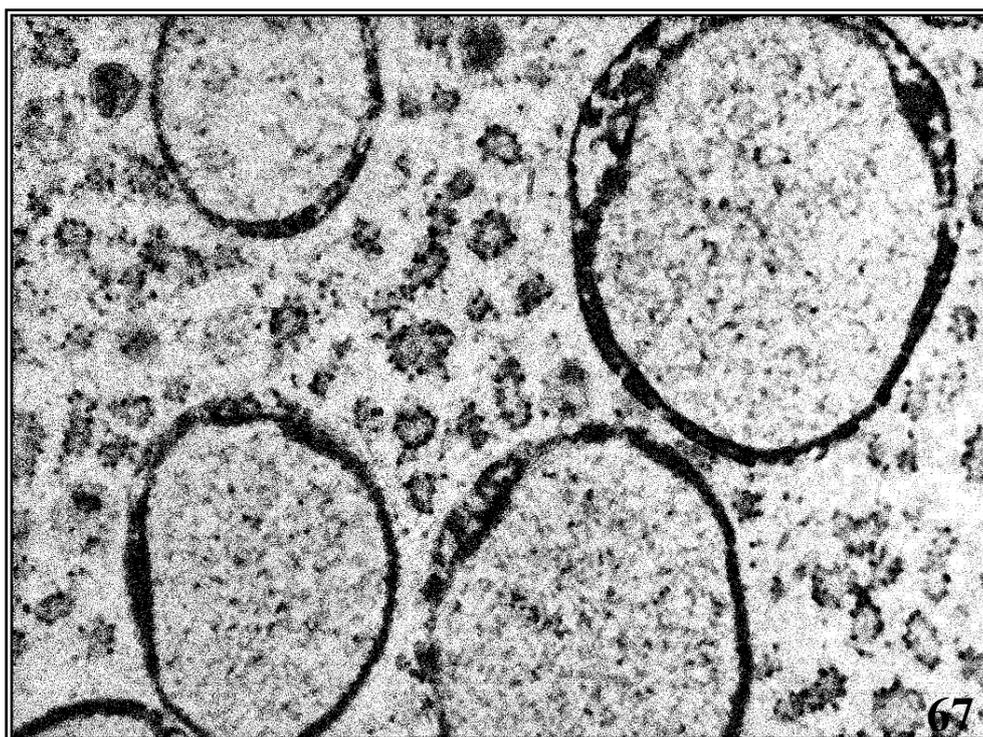
Figg. 60-61 - Epatopancreas di individui trattati con sali di cadmio. **60.** *Armadillidium granulatum*; cellula S con vescicole (v) di accumulo del metallo a contenuto poco elettrondenso ($\text{Cd } 10 \text{ mg L}^{-1}$, 20.000 x). **61.** *Armadillidium vulgare*; regione basale di cellula S. **b**, lamina basale; **m**, cellula muscolare; **v**, vescicole di accumulo del metallo a contenuto elettrondenso ($\text{Cd } 50 \text{ mg L}^{-1}$, 16.000 x).



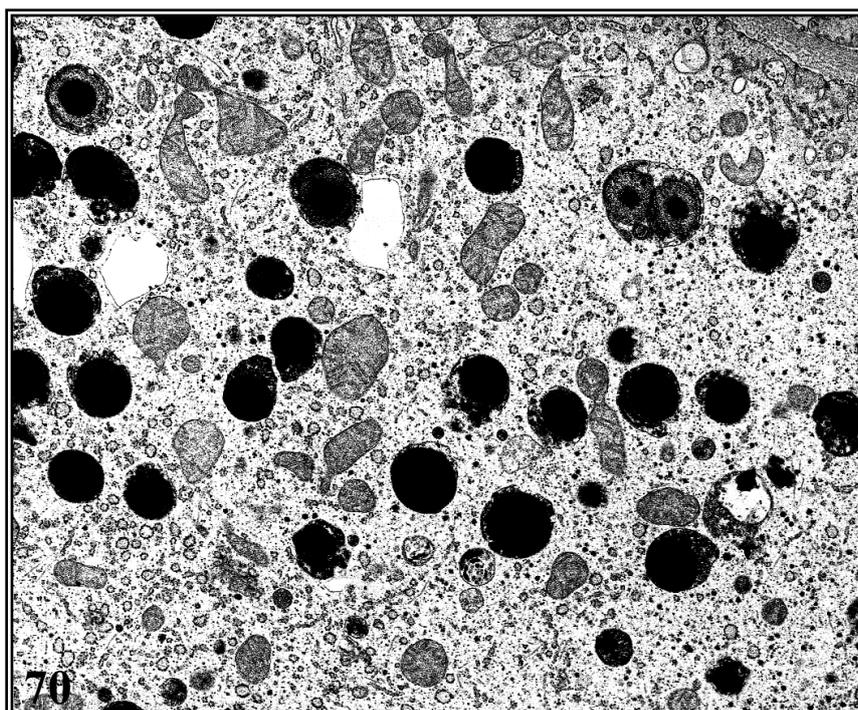
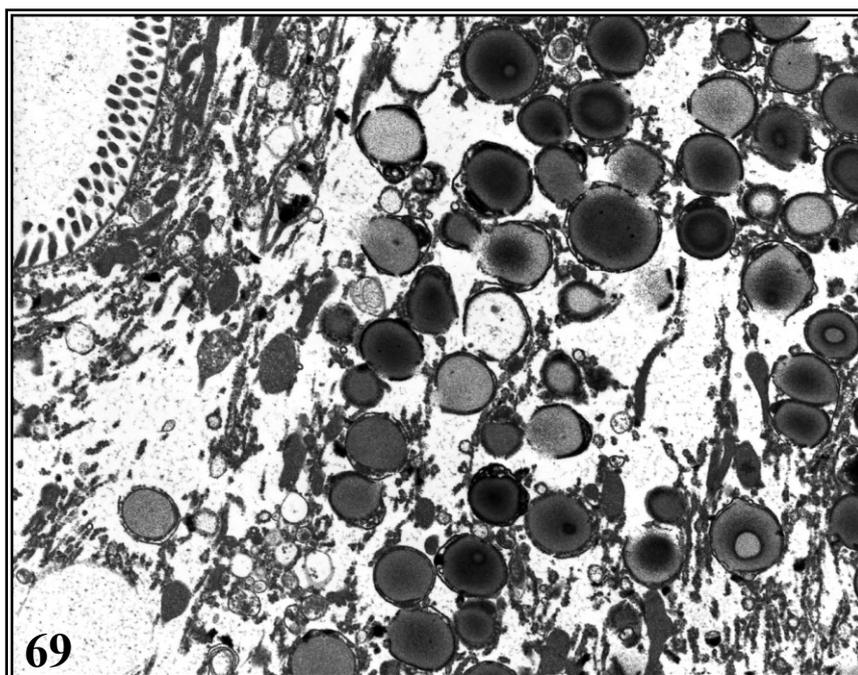
Figg. 62-64 - Epatopancreas di individui trattati con Cd 50 mg L^{-1} . **62.** *Armadillidium granulatum*; cellula S con citoplasma ricco di depositi di glicogeno (g) e di vescicole (v) (10.000 x). **63.** *Armadillidium granulatum*; vescicole di accumulo del metallo (v) dal contenuto elettrondenso, **mt**, mitocondrio (32.000 x). **64.** *Porcellio laevis*, nucleo (N) con cromatina condensata in una cellula in via di involuzione (6.300 x).



Figg. 65-66 - Epatopancreas di individui di *Armadillidium vulgare* trattati con Cd 100 mg L^{-1} . **65.** Cellula S con orletto microvillare notevolmente diradato ($13.000 \times$). **66.** Citoplasma di cellula S pieno di vescicole di accumulo del metallo (freccia) ($2.750 \times$).



Figg. 67-68 - Cellule S di individui di *Armadillidium granulatum* trattati con Cd 100 mg L^{-1} . **67.** Vescicole con regione periferica di apprezzabile densità e dal contenuto moderatamente elettrodensso e disperso (25.000 x). **68.** Vescicole dal contenuto maggiormente elettrodensso, che riempie parzialmente il loro lume (13.000 x).



Figg. 69-70 - Aspetto delle vescicole di accumulo del metallo nelle cellule S di individui trattati con Cd 100 mg L^{-1} . **69.** *Porcellio laevis* (5.200 x). **70.** *Armadillidium vulgare*; (6.300 x).

c) *L'epatopancreas negli individui esposti al piombo*

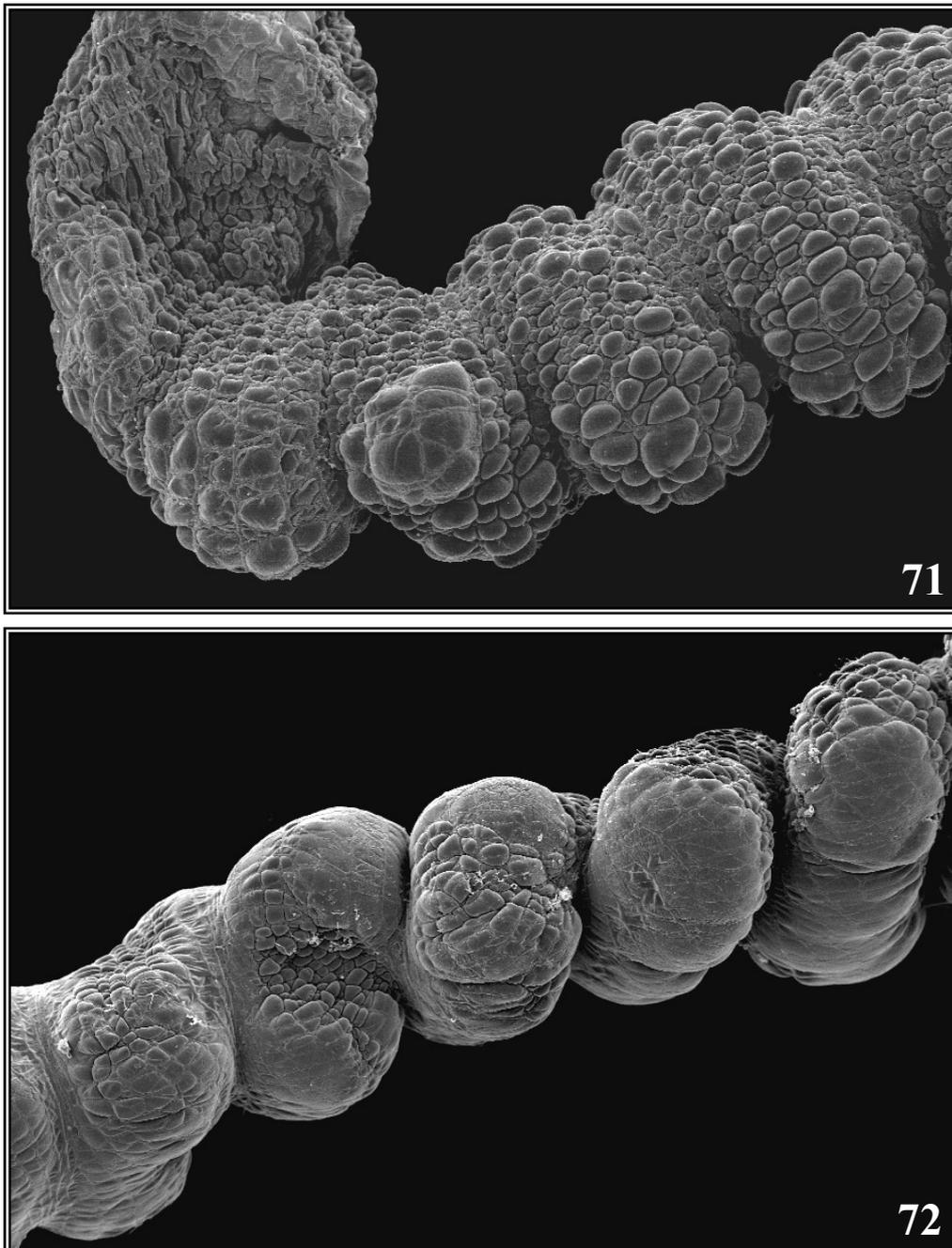
Così come rilevato per il Cd, anche la prolungata esposizione alle concentrazioni più elevate dei sali di Pb ha determinato un'evidente alterazione della morfologia dei tubuli epatopancreatici (Figg. 71, 72).

L'alterazione della morfologia dei tubuli si può apprezzare, anche in questo caso, nelle sezioni semifini dei tubuli degli individui trattati con le concentrazioni più elevate del metallo (Figg. 73, 74, 75); in tali sezioni è possibile apprezzare anche il progressivo aumento del numero dei granuli di accumulo del metallo, tale da infarcire quasi totalmente il corpo delle cellule S, una diminuzione del diametro e del numero delle gocce lipidiche nelle cellule B (Fig. 73, 74 e 75) e, alle concentrazioni più elevate del metallo, anche una consistente condensazione di larga parte del citoplasma di alcune cellule S (Fig. 76).

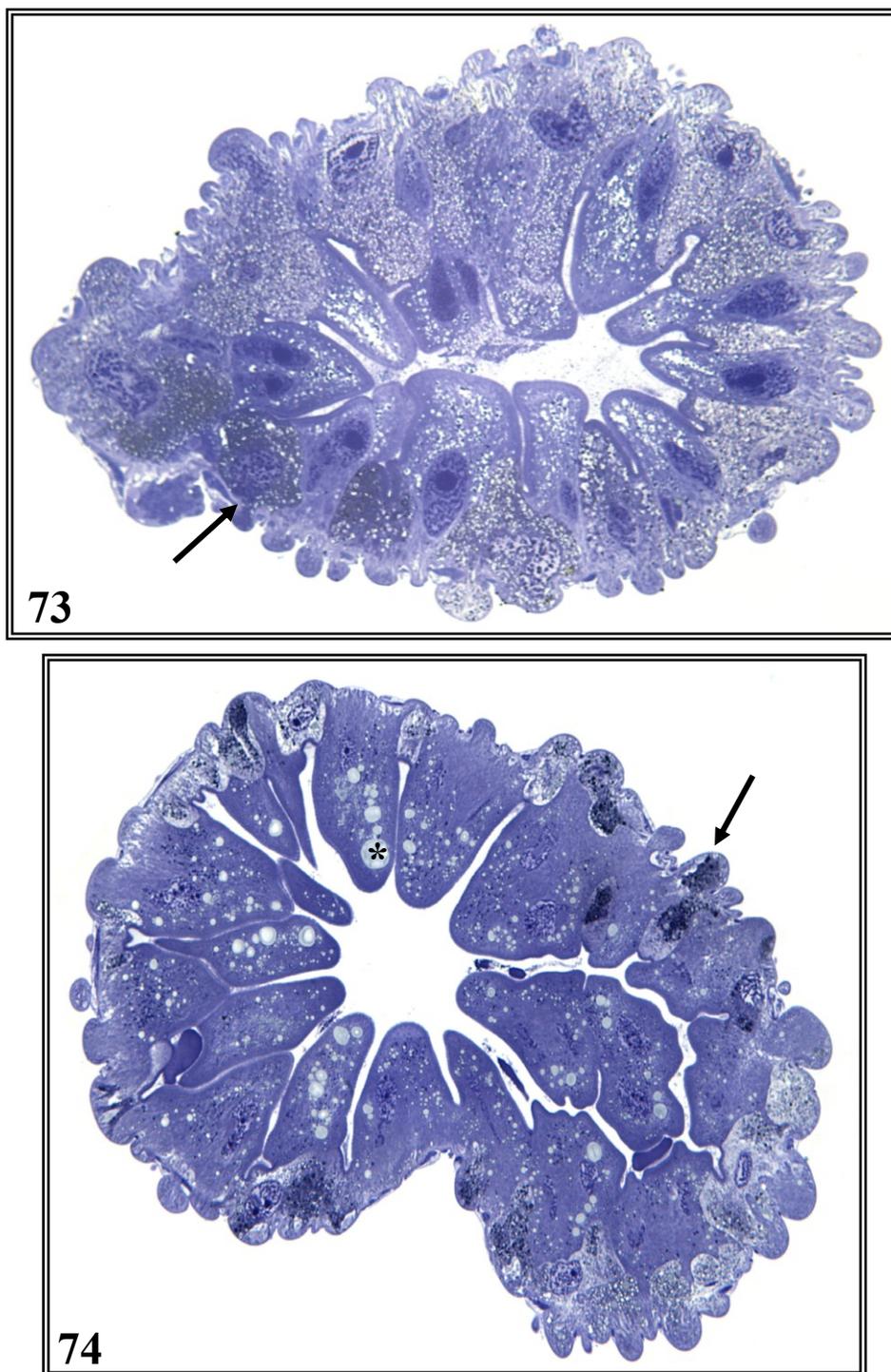
c.1 - *Alterazioni ultrastrutturali a carico delle cellule B*

L'effetto della contaminazione con la concentrazione meno elevata del metallo - Pb 100 mg L⁻¹ - ha determinato un quadro poco rilevante di alterazioni cellulari consistenti in un modesto aumento della densità del citoplasma ed un danno appena apprezzabile a carico dell'orletto microvillare nelle cellule B e riguardante, inoltre, solamente una parte di tali cellule, per lo più localizzate nella porzione prossimale dei tubuli (Fig. 77).

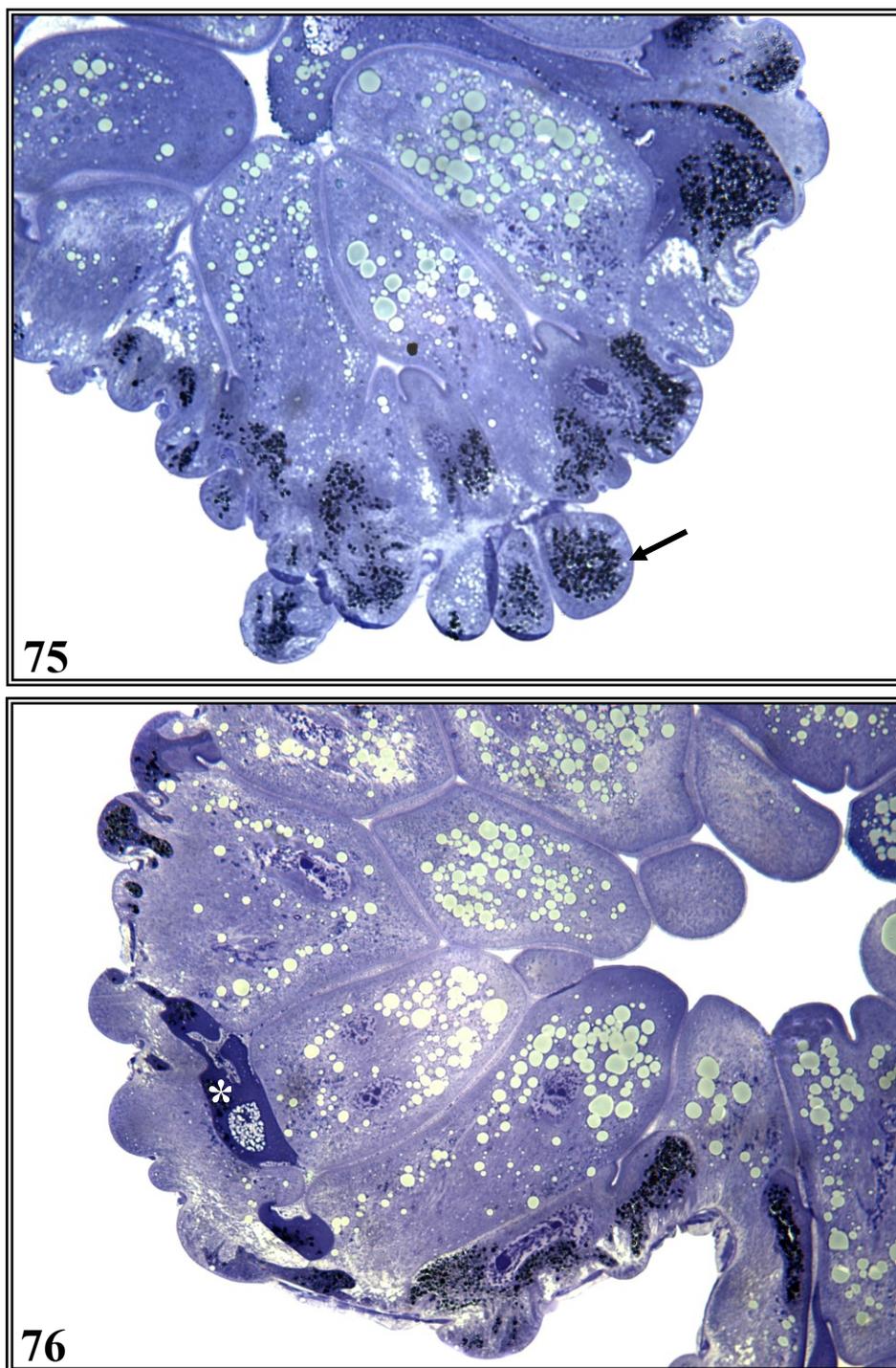
Anche per tale metallo, danni ben più consistenti sono stati determinati dalla contaminazione del cibo con le concentrazioni più elevate; nei tubuli degli individui contaminati con Pb 500 mg L⁻¹, il danno più consistente ha riguardato i microvilli, ulteriormente diradati (Fig. 78), rigonfi e caratterizzati da una pronunciata disorganizzazione del loro citoscheletro (Fig. 79), evidente anche a livello della trama terminale. Nel citoplasma, dove è stato spesso osservato un aumento disomogeneo della sua densità, sono presenti vescicole a contenuto fortemente elettrondenso (Fig. 80), prevalentemente localizzate nella regione apicale della cellula ed, inoltre, attorno alle gocce lipidiche è possibile osservare la presenza di numerosi, piccoli accumuli di materiale elettrondenso (Fig. 81). A carico del nucleo è



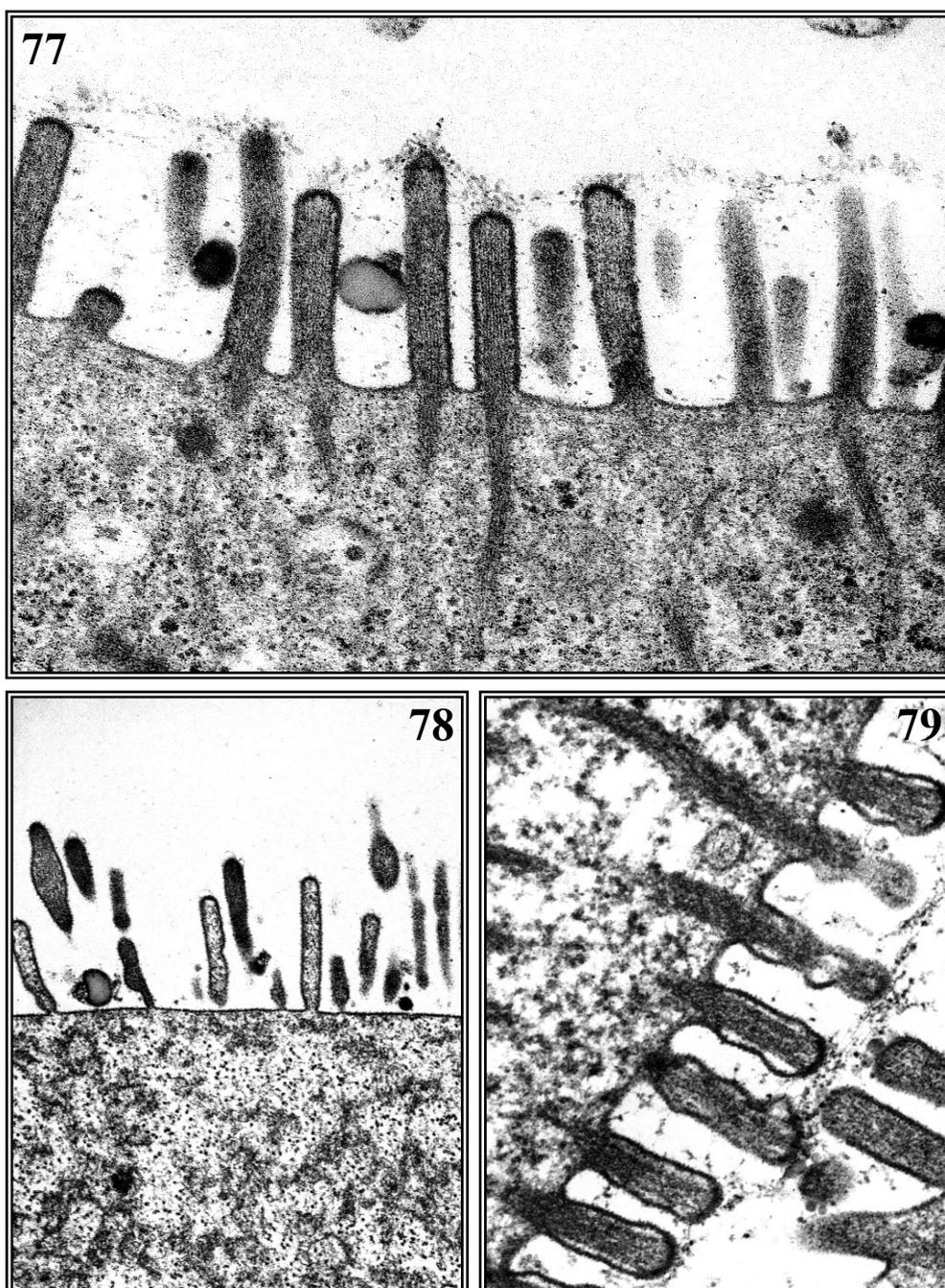
Figg. 71-72 - Quadri di alterazione morfologica dei tubuli di individui trattati con sali di piombo. **71.** *Armadillidium granulatum*; Pb 100 mg L⁻¹ (200 x). **72.** *Armadillidium vulgare*; Pb 500 mg L⁻¹ (70 x).



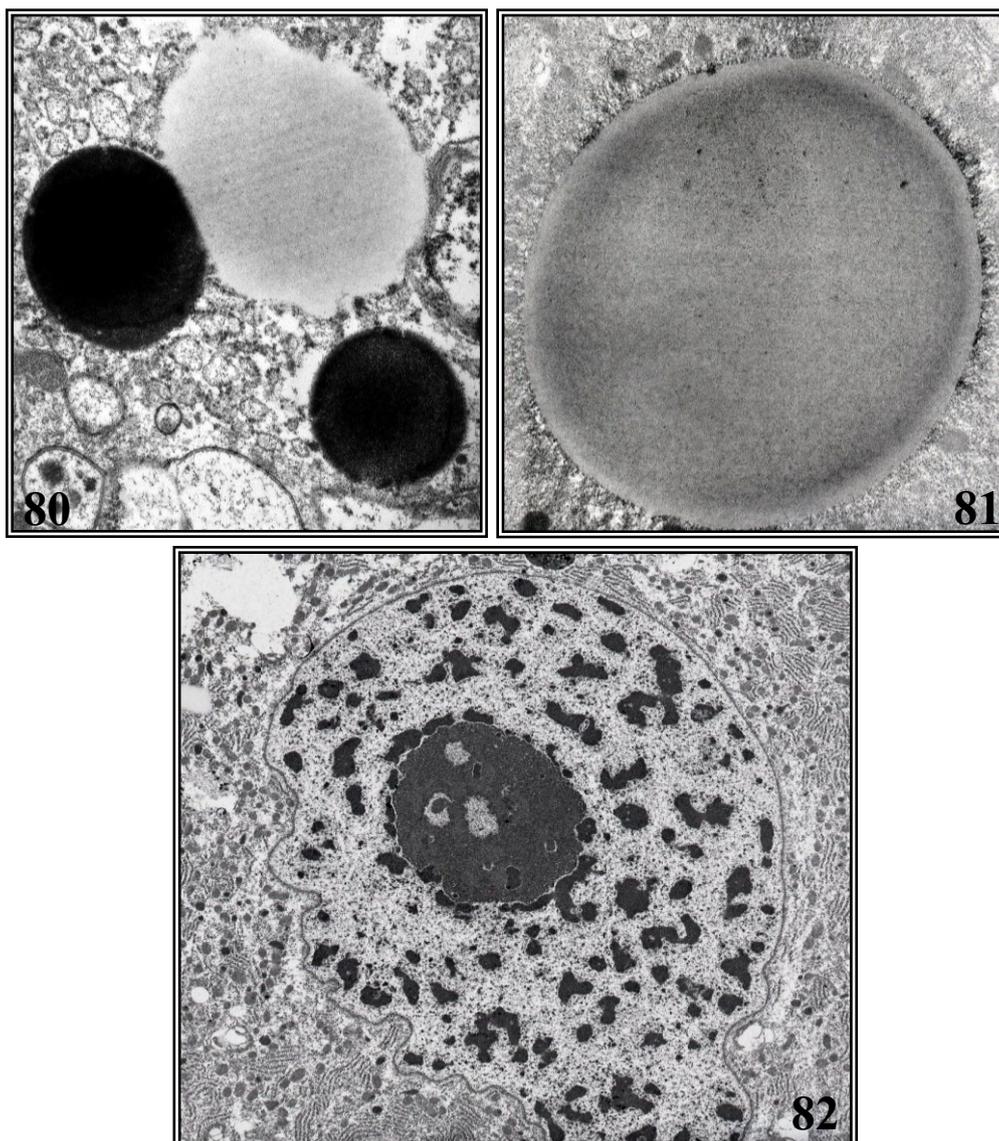
Figg. 73-74 - Sezioni trasversali di tubuli dell'epatopancreas di individui trattati con sali di piombo. Appare evidente la loro rilevante alterazione morfologica e la presenza di numerosi granuli di accumulo del metallo nelle cellule S (**freccia**) e di gocce lipidiche nelle cellule B (*). **73.** *Porcellio laevis*; Pb 100 mg L⁻¹ (blu di toluidina, 200 x). **74.** *Armadillidium vulgare*; Pb 500 mg L⁻¹ (blu di toluidina, 200 x).



Figg. 75-76 - Aspetti particolari delle alterazioni istologiche dei tubuli di *Armadillidium vulgare* indotte dal trattamento con Pb 1.000 mg L⁻¹. **75.** Sono evidenti abbondanti granuli di accumulo del metallo che infarciscono quasi totalmente il corpo delle cellule S (**freccia**) (blu di toluidina, 400 x). **76.** Consistente condensazione di parte del citoplasma di alcune cellule S (*) (blu di toluidina, 400 x).



Figg. 77-79 - Aspetti del danno all'orletto microvillare nelle cellule B dei tubuli di individui esposti al trattamento con le diverse concentrazioni dei sali di piombo. **77.** *Armadillidium granulatum* (Pb 100 mg L⁻¹, 25.000 x). **78.** *Armadillidium vulgare* (Pb 500 mg L⁻¹, 20.000 x). **79.** *Porcellio laevis* (Pb 500 mg L⁻¹, 40.000 x).



Figg. 80-82 - Cellule B di epatopancreas di individui esposti al trattamento con Pb 500 mg L⁻¹. **80.** *Armadillidium granulatum*; vescicole a contenuto fortemente elettrondenso presenti nel citoplasma (25.000 x). **81.** *Porcellio laevis*; segni di iniziale degradazione delle gocce lipidiche sotto forma di piccoli accumuli di materiale elettrondenso presenti alla loro periferia (18.000 x). **82.** *Porcellio laevis*; tendenza ad una progressiva condensazione della cromatina (3.800 x).

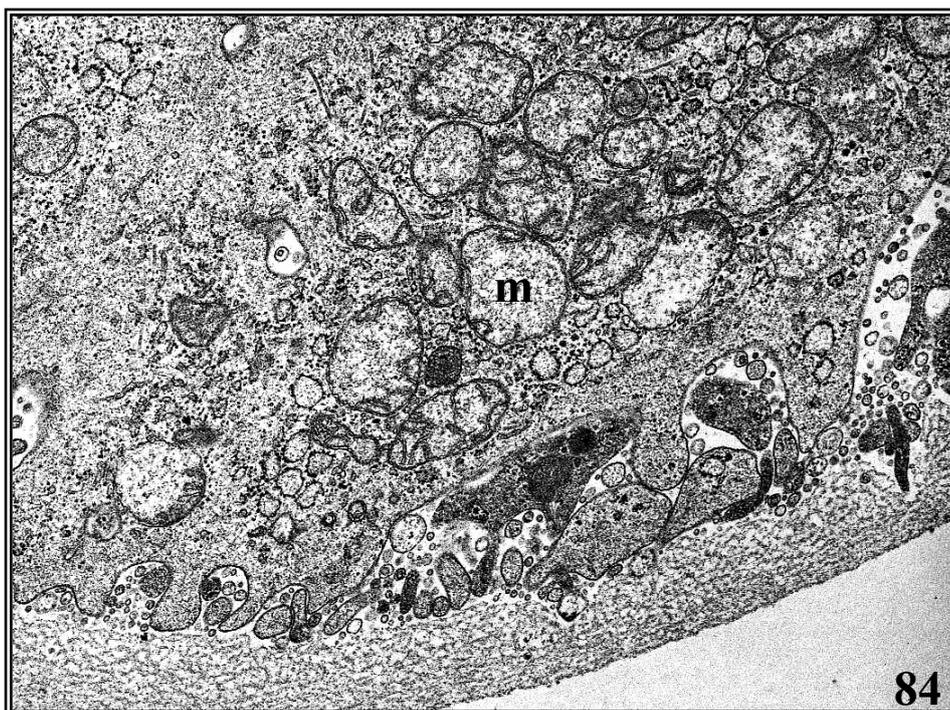
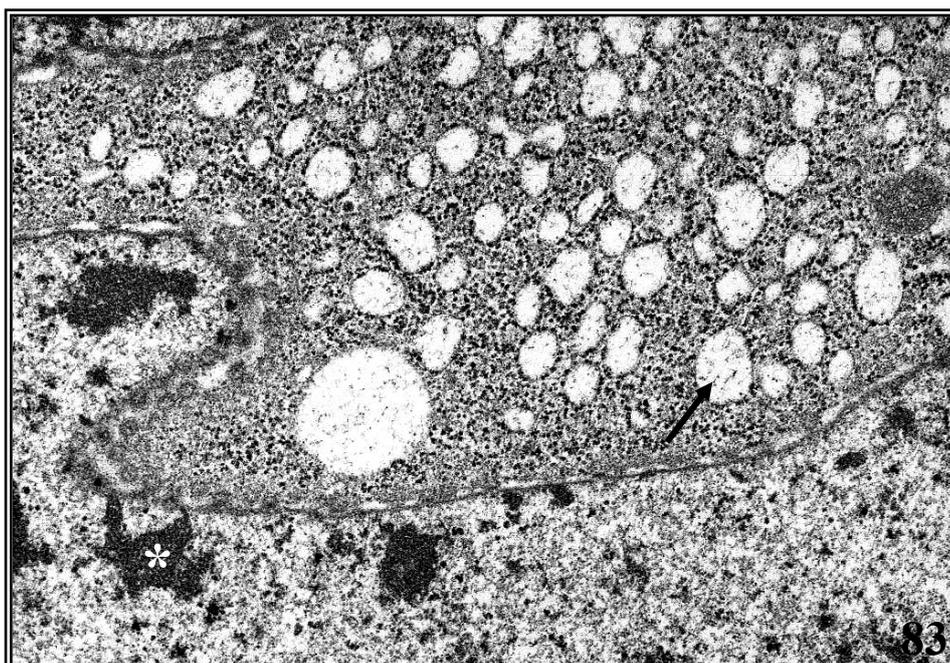
stata riscontrata, talvolta, una moderata tendenza alla condensazione della cromatina (Fig. 82).

Nelle cellule B degli individui contaminati con la concentrazione più elevata - Pb 1.000 mg L⁻¹ - oltre agli aspetti sopra descritti, è stato possibile osservare una spiccata tendenza alla dilatazione delle cisterne del RER che assumono un aspetto tubulare (Fig. 83), un'alterazione consistente a carico dei mitocondri che appaiono in molte cellule dilatati e con una riduzione rilevante delle creste mitocondriali (Fig. 84) ed, infine, un ulteriore aumento della condensazione della cromatina che appare sotto forma di zolle, in larga parte localizzate in prossimità della parete nucleare (Fig. 83).

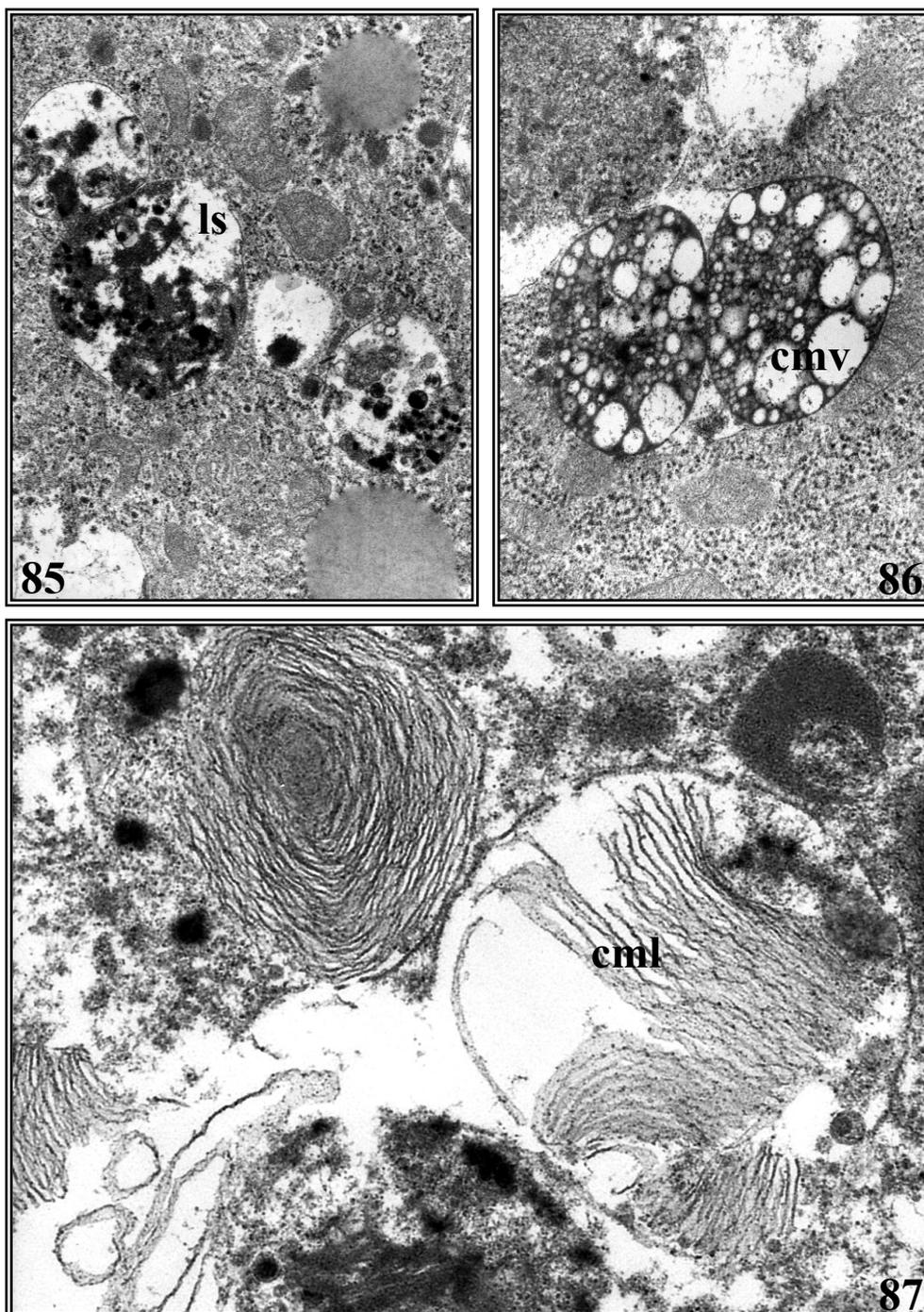
In un certo numero di cellule B, localizzate soprattutto nella regione prossimale dei tubuli, oltre ai quadri sopra descritti, è stata osservata la presenza di grandi vescicole dal contenuto fortemente eterogeneo, verosimilmente riconducibili a lisosomi secondari (Fig. 85), e di grossi corpi multivescicolari e multilamellari (Figg. 86, 87); alcune di tali cellule vanno incontro ad ulteriori fenomeni di disorganizzazione evidenziati da uno stato di rilevante vescicolazione del loro citoplasma, accompagnato da una profonda alterazione del nucleo consistente in una forte compattazione della cromatina e nella formazione di una o più evidenti dilatazioni della cisterna perinucleare (Fig. 88). Molte di queste cellule sono andate incontro ad una progressiva involuzione che ha determinato una loro totale disorganizzazione ed espulsione del contenuto nel lume dell'organo sotto forma di strutture vescicolari accompagnate da ammassi di materiale fortemente elettrondenso presente al loro interno oppure libero nel lume (Figg. 89, 90).

c.2 - Alterazioni ultrastrutturali a carico delle cellule S

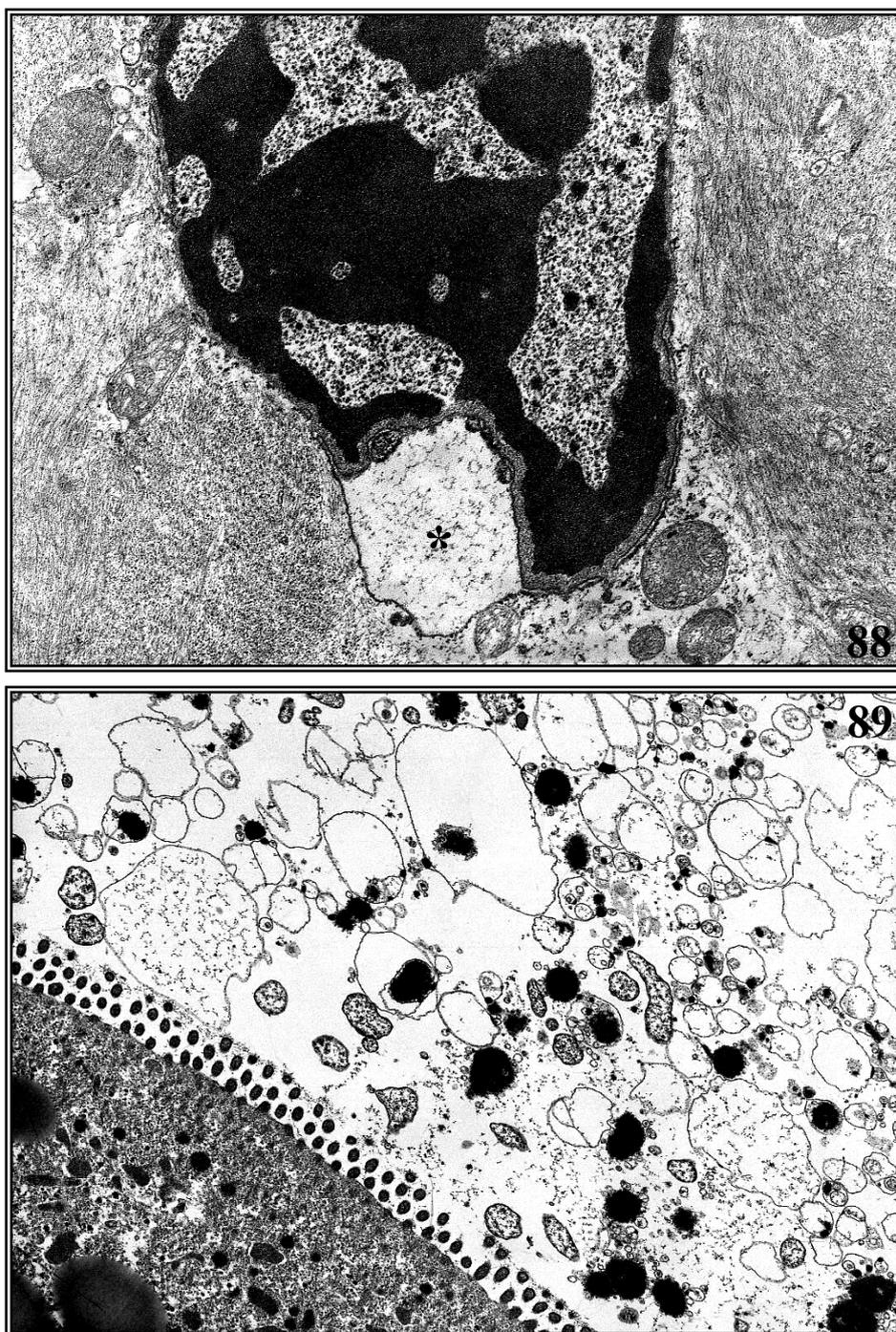
Anche per ciò che concerne le cellule S le alterazioni più evidenti sono state riscontrate nei tubuli degli individui contaminati con le concentrazioni più elevate del metallo. Il danno rilevato è stato in parte sovrapponibile a quello riscontrato nelle cellule B ma, in numerose cellule S ha riguardato anche i mitocondri che esibiscono quasi sempre una forma condensata e, per lo più, estremamente irregolare, assumendo frequentemente un aspetto parzialmente o totalmente filiforme (Fig. 91); sparsi in tutto il citoplasma sono anche presenti numerosi, piccoli, corpi multivescicolari (Fig. 92).



Figg. 83-84 - *Armadillidium granulatum*; cellule B di tubuli dell'epatopancreas di individui trattati con Pb 1.000 mg L⁻¹. **83.** La cromatina appare condensata (*), sotto forma di zolle, in larga parte localizzate in prossimità della parete nucleare e le cisterne del RER sono notevolmente dilatate (**freccia**) (16.000 x). **84.** Anche i mitocondri (**m**) sono fortemente dilatati, con matrice poco densa e creste notevolmente ridotte (25.000 x).



Figg. 85-87 - Cellule B dell'epatopancreas di individui trattati con Pb 1.000 mg L⁻¹. **85.** *Armadillidium granulatum*; grandi vescicole dal contenuto eterogeneo verosimilmente riconducibili a lisosomi secondari (**ls**) (16.000 x). **86.** *Armadillidium vulgare*; presenza nel citoplasma di corpi multivescicolari (**cmv**) (25.000 x). **87.** *Porcellio laevis*; presenza nel citoplasma di corpi multilamellari (**cml**) (27.500 x).



Figg. 88-89 - Epatopancreas di individui trattati con $Pb\ 1.000\ mg\ L^{-1}$. **88.** *Armadillidium vulgare*; il nucleo di alcune cellule B presenta la cromatina notevolmente condensata e rilevanti dilazioni della cisterna perinucleare (*) (13.000 x). **89.** *Armadillidium granulatum*; alcune cellule B vanno incontro a completa disorganizzazione e loro frammenti, sotto forma di vescicole varie, si osservano nel lume del tubulo frammiste a materiale elettrondenso (5.000 x).



Fig. 90 - *Armadillidium granulatum*; particolare della figura precedente (20.000 x).

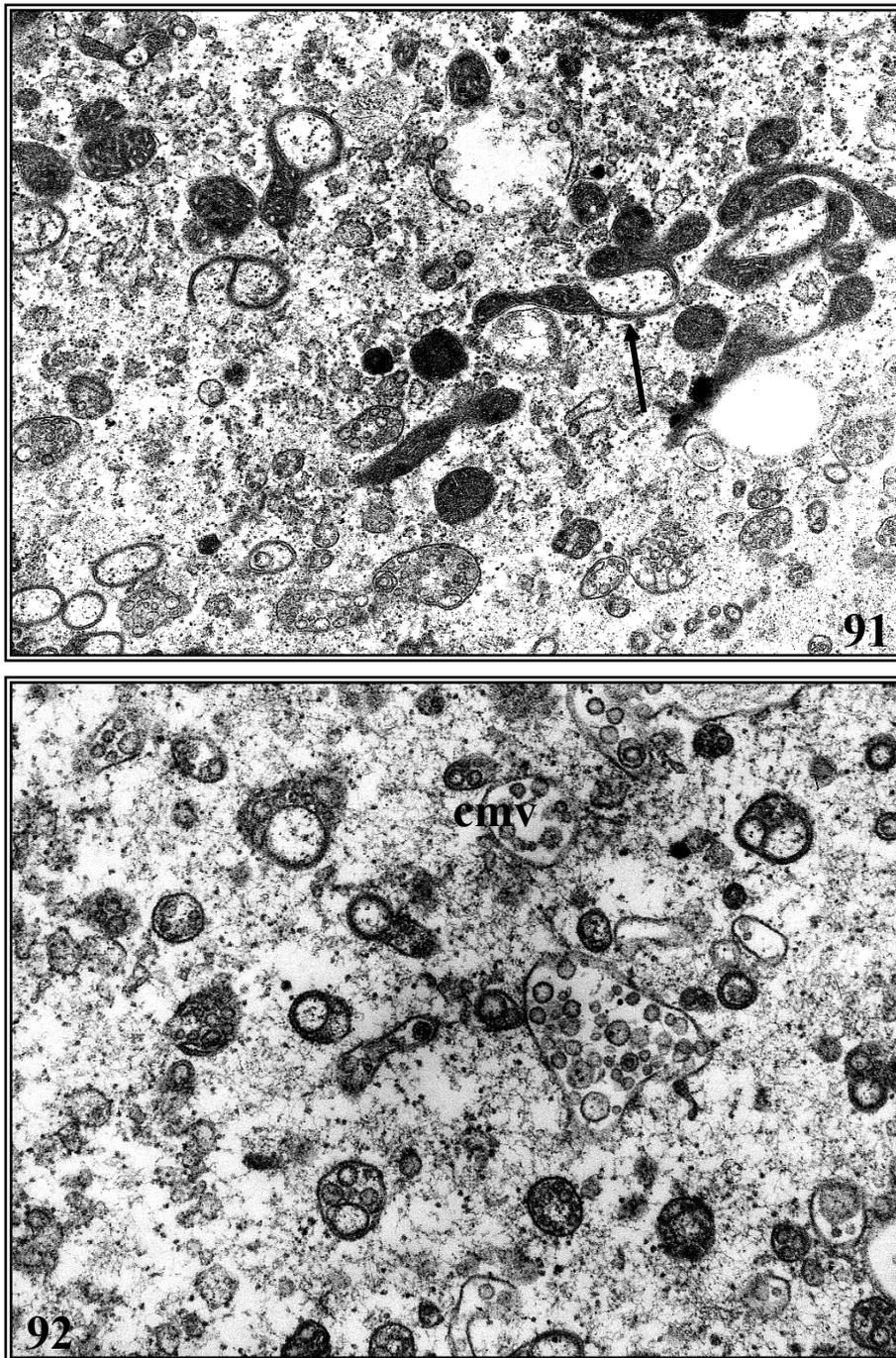


Fig. 91-92 - *Armadillidium vulgare*; cellule S dell'epatopancreas di individui trattati con Pb 500 mg L⁻¹. **91.** Mitochondri pleomorfici, talvolta parzialmente o totalmente filiformi (**freccia**) (13.000 x). **92.** Numerosi corpi multivescicolari (**cmv**) sono sparsi in tutto il citoplasma (20.000 x).

Nelle cellule S, invece, oltre al danno a carico del rivestimento microvillare e dei mitocondri, è stato riscontrato un rilevante aumento del numero di vescicole dal contenuto variamente elettrondenso che, in alcune cellule, arrivano ad infarcire totalmente quasi tutto il citoplasma (Fig. 93). In alcune cellule S, tali vescicole mostrano un aspetto ancora molto simile a quello riscontrato negli animali trattati con le concentrazioni meno elevate di cloruro di piombo: esse, cioè, presentano una regione periferica di apprezzabile densità che circonda, in modo irregolare, il lume centrale dove si localizza un materiale disperso e moderatamente elettrondenso (Fig. 93). A carico di una parte di tali vescicole è, però, possibile osservare una tendenza al progressivo accumulo del materiale elettrondenso, tale da riempire parzialmente o totalmente il loro lume (Figg. 93, 94 e 95).

In alcune cellule S, localizzate lungo tutta la parete dei tubuli, ma particolarmente nella loro regione prossimale, tale accumulo ha invece raggiunto livelli tali da conferire alle vescicole un aspetto estremamente ed omogeneamente elettrondenso (Figg. 96, 97).

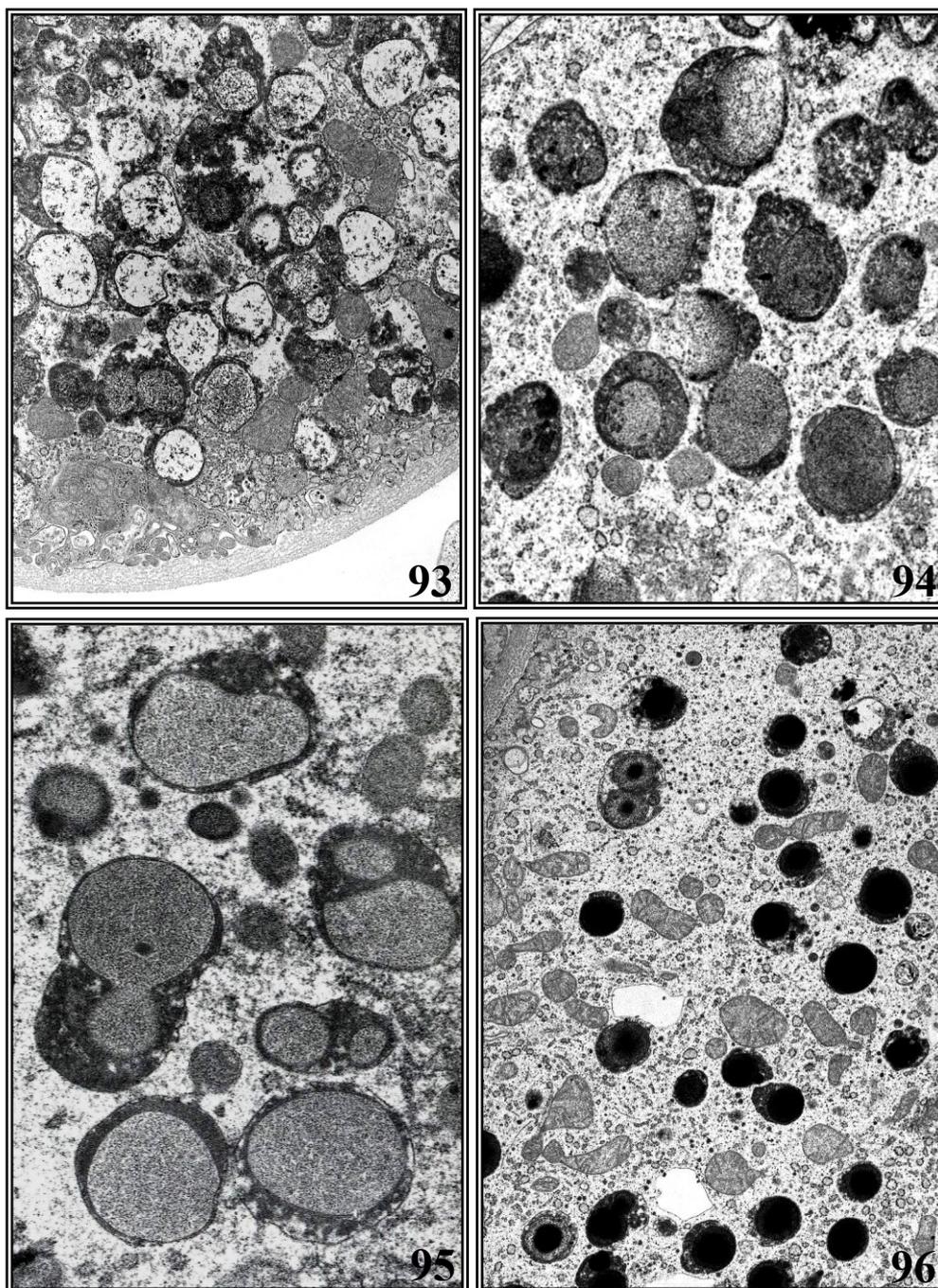
Del tutto particolari sono risultati i quadri relativi all'accumulo del metallo nelle cellule S di *P. laevis*; accanto a vescicole presentanti le caratteristiche sopra descritte sono stati frequentemente osservati accumuli fortemente elettrondensi presenti sia all'interno di alcune cisterne del RER (Fig. 98) sia all'interno della cisterna perinucleare (Fig. 99).

7.3 Indagini immunocitochimiche

7.3.1 Immunolocalizzazione delle metallotioneine

L'incubazione delle sezioni dei tubuli dell'epatopancreas degli individui utilizzati come controllo nell'anticorpo anti-MT ha determinato la comparsa di una debole e sporadica positività che ha interessato per lo più la regione basale di alcune cellule S e parte dei nuclei delle cellule B (Fig. 100).

L'incubazione delle sezioni dei tubuli prelevati dagli individui trattati con le concentrazioni crescenti dei sali dei due metalli ha, invece, fornito delle risposte chiaramente positive anche se differenziate per intensità, in relazione alla concentrazione considerata, e per modalità di espressione in funzione del metallo



Figg. 93-96 - Aspetto dei granuli di accumulo del metallo nelle cellule S dell'epatopancreas di individui trattati con $\text{Pb } 1000 \text{ mg L}^{-1}$. **93.** *Armadillidium granulatum*; il citoplasma è infarcito da numerose vescicole di aspetto eterogeneo e dal contenuto variamente elettrondenso (8.000 x); **94.** *Armadillidium granulatum* (13.000 x). **95.** *Porcellio laevis* (14,000 x). **96.** *Armadillidium vulgare*; le vescicole di accumulo del metallo presentano un aspetto notevolmente ed omogeneamente elettrondenso (6.300 x).

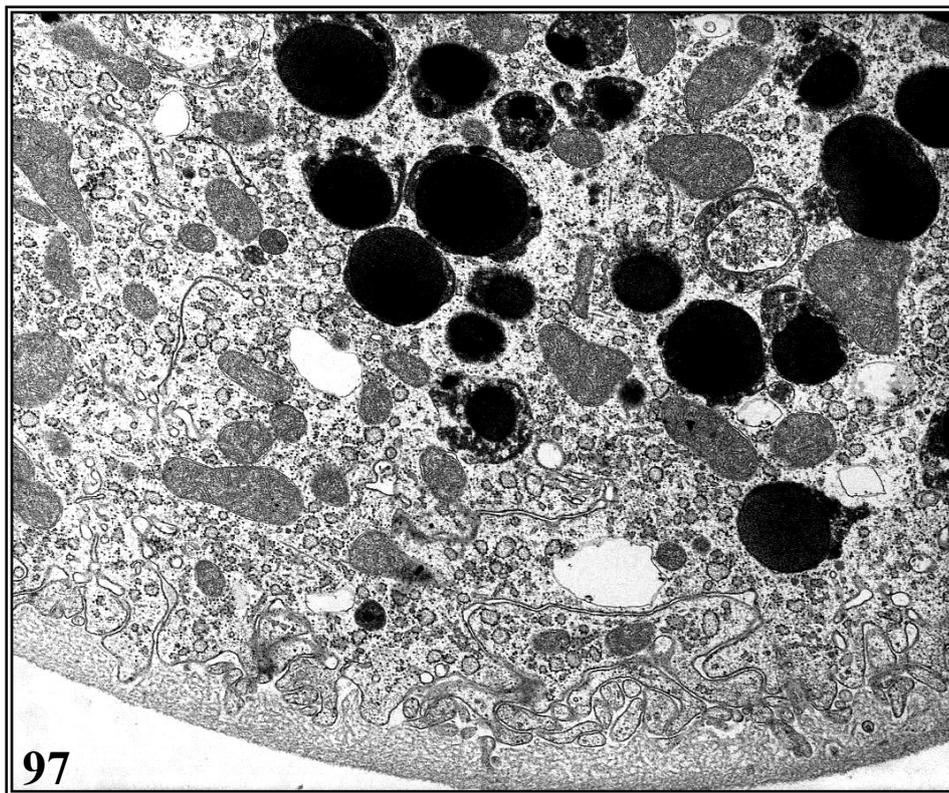
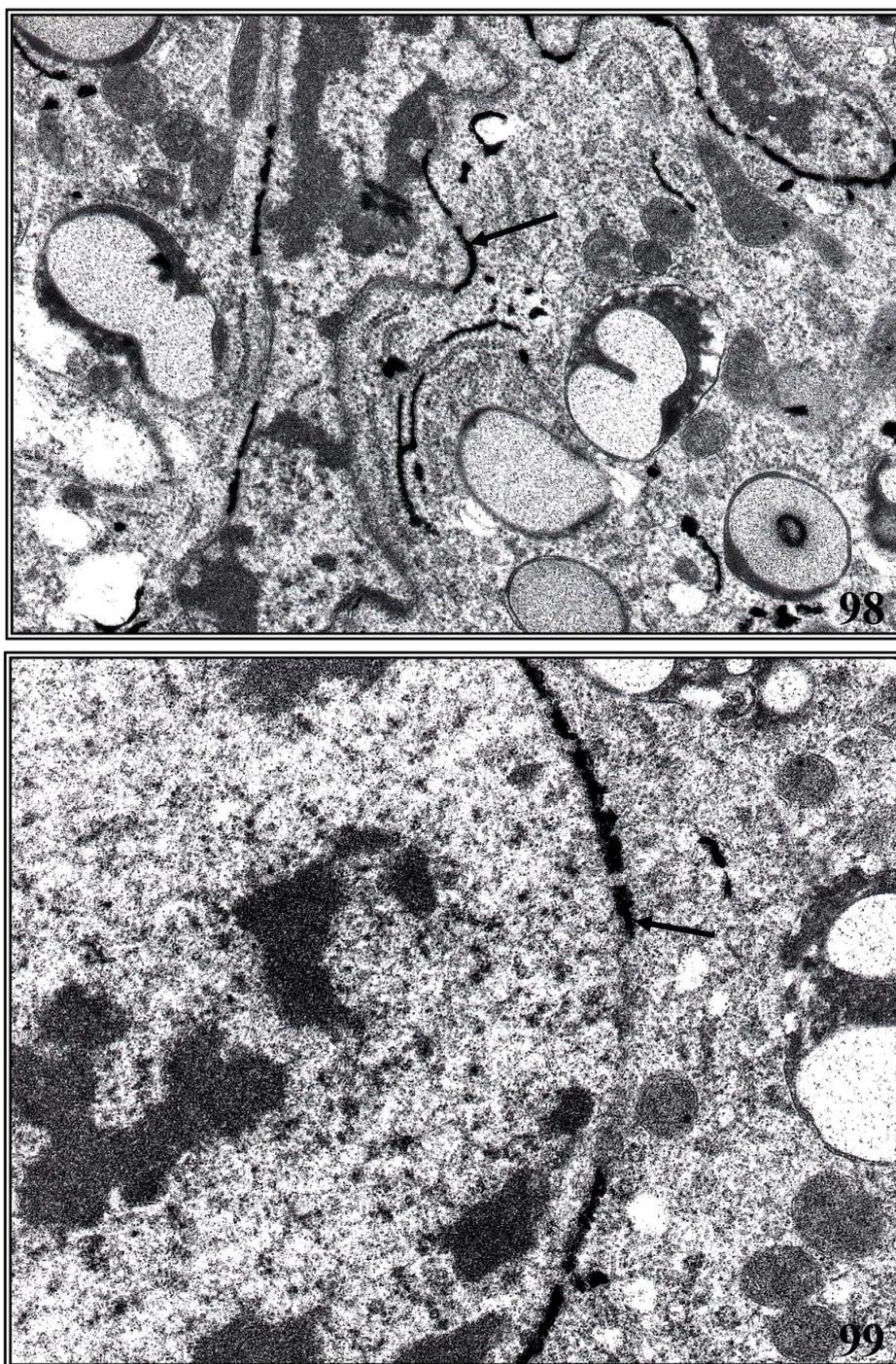
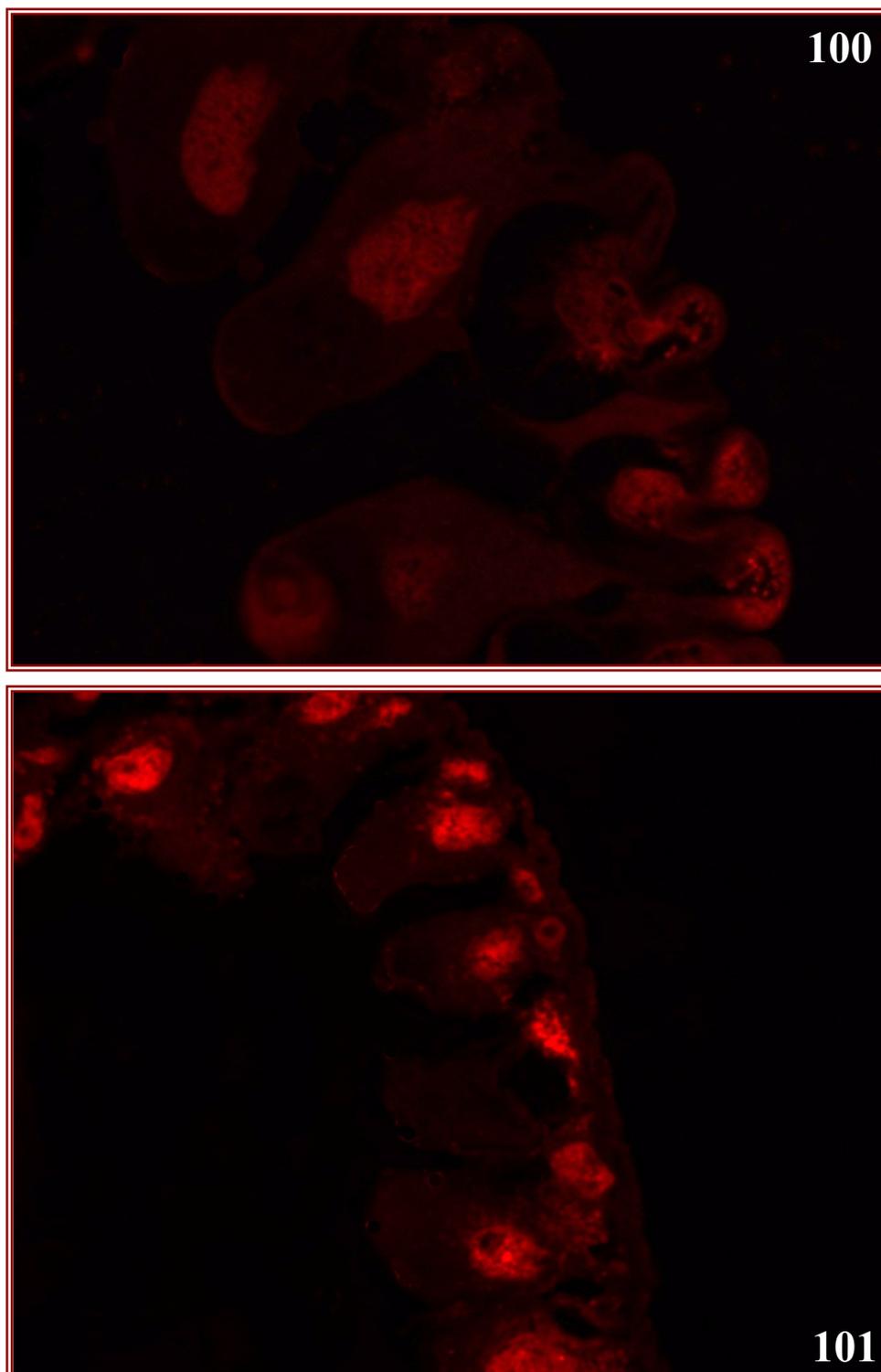


Fig. 97 - Vescicole di accumulo del metallo dal contenuto fortemente elettrondenso in cellula S dell'epatopancreas di *Armadillidium vulgare* trattato con Pb 1.000 mg L⁻¹ (8.000 x).



Figg. 98-99 - Cellule S dell'epatopancreas di individui di *Porcellio laevis* trattati con Pb 1.000 mg L⁻¹. Depositi di materiale elettron-denso sono presenti all'interno delle cisterne del RER (**freccia**) (98. 9.800 x) e della cisterna perinucleare (**freccia**) (99. 18.000 x).



Figg. 100-101 - Immunolocalizzazione di MT nelle sezioni dei tubuli dell'epatopancareas, dopo incubazione in anticorpo TRIT-coniugato. **100.** *Armadillidium granulatum*; individuo non trattato, si osserva una debole e sporadica positività nella regione basale delle cellule S ed a livello dei nuclei delle cellule B (400 x). **101.** *Armadillidium vulgare*; si apprezza la risposta positiva in gran parte del citoplasma delle cellule S (Cd 100 mg L⁻¹, 400 x).

saggiato. Nessuna differenza significativa è stata, invece, riscontrata tra le tre diverse specie oggetto di valutazione, se non riguardo l'intensità della marcatura.

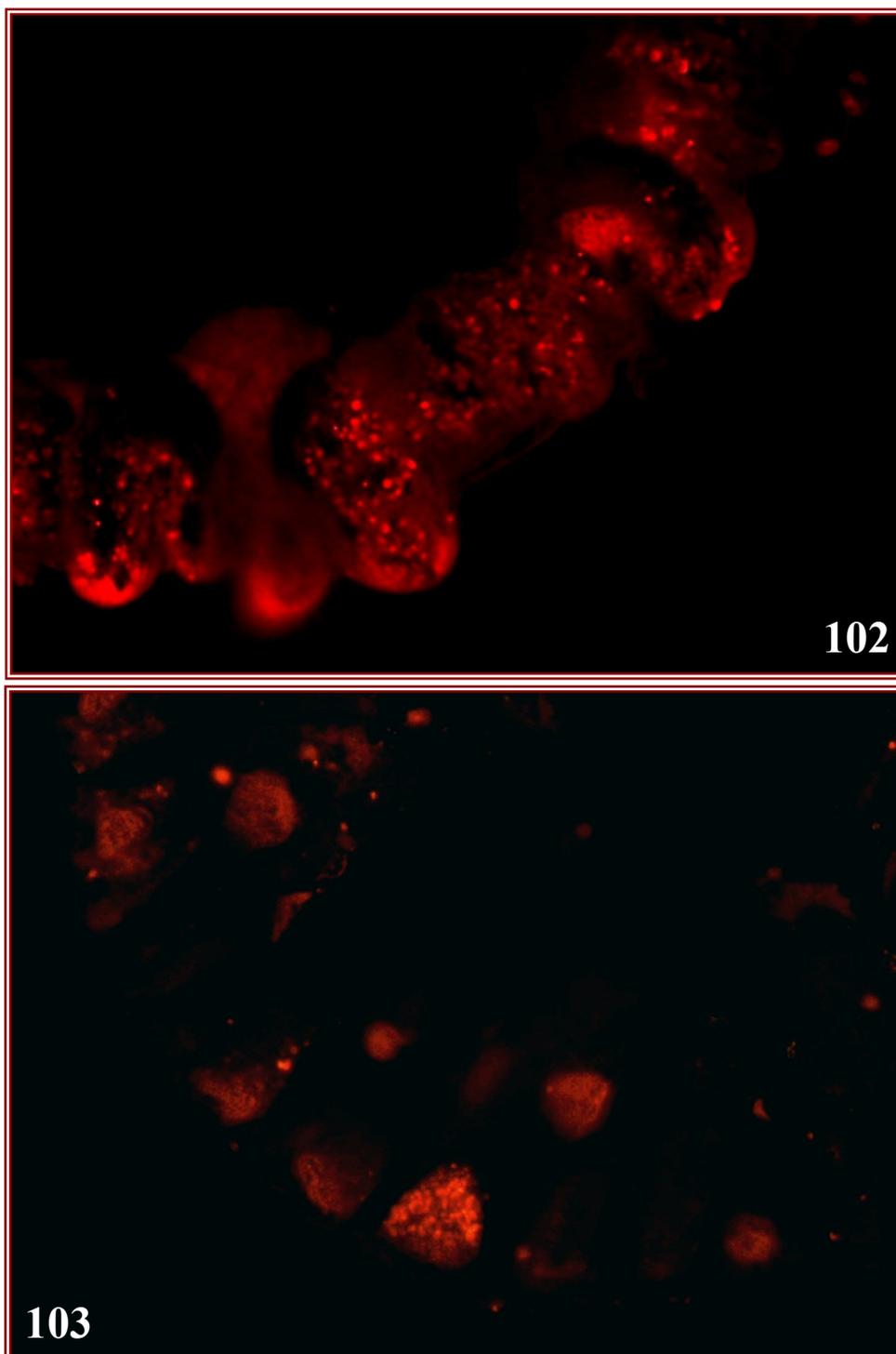
Negli individui trattati con i sali di Cd, la localizzazione delle MT ha interessato quasi esclusivamente il citoplasma delle cellule S, anche se in modo notevolmente variabile da cellula a cellula; tale positività si è manifestata sotto forma di una granulazione estesa a larga parte del citoplasma delle cellule S (Fig. 101), positività che è apparsa particolarmente intensa negli individui di *P. laevis* trattati con la concentrazione Cd 50 mg L⁻¹ (Fig. 102) e molto meno apprezzabile in quelli di *A. granulatum*, anche quando trattati con la più elevata concentrazione del metallo (Fig. 103).

Una risposta positiva, anche se espressa con intensità variabile, conseguente all'incubazione nell'anticorpo, è stata osservata a carico del nucleo di un certo numero di cellule B e, più raramente, anche del nucleo delle cellule S (Figg. 101, 103). Inoltre, sempre a carico di alcune cellule B, è stata evidenziata una debole e discontinua positività anche in corrispondenza della loro superficie apicale (Fig. 101).

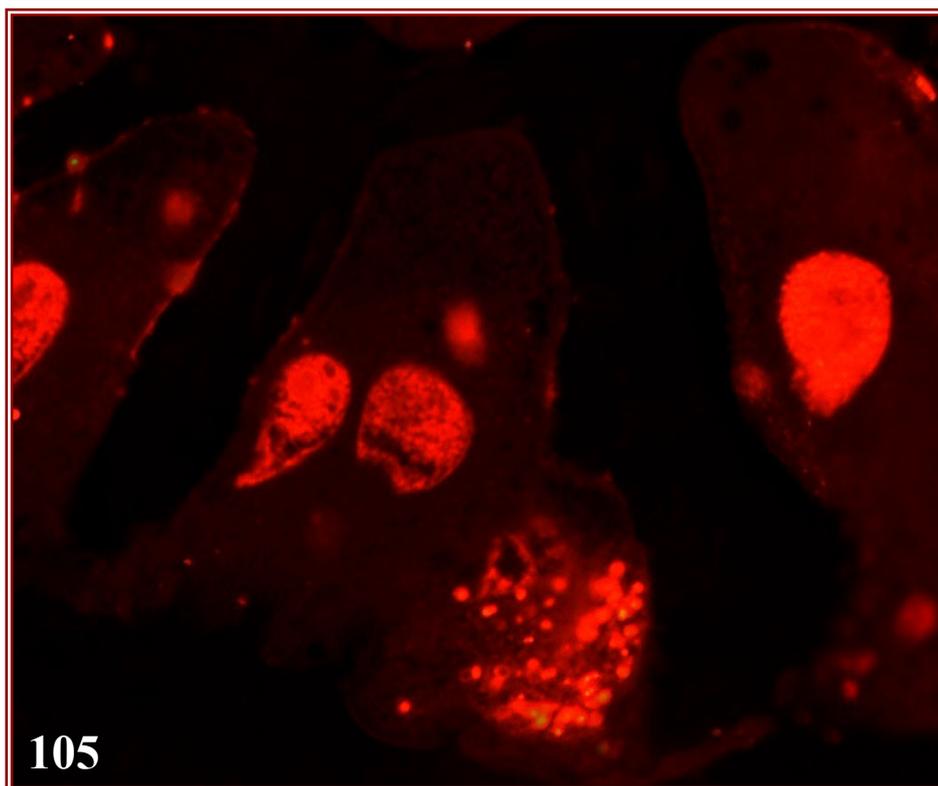
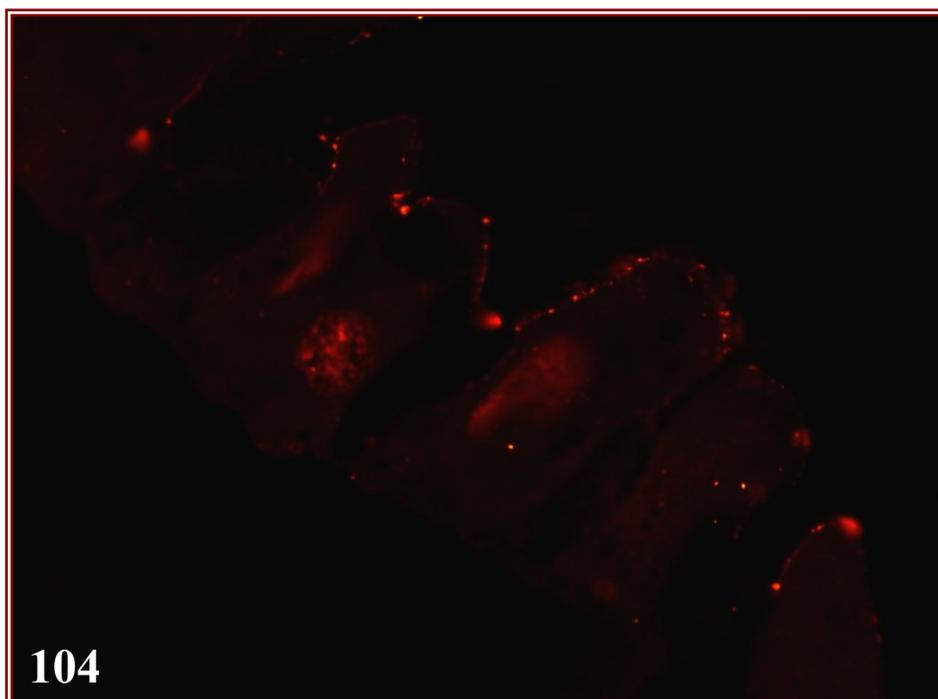
Nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra le diverse regioni dei tubuli dell'epatopancreas.

Negli individui trattati con le diverse concentrazioni del sale di Pb, le risposte riscontrate dopo incubazione nell'anticorpo anti-MT sono risultate, invece, significativamente differenti per localizzazione ed intensità rispetto a quelle osservate negli individui esposti al Cd. Infatti, la positività all'anticorpo anti-MT è risultata quasi sempre esclusivamente localizzata in corrispondenza dell'apice cellulare delle cellule B sotto forma di una serie più o meno continua di piccole granulazioni (Fig. 104). Così come per il Cd, anche in questo caso una larga parte dei nuclei delle cellule B e, più sporadicamente, di alcune cellule S ha manifestato una risposta di variabile intensità (Fig. 104).

Non è, invece, stata osservata una risposta positiva da parte del citoplasma delle cellule S, se non in casi del tutto sporadici ed a carico degli individui di *A. vulgare* trattati con la concentrazione più elevata del metallo, dove sono stati osservati addensamenti di strutture granulari simili a quelle osservate nelle cellule S degli individui esposti al Cd (Fig. 105).



Figg. 102-103 - Immunolocalizzazione di MT nelle sezioni dei tubuli dell'epatopancreas, dopo incubazione in anticorpo TRIT-coniugato. **102.** *Porcellio laevis*; si osserva un'intensa positività nel citoplasma delle cellule S ($\text{Cd } 50 \text{ mg L}^{-1}$, 400 X). **103.** Le cellule S dei tubuli di *Armadillidium granulatum* manifestano, invece, una positività ridotta ($\text{Cd } 100 \text{ mg L}^{-1}$, 400 x).



Figg. 104-105 - Immunolocalizzazione di MT nelle sezioni dei tubuli dell'epatopancreas di individui trattati con Pb 1.000 mg L^{-1} , dopo incubazione in anticorpo TRIT-coniugato. **104.** *Armadillidium granulatum*; si osserva una positività sotto forma di piccole granulazioni più o meno continue a carico dell'apice cellulare di alcune cellule B (400 x). **105.** *Armadillidium vulgare*; è evidente una marcata positività nel citoplasma delle cellule S (400 x).

Differentemente da quanto osservato negli individui trattati con il sale di Cd, la risposta fornita dagli individui trattati con il sale di Pb è apparsa più marcata nella regione prossimale dei tubuli.

L'incubazione delle sezioni utilizzate come controllo negativo, omettendo l'impiego dell'anticorpo primario, e come controllo positivo, con preassorbimento dell'antigene corrispondente, ha confermato la validità dei risultati ottenuti.

7.3.2 Immunolocalizzazione di Hsp70

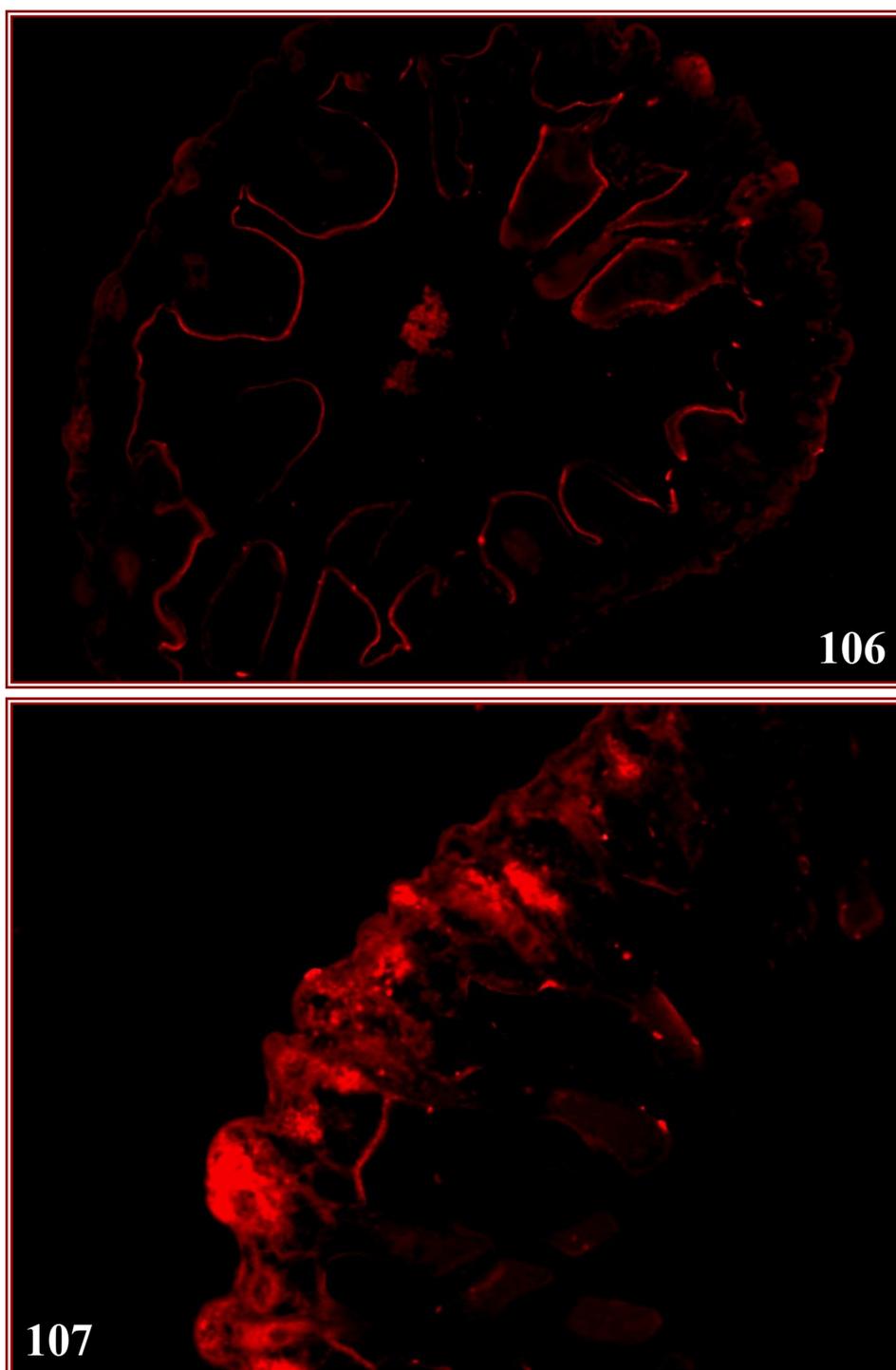
Nelle sezioni dei tubuli dell'epatopancreas, prelevati dagli individui utilizzati come controllo, l'incubazione nell'anticorpo anti-Hsp70 ha prodotto una risposta moderatamente positiva rilevabile soprattutto in corrispondenza della regione apicale delle cellule B ed, in misura più modesta, di alcune cellule S (Fig. 106).

La risposta all'incubazione nell'anticorpo fornita dalle sezioni provenienti dagli individui trattati con le diverse concentrazioni dei due metalli ha fornito, invece, delle risposte chiaramente positive ma differenziate in funzione del tipo di metallo saggiato, della concentrazione utilizzata e della specie oggetto di indagine.

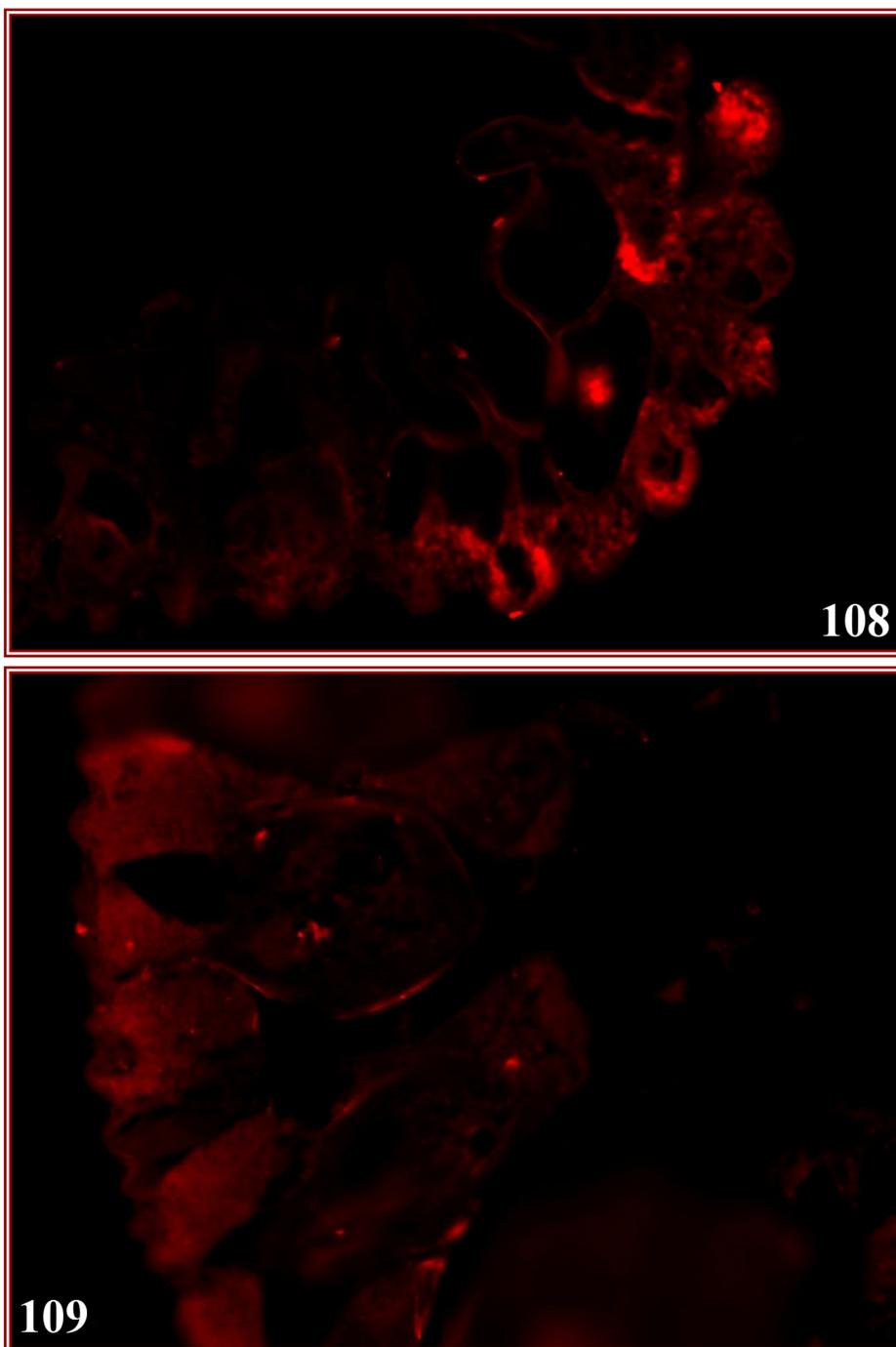
Per ciò che concerne il Cd, l'impiego della concentrazione meno elevata del metallo, non ha determinato una risposta chiaramente differente da quella evidenziata negli individui controllo. Negli individui trattati con le concentrazioni più elevate, invece, è stata sempre osservata, per tutte e tre le specie indagate, una moderata attenuazione della positività della superficie cellulare mentre ben più evidente è stata la risposta a livello del citoplasma delle cellule S, sotto forma di una fitta granulazione (Figg. 107, 108, 109).

L'espressione più consistente delle Hsp70 è stata riscontrata negli individui di *P. laevis* esposti alla concentrazione Cd 50 mg L⁻¹ ed in quelli di *A. vulgare* esposti alla concentrazione Cd 100 mg L⁻¹.

Negli individui trattati con le diverse concentrazioni del sale di Pb, le risposte riscontrate dopo incubazione nell'anticorpo anti-Hsp70 sono risultate, invece, significativamente differenti per localizzazione ed intensità rispetto a quelle osservate negli individui esposti al Cd. Anche per tale metallo, la positività all'anticorpo anti-Hsp70 delle sezioni dei tubuli degli individui trattati con le



Figg. 106-107 - Immunolocalizzazione di Hsp70 nelle sezioni dei tubuli dell'epatopancreas, dopo incubazione in anticorpo TRIT-coniugato. **106.** *Armadillidium granulatum* individuo non trattato; si osserva una risposta moderatamente positiva a livello della regione apicale delle cellule B e, più modesta, in alcune cellule S (200 x). **107.** *Porcellio laevis*; è evidente una risposta fortemente positiva a livello del citoplasma delle cellule S e più attenuata a livello della superficie cellulare (Cd 50 mg L⁻¹, 400 x).



Figg. 108-109 - Immunolocalizzazione di Hsp70 nelle sezioni dei tubuli dell'epatopancreas di individui trattati con Cd 100 mg L⁻¹, dopo incubazione in anticorpo TRIT-coniugato. Si osserva un'evidente risposta del citoplasma delle cellule S sottoforma di una fitta granulazione ed una moderata positività a livello della superficie cellulare (**108.** *Armadillidium vulgare*, 400 x; **109.** *Armadillidium granulatum*, 400 x).

concentrazioni più modeste è risultata appena più marcata rispetto al quadro evidenziato nei tubuli degli individui non trattati. Dopo contaminazione con la concentrazione più elevata - Pb 500 mg L⁻¹ - la positività della superficie cellulare appare apprezzabilmente intensificata e può essere, inoltre, osservata anche una moderata risposta da parte dei nuclei, in particolare di quelli delle cellule B (Fig. 110). Nelle sezioni dei tubuli degli individui contaminati con la dose più elevata del metallo si è manifestata, inoltre, una chiara risposta positiva a carico del citoplasma di numerose cellule S (Fig. 111), ancora ben più evidente nelle sezioni dei tubuli degli individui di *A. vulgare* (Fig. 112).

L'incubazione delle sezioni utilizzate come controllo negativo, omettendo l'impiego dell'anticorpo primario, e come controllo positivo, con preassorbimento dell'antigene corrispondente, ha confermato la validità dei risultati ottenuti.

7.4 Indagini molecolari

L'applicazione delle metodiche di indagine molecolare già utilizzate per altre specie di invertebrati, tra cui anche alcune specie di crostacei decapodi, ha posto una serie di problemi che ha indotto a mettere in atto diversi approcci sperimentali che, tuttavia, non hanno consentito ugualmente il raggiungimento degli obiettivi preposti.

Infatti, l'RNA totale estratto utilizzando il classico protocollo messo a punto da Chomczynski e Sacchi (1987) è risultato, alla visualizzazione su gel, chiaramente degradato ed inoltre, non presentava alla lettura al Nanodrop, un picco di assorbanza ben definito a 260 nm. La sua concentrazione è apparsa inoltre piuttosto bassa, nell'ordine di 0,1 µg/µl.

La seconda prova ha prodotto un RNA mostrante un picco di assorbanza a diverse lunghezze d'onda ed in particolare un picco molto alto a 230 nm, indicando così una possibile contaminazione fenolica. La resa, inoltre, è risultata ancora una volta molto bassa.

Cambiando metodo di omogeneizzazione, con la terza prova, la concentrazione di RNA è stata, finalmente sufficientemente adeguata, nell'ordine di 6 µg/µl; anche la curva di assorbanza al Nanodrop è risultata migliore anche se con un picco non esattamente corrispondente a 260 nm ma, bensì, a 265 nm. E' stata sempre

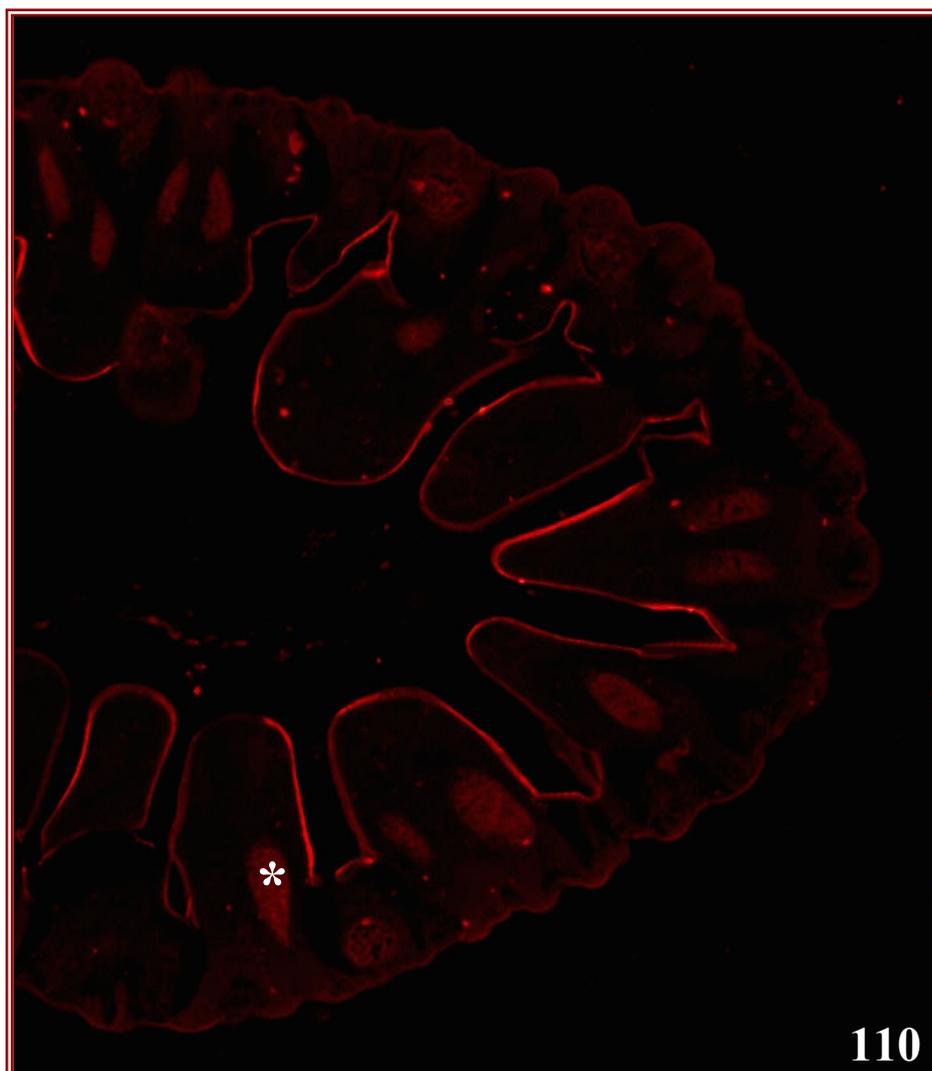
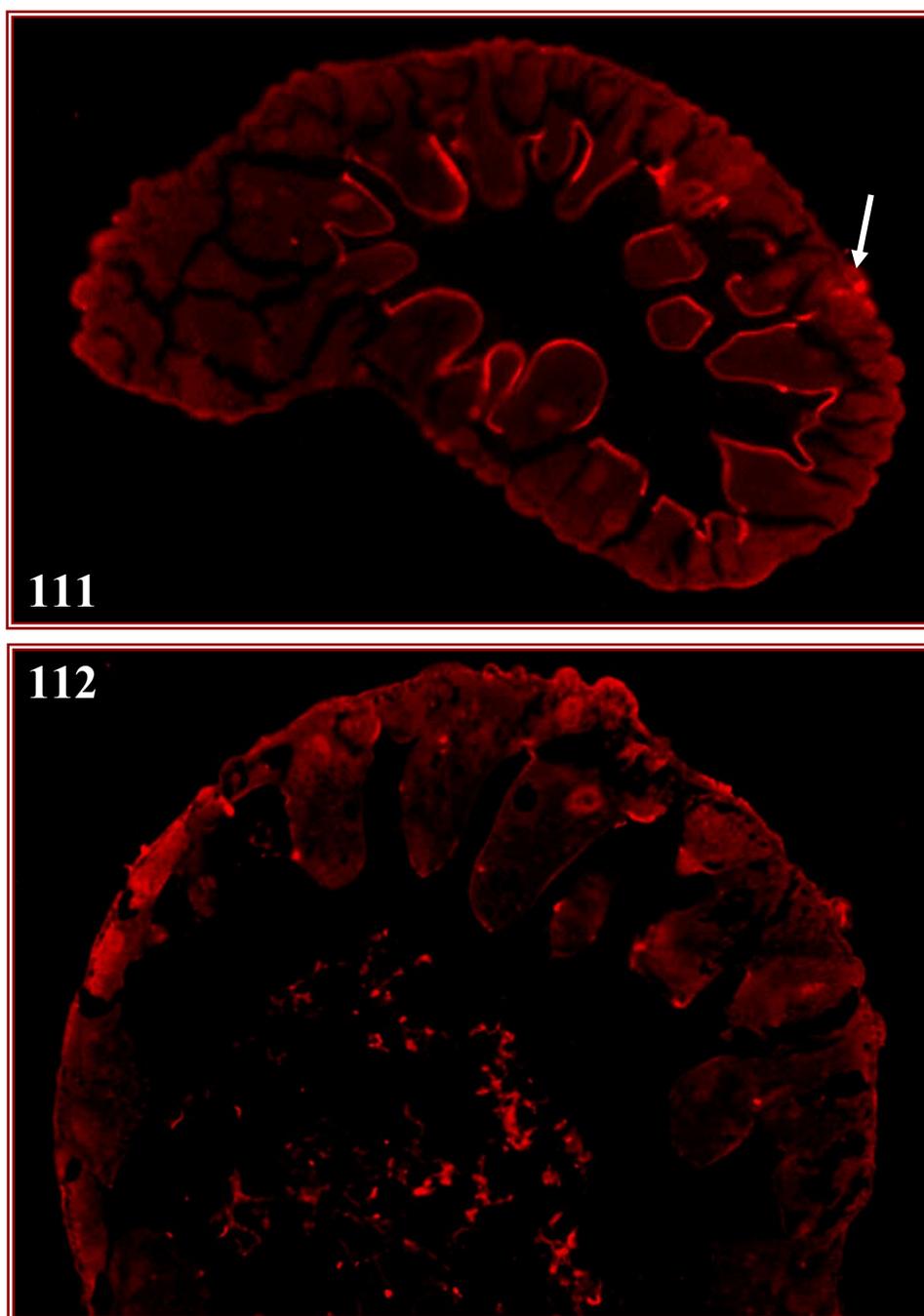


Fig. 110 - Immunolocalizzazione di Hsp70 nelle sezioni dei tubuli dell'epatopancreas di individuo di *Porcellio laevis* trattato con Pb 500 mg L⁻¹. Si osserva un'intensa e ben apprezzabile positività della superficie cellulare ed una moderata risposta a livello dei nuclei, in particolare delle cellule B (*) (200 x).



Figg. 111-112 - Immunolocalizzazione di Hsp70 nelle sezioni dei tubuli dell'epatopancreas di individui trattati con Pb 1.000 mg L^{-1} , dopo incubazione in anticorpo TRIT-coniugato. **111.** *Armadillidium granulatum*; evidente positività a livello del citoplasma delle cellule S (**freccia**) (100 x). **112.** *Armadillidium vulgare*; positività, ancora più marcata, sempre a carico del citoplasma delle cellule S (200 x).

osservata, inoltre, la presenza di un secondo picco a 230 nm, indicando che, seppure il problema della resa era stato risolto, rimaneva sempre il problema di una possibile contaminazione fenolica.

L'estrazione dal pool di epatopancreas, attuata con una quarta prova, ha prodotto un RNA altamente concentrato che, però, ha continuato ad esibire un picco d'assorbanza non perfettamente corrispondente a 260 nm. Essendo ancora presente un alto picco a 230 nm, si è ritenuto opportuno applicare un protocollo di purificazione di RNA come descritto in materiali e metodi ma, inespugnabilmente, la lettura allo spettrofotometro è sempre risultata identica alla precedente, conseguentemente ad una persistente contaminazione da solventi organici.

Il cambiamento del metodo di omogeneizzazione del pool di epatopancreas, basato sull'impiego del TISSUELYSER (Qiagen) e la variazione del protocollo originale di estrazione (vedi sezione materiali e metodi) ha consentito di ottenere una buona resa di RNA che, ancora una volta, tuttavia, è risultato contaminato da solventi organici.

Per ciascuna prova di estrazione, è stato sintetizzato il cDNA e quest'ultimo è stato utilizzato come templatato nel programma di PCR. Come era facilmente ipotizzabile, a causa della qualità non ottimale dell'RNA estratto, tale cDNA non ha mai consentito l'amplificazione delle sequenze di nostro interesse e pertanto tale aspetto della ricerca non ha avuto esito positivo.

8. DISCUSSIONE

I risultati delle indagini, oggetto della presente tesi di Dottorato, hanno confermato che gli isopodi oniscidei rappresentano un prezioso modello biologico da utilizzare nel monitoraggio dell'inquinamento da metalli pesanti, per la loro elevata capacità di bioaccumulo e per la capacità di fornire adeguate risposte biologiche (biomarkers) in condizioni di contaminazione ambientale.

Le analisi condotte mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) hanno dimostrato che il bioaccumulo dei metalli si esprime in maniera dose dipendente ed a livelli notevolmente diversificati in relazione al metallo ed alla specie saggiata.

Infatti, la quantità di Cd riscontrata negli individui di tutte e tre le specie studiate è risultata sempre significativamente più elevata rispetto a quella delle foglie di castagno trattate con le diverse concentrazioni dei sali del metallo utilizzate come cibo; livelli particolarmente elevati del contenuto in Cd hanno caratterizzato, in particolare, gli individui di *P. laevis*, per i quali la contaminazione con la concentrazione più elevata del metallo ha determinato la morte di tutti gli esemplari trattati.

La risposta alla contaminazione da Pb, in termini di bioaccumulo, si è rivelata, al contrario, ben più modesta da parte di tutte e tre le specie indagate e per tutte le concentrazioni del metallo utilizzate anche se, come per il Cd, è apparsa specie-specifica; *P. laevis* ha rappresentato la specie caratterizzata dal più modesto livello di bioaccumulo del metallo, mentre *A. vulgare* ha espresso la più spiccata capacità di accumulare Pb, soprattutto alla concentrazione più elevata tra quelle saggiate.

Alcune considerazioni interessanti riguardano la quantità dei metalli (espressa in $\mu\text{g/g}$ di peso secco) riscontrata negli animali trattati con le diverse concentrazioni utilizzate per la contaminazione del cibo; i valori ottenuti con la presente indagine risultano compresi, per quanto riguarda il Cd, tra circa 18 e 40 $\mu\text{g/g}$ di peso secco per la concentrazione più bassa impiegata e tra 130 e 230 $\mu\text{g/g}$ di peso secco per quelle più elevate; valori significativamente più bassi, come già accennato, sono stati riscontrati per il Pb, compresi tra 2,5 e 4,0 $\mu\text{g/g}$ di peso secco per la concentrazione più bassa somministrata e tra 28 e 54 $\mu\text{g/g}$ di peso secco per quella più elevata. Tali

valori sono in accordo con quelli riportati da Hopkin et al. (1986) per gli individui di *Porcellio scaber* provenienti da siti fortemente contaminati, localizzati in prossimità di aree minerarie dismesse nel sud-est dell'Inghilterra. Sono, invece, completamente in disaccordo con quelli riportati, sempre per *P. scaber*, da Köhler et al. (1996) che in un'indagine sperimentale, basata sul metodo di contaminazione del cibo e sull'impiego di concentrazioni dei metalli pari a quelle utilizzate nella presente ricerca, hanno riscontrato livelli del contenuto in cadmio compresi tra circa 100 e 200 µg/g di peso secco e addirittura tra 75 e oltre 250 µg/g di peso secco per quanto riguarda il piombo. Ancora più considerevole appare il divario tra i valori relativi al contenuto in metalli delle foglie trattate con le diverse concentrazioni dei sali da parte di Köhler et al. e nella presente ricerca; a fronte di valori del contenuto in Cd compresi, per le diverse concentrazioni del metallo utilizzate, tra 9 e 90 µg/g di peso secco, e del contenuto in Pb, compresi tra 87 e oltre 900 µg/g di peso secco, riscontrati nella presente indagine, Köhler et al., invece, hanno riportato valori ben più elevati, rispettivamente compresi tra 57 e 418 µg/g di peso secco per il Cd e tra 517 ed, addirittura, oltre 7.000 µg/g di peso secco per il contenuto in Pb.

In conclusione alla luce dei risultati ottenuti, *A. vulgare* appare un ottimo candidato quale bioindicatore e bioaccumulatore dell'inquinamento da piombo mentre *P. laevis* potrebbe rappresentare, tra le specie saggiate, quella più idonea nel monitoraggio dell'inquinamento da cadmio, ma soltanto nei casi in cui la presenza di tale metallo non raggiunga livelli letali per tale specie.

Le indagini condotte a livello morfologico, istologico ed ultrastrutturale dell'epatopancreas degli individui sottoposti per 21 giorni al regime alimentare con cibo non contaminato o contaminato con le diverse concentrazioni di cadmio e piombo, hanno dimostrato che negli individui non trattati la generale morfologia e l'organizzazione ultrastrutturale dell'epatopancreas ripropongono le caratteristiche già note in letteratura per altre specie di isopodi oniscidei (Alikhan, 1971; Clifford e Witkus, 1971; Storch, 1982, 1984; Storch e Štrus, 1989; Wagele, 1992) mentre, negli individui trattati sono stati evidenziati quadri di alterazioni chiaramente correlati alla concentrazione del metallo utilizzata, in larga parte del tutto sovrapponibili, per ciascuno dei metalli saggiati, nelle tre specie di oniscidei studiate.

La contaminazione con le concentrazioni più basse dei due metalli non ha prodotto, se non in misura molto limitata, effetti sulla generale morfologia dei tubuli dell'epatopancreas né, tanto meno, apprezzabili alterazioni della struttura istologica dei tubuli stessi. La somministrazione delle concentrazioni più elevate ha, invece, determinato un'alterazione della morfologia dei tubuli, in misura dose-dipendente ed in modo quasi del tutto sovrapponibile per i due diversi metalli saggiati.

Le alterazioni morfologiche più ricorrenti, evidenziate al microscopio elettronico a scansione, hanno riguardato una variazione dell'andamento delle spirali dei tubuli che risulta del tutto irregolare, un'alterazione della morfologia delle diverse spire che assumono un aspetto estremamente irregolare dando luogo, spesso, alla formazione di protrusioni sporgenti notevolmente dalla superficie dei tubuli. Anche la regione basale delle cellule, che nei tubuli degli individui non trattati, sporge moderatamente alla superficie dei tubuli, in quelli degli individui trattati con le concentrazioni più elevate dei metalli, protrude in modo sensibilmente più apprezzabile.

Tali alterazioni sono chiaramente apprezzabili anche nelle sezioni istologiche dove, sempre a carico degli individui trattati con le concentrazioni più elevate dei metalli, è possibile osservare una pronunciata irregolarità del profilo dei tubuli associata ad una diminuzione del loro diametro ed, inoltre, quadri di alterazione dell'aspetto dell'epitelio dell'organo che riguardano, soprattutto, segni di crescente disorganizzazione sotto forma di progressiva condensazione del citoplasma di alcune cellule e di vacuolizzazione più o meno estesa di aree citoplasmatiche di altre cellule; particolarmente evidente diventa nelle cellule S il progressivo accumulo di granulazioni dense, quasi certamente riconducibili ai granuli di accumulo dei metalli di origine lisosomiale già descritti da Hopkin (1989) in *P. scaber*.

Anche a livello ultrastrutturale le alterazioni citologiche, conseguenti alla somministrazione della concentrazione più bassa dei sali di cadmio e piombo, sono state evidenziate solo occasionalmente ed hanno riguardato un numero ridotto di entrambi i tipi di cellule epiteliali presenti nella parete dei tubuli, mentre dopo contaminazione con le più elevate concentrazioni dei metalli i quadri di alterazione citologica sono apparsi progressivamente più evidenti o, addirittura, drammatici e largamente indipendenti dal tipo di metallo somministrato.

Gli aspetti più significativi hanno riguardato:

➤ La progressiva disorganizzazione dell'orletto microvillare che rappresenta, indubbiamente, il primo bersaglio dell'azione esercitata da entrambi i metalli; bassi livelli di contaminazione si traducono soltanto in un moderato diradamento dei microvilli che appaiono più corti e leggermente deformati nel loro profilo; concentrazioni più elevate dei metalli determinano una loro progressiva alterazione sotto forma, dapprima, di una loro vescicolazione e, successivamente di una totale loro disorganizzazione e scomparsa che coinvolge anche il citoscheletro sottostante. Questi quadri appaiono sovrapponibili a quelli già precedentemente descritti da Storch e Lehnert-Moritz (1980) per l'epatopancreas degli individui di *Ligia oceanica* sottoposti a un prolungato digiuno ed hanno un'ovvia ricaduta sulla capacità di assorbimento dei nutrienti messa in atto dall'epatopancreas, quale importante organo metabolico di tali animali (Clifford e Witkus, 1971).

Preliminari osservazioni condotte sugli effetti della contaminazione da mercurio in *Ligia italica* (Longo et al., comunicazione personale), che produce un effetto distruttivo sul rivestimento microvillare delle cellule dell'epatopancreas, hanno evidenziato una forte riduzione del peso corporeo degli individui, determinato, anche in questo caso, da una compromessa capacità di assorbimento delle sostanze nutritive.

➤ Una marcata riduzione del labirinto formato dalla membrana plasmatica in sede basale, labirinto ben sviluppato nelle cellule degli individui non trattati; tale alterazione ha riguardato solo una parte delle cellule epiteliali, in particolare delle cellule B, e solo degli individui trattati con le più elevate concentrazioni di Cd e Pb; il dato risulta essere difforme rispetto a quanto osservato da Köhler et al. (1996) che, in *P. scaber*, non hanno mai riscontrato una modificazione significativa del labirinto basale, neanche dopo impiego delle concentrazioni più elevate dei metalli saggiati.

➤ La condensazione di aree più o meno estese del citoplasma, alterazione più frequente a carico delle cellule B che nella loro regione superficiale appaiono spesso notevolmente impoverite nel numero di organuli endocellulari. Secondo Köhler et al. (1996) tale condensazione, evidenziata anche nell'epatopancreas di *P. scaber*, sarebbe dovuta ad un cambiamento della osmolarità cellulare che determinerebbe un'inadeguata fissazione del citoplasma, effetto osservato anche nei diplopodi

(Köhler e Alberti, 1992). Il problema di una cattiva fissazione dei tubuli dell'epatopancreas degli individui trattati con elevate concentrazioni dei metalli si è frequentemente posto anche nel corso della presente ricerca.

➤ Alterazioni a carico del RER; così come affermato da Smuckler e Arcasoy (1969) e successivamente confermato da Tribskorn e Köhler (1992), tale organulo è caratterizzato da una notevole plasticità e risponde facilmente a diverse modificazioni dell'ambiente cellulare. Il trattamento con le concentrazioni più elevate di Cd ha determinato una risposta differenziata, pur se in misura variabile, da parte delle cellule dell'epitelio dell'organo nelle tre specie saggiate, risposta che si è manifestata sotto forma di una caratteristica disposizione parallela delle cisterne in *A. vulgare*, sotto forma di spire concentriche in *P. laevis* ed in una evidente dilatazione delle cisterne in *A. granulatum*. Aspetti sovrapponibili a quelli sopra descritti sono stati osservati anche da Köhler et al. (1996) in *P. scaber* ed appaiono largamente sovrapponibili a quelli riferiti da Storch (1982) per gli individui di altre specie di oniscidei sottoposti a prolungato digiuno.

➤ Alterazioni a carico dei mitocondri; sono state osservate per lo più negli individui trattati con le concentrazioni più elevate dei metalli: nelle cellule B si sono sempre manifestate sotto forma di un loro rilevante rigonfiamento accompagnato da una riduzione considerevole, in alcuni casi pressoché totale, delle loro creste. Nelle cellule S, invece, gli effetti più significativi del bioaccumulo dei metalli a carico dei mitocondri si sono manifestate quasi sempre soltanto negli individui trattati con le più elevate concentrazioni di piombo e con aspetti del tutto contrapposti; i mitocondri, infatti, sono andati incontro a spiccati fenomeni di condensazione ed all'acquisizione di una morfologia profondamente irregolare che li ha condotti ad assumere in molti casi un aspetto filiforme.

➤ Incremento nel numero di vescicole a contenuto eterogeneo, verosimilmente riconducibili a lisosomi secondari, corpi lamellari e corpi multivescicolari: questo tipo di alterazione, non necessariamente patologica ma certamente sintomo di uno stato di sofferenza cellulare, potrebbe essere associata con i processi degenerativi osservati a carico della membrana plasmatica e di organelli quali il RER ed i mitocondri conseguenti all'incorporazione di piombo e, soprattutto, di cadmio.

➤ Degradazione delle riserve di lipidi; tale effetto, correlato a quello appena sopra descritto, si manifesta sotto forma di una evidente riduzione nella quantità e nelle dimensioni delle gocce lipidiche presenti nelle cellule B, in particolar modo negli individui sottoposti a contaminazione con le concentrazioni più elevate di cadmio. Spesso, in diverse cellule, alla periferia delle gocce lipidiche è stata osservata la presenza di piccoli ammassi elettrondensi riconducibili secondo Köhler et al. (1996) ad accumuli di lipofuscine. Secondo tali autori, la degradazione del contenuto lipidico delle cellule B rappresenterebbe l'espressione di una mobilitazione delle riserve energetiche in risposta al ridotto assorbimento di nutrienti da parte dell'epitelio dell'organo, conseguente al danno a carico dell'orletto microvillare. Quadri simili sono, infatti, stati riscontrati anche a carico dell'epatopancreas degli individui di *Littorina littorea* (Mollusca, Gasteropoda) sottoposti a contaminazione da cadmio e rappresenterebbero un effetto sub-letale conseguente all'esaurimento delle riserve energetiche dovuto all'azione di tossine ambientali.

➤ La condensazione della cromatina: tale alterazione, appena percettibile solo in alcune cellule B ed S dell'epatopancreas degli individui trattati con le concentrazioni più basse di cadmio e piombo, diventa sempre più consistente in un numero progressivamente crescente di cellule con l'aumentare dell'accumulo dei metalli sino a tradursi in estesi fenomeni di picnosi nucleare; così come ipotizzato da Storch (1982), tale aspetto va interpretato come un sintomo patologico di necrosi cellulare. Infatti, come già evidenziato in numerose specie di isopodi (Storch, 1982, 1984), periodi prolungati di digiuno portano a simili cambiamenti nucleari. Così come osservato nella presente indagine, alcune cellule vanno addirittura incontro a totale disorganizzazione ed il loro contenuto si riversa nel lume sotto forma di vescicolazioni di vario aspetto e dimensioni frammiste ad accumuli di materiale elettrondenso.

La condensazione della cromatina rappresenterebbe, secondo Köhler et al. (1996), uno dei più efficaci elementi di diagnosi della contaminazione da cadmio e piombo, in quanto facilmente osservabile anche a livello di microscopia ottica.

➤ L'aumento nelle cellule S del numero di granuli di accumulo dei metalli che, dopo contaminazione con le concentrazioni più elevate di cadmio e piombo,

diventano talmente numerosi da infarcire pressoché totalmente il corpo cellulare. Tale aspetto, già evidenziato in altre specie di isopodi (Hopkin, 1989), deriva dal progressivo accumulo di materiale elettrondenso all'interno di vescicole membranose.

L'aspetto dei granuli varia nelle diverse cellule S; in alcune cellule contengono un materiale elettrondenso perifericamente e finemente granulare e più o meno abbondante al loro interno; in altre cellule i granuli appaiono, invece, totalmente ripieni di materiale fortemente elettrondenso. Il primo aspetto corrisponderebbe ai granuli di tipo B/A, il secondo corrisponderebbe, invece, ai granuli di tipo B descritti da Hopkin (1990).

Questo tipo di granuli non è esclusivo degli isopodi ma è stato riscontrato anche in tessuti ed organi diversi di lombrichi, acari, insetti, ragni e gasteropodi (Hopkin, 1989; Dallinger, 1993). La presenza di tali granuli non è legata soltanto all'accumulo di metalli pesanti ma è normalmente espressa anche negli individui non contaminati dove sono adibiti all'accumulo di metalli quali rame, zinco necessari per le attività fisiologiche dell'organismo; al loro interno sembrerebbero essere presenti numerosi residui di metallotioneine coinvolte nel legame con i metalli e nella neutralizzazione del loro effetto tossico (Jeantet et al., 1980; Morgan e Morris, 1982; Hopkin e Martin, 1984). Secondo Dallinger (1993) tali granuli sarebbero di probabile origine lisosomiale, come suggerito dalla presenza al loro interno di fosfatasi acida. Il loro significato, in quanto sede di accumulo dei metalli, sarebbe identificabile in un'efficiente via di detossificazione, ben più efficace rispetto al trasporto attivo e conseguente escrezione per via fecale (Simkiss, 1976, 1977).

Nella loro indagine ultrastrutturale sugli effetti della contaminazione da cadmio, piombo e zinco dell'epatopancreas di *P. scaber*, Köhler et al. (1996) hanno descritto anche la presenza di precipitati di materiale elettrondenso a livello delle membrane intracellulari, effetto considerato dai suddetti autori come un probabile artefatto legato ai processi di fissazione. Nella presente indagine, una cospicua presenza di materiale elettrondenso all'interno delle cisterne del RER e della cisterna perinucleare è stata osservata solo nelle cellule S degli individui di *P. laevis* trattati con le concentrazioni più elevate di piombo; nessun precipitato elettrondenso è stato mai riscontrato nell'epatopancreas delle due specie del genere *Armadillidium*. Tale

aspetto ci induce a ritenere che la presenza di tali precipitati intramembranosi, esclusivamente evidenziati nelle cellule delle specie del genere *Porcellio*, non debba rappresentare un artefatto, come ritenuto da Köhler et al. (1996), ma una peculiare e specifica modalità di accumulo di tale metallo.

A conclusione della loro indagine, Köhler et al. (1996) sostengono che le alterazioni ultrastrutturali evidenziate a carico dell'epitelio dell'epatopancreas potrebbero essere utilizzate come biomarkers per la valutazione dell'esposizione sub cronica ai metalli pesanti presenti nell'ambiente. Poiché come più volte ricordato nella presente tesi, così come del resto anche nel lavoro degli stessi Köhler et al., molte di tali alterazioni ultrastrutturali caratterizzano anche l'epatopancreas degli oniscidei sottoposti a prolungato digiuno, il loro impiego quali biomarkers della contaminazione ambientale da metalli pesanti può essere validato solo da una conferma analitica della presenza di tali metalli nell'epatopancreas degli animali.

Come è da tempo ben noto, gli effetti tossici derivati dal bioaccumulo di metalli pesanti vengono in parte neutralizzati in tutti gli organismi viventi mediante la messa in atto di strategie di detossificazione che nelle piante appaiono estremamente diversificate ma che, in larga misura si basano sul legame dei metalli con proteine appositamente espresse in loro risposta che ne attuano la neutralizzazione, generalmente attraverso un meccanismo di chelazione, quali fitochelatine (PC) e/o metallotioneine (MT) (Hall, 2002). Negli animali, la detossificazione dai metalli pesanti si basa quasi esclusivamente sull'espressione di metallotioneine o proteine metallotioneine simili. Recentemente, è stato però dimostrato che geni simili a quelli presenti nei vegetali, capaci di esprimere PC sintasi, sono stati ritrovati anche in *Caenorhabditis elegans* ed in *Dictyostelium discoideum* (Cobbett e Goldsbrough, 2002), scoperta che ha aperto così la strada verso una revisione delle conoscenze relative alle strategie di detossificazione messe in atto dagli animali.

Il ruolo originario delle MT, presenti in organismi appartenenti a quasi tutti i vari phyla animali (Kojima e Hunziker, 1991), è stato da sempre ritenuto quello di interagire con i cosiddetti metalli traccia, quali rame e zinco, necessari per le numerose attività fisiologiche dell'organismo; il rilascio nell'ambiente di metalli tossici naturalmente presenti o conseguente alle attività antropiche ha indotto le

cellule degli organismi soggetti a tale contaminazione ad utilizzare le metallotioneine come meccanismo di difesa nei confronti dei metalli pesanti.

Per quanto riguarda i crostacei, ben nove differenti forme di MT sono state identificate e sono presenti nel database Swiss-Prot. Tutte le nove MT sono state identificate esclusivamente nei crostacei decapodi (Brouwer et al., 1989, 1991, 1992b; Pedersen et al., 1994; Syring et al., 2000) e nessun'altra sicura informazione a tale riguardo è disponibile per tutti gli altri gruppi di crostacei, compresi quindi gli isopodi (Dallinger e Prosi, 1986; Van Capelleveen, 1987; Donker et al., 1990).

Un altro importante obiettivo della presente tesi è stato, pertanto, quello di cercare di dimostrare che anche negli isopodi oniscidei sono presenti MT e se il bioaccumulo di metalli pesanti si traduce in una loro aumentata espressione.

Un primo approccio metodologico si è basato sull'applicazione, su sezioni istologiche dei tubuli dell'epatopancreas degli animali trattati, di metodiche di immunolocalizzazione basate sull'utilizzazione, rispettivamente, di anti-MT mouse monoclonal primary antibody e di anti-Hsp70 mouse monoclonal primary antibody.

I risultati così ottenuti sembrano meritevoli di interesse; nelle sezioni dei tubuli degli individui non trattati, infatti, la positività all'anticorpo anti-MT è stata moderata e limitata alla regione basale di alcune cellule S ed ai loro nuclei ma, anche, di alcune cellule B a dimostrazione che tali proteine vengono fisiologicamente espresse nelle cellule dell'organo ed a conferma che la loro localizzazione è prevalentemente citoplasmatica (Cherian, 1994) anche se possono trovarsi pure in altri compartimenti cellulari quali, ad esempio, i nuclei di cellule in attiva proliferazione (Cherian, 1994; Ogra e Suzuki, 2000). Nei tubuli degli individui trattati con le diverse concentrazioni dei metalli, invece, la positività all'anticorpo è risultata ben più marcata in maniera correlata alla concentrazione e si è manifestata in modo indipendente dalla specie considerata ma con aspetti profondamente diversi in relazione al metallo saggiato. Così, nei tubuli degli individui trattati con il cadmio, la localizzazione della marcatura ha interessato quasi esclusivamente il citoplasma delle cellule S sotto forma di granulazioni presenti in larga parte del citoplasma, marcatura che è apparsa particolarmente intensa negli individui di *P. laevis* trattati con la concentrazione Cd 50 mg L⁻¹. Una marcatura positiva, anche se espressa con intensità variabile, è stata osservata sporadicamente a carico del nucleo delle cellule S e più frequentemente ha

riguardato il nucleo delle cellule a livello delle quali è stata talvolta osservata anche una debole e discontinua positività anche in corrispondenza della loro superficie apicale.

Assolutamente diversa è stata, invece, per localizzazione ed intensità, la risposta osservata nei tubuli degli individui trattati con le diverse concentrazioni di piombo; infatti, la positività all'anticorpo anti-MT è risultata quasi sempre esclusivamente espressa in corrispondenza della superficie apicale sia delle cellule B sia delle cellule S, sotto forma di una serie più o meno continua di sottili granulazioni e, solo occasionalmente, nel citoplasma di alcune cellule S, dove sono stati osservati addensamenti di strutture granulari simili a quelle osservate nelle stesse S degli individui esposti al Cd. Tale peculiare localizzazione delle MT potrebbe trovare una spiegazione nel fatto che l'attività di detossificazione del piombo sembra realizzarsi attraverso il rilascio di parte del citoplasma apicale sotto forma di numerose vescicole spesso contenenti un materiale elettrondenso che potrebbe corrispondere ad accumuli del metallo complessati con le metallotioneine. Il fatto che tale vescicolazione riguardi soprattutto le cellule B, mentre l'accumulo del piombo avviene soprattutto a carico delle cellule S, potrebbe trovare una spiegazione, così come ipotizzato da Köhler et al. (1996), in un possibile meccanismo di scambio del metallo tra i due tipi cellulari dell'epitelio o potrebbe, altresì, essere dovuto ad un effetto secondario aspecifico dell'impatto del metallo che influenza il metabolismo dell'intero tessuto.

Mentre negli individui trattati con il cadmio, nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra le diverse regioni dei tubuli dell'epatopancreas, la positività della risposta fornita dagli individui trattati con il piombo è apparsa più marcata nella regione prossimale dei tubuli.

L'incubazione delle sezioni utilizzate come controllo negativo ha validato la veridicità dei risultati ottenuti.

I risultati basati sull'utilizzazione dei metodi di immunolocalizzazione mediante impiego di anticorpo anti-MT potrebbero, da soli, essere giudicati non del tutto sufficienti a testimoniare l'effettiva presenza di metallotioneine, presenza che dovrebbe essere convalidata mediante approcci metodologici più esaustivi quali quelli molecolari. Sulla base di tale presupposto, un'ulteriore fase della ricerca ha

avuto come obiettivo il tentativo di identificare e sequenziare il gene responsabile dell'espressione delle metallotioneine; questo aspetto della ricerca non ha, purtroppo, prodotto risultati positivi a causa della qualità non ottimale dell'RNA estratto che, nonostante tutte le variazioni possibili del protocollo d'estrazione messe in atto, è risultato sempre contaminato da fenoli, contaminazione che non ha consentito di proseguire nelle ulteriori tappe del processo.

Quello messo in atto nella presente ricerca non è stato il primo tentativo rivolto a dimostrare l'espressione e la caratterizzazione delle MT negli isopodi oniscidei; già nel 2002, una ricerca di Knigge et al., rivolta all'identificazione in *Oniscus asellus* di una MT di legame per il cadmio e del gene responsabile della sua espressione - ricerca condotta mediante FPLC/reversed phase HPCL e MALDI-TOF e mediante un approccio genetico basato rispettivamente sull'impiego di primers degenerati dedotti da MT mRNA di crostacei e di sequenze amminoacidiche mitocondriali mediante RT-PCR - ha indotto tali autori ad affermare che anche negli oniscidei era presente una proteina di legame per il cadmio oppure una proteina indotta dal metallo. A tali risultati, riportati in un abstract presentato in una sessione del congresso della SETAC (Society for Environmental Toxicology and Chemistry), non ha fatto seguito alcuna pubblicazione a stampa né, tanto meno, sono presenti in letteratura ulteriori lavori sull'argomento, il che induce a ritenere che i risultati di cui sopra, non sono stati ritenuti, da parte degli stessi autori, meritevoli di ulteriore considerazione.

Una successiva ricerca di Žnidaršič et al. (2005), condotta su individui di *P. scaber* esposti alla contaminazione con zinco e basata su gel filtrazione su colonne di Sephadex G-75 del supernatante postmicrosomale dell'intestino e successiva HPLC delle frazioni così ottenute, ha consentito di identificare la presenza nelle cellule intestinali dell'isopode di proteine di legame per il rame e per lo zinco a basso peso molecolare, il cui picco di assorbanza a 215 nm coincideva con il picco di assorbanza della MT II di coniglio; Žnidaršič et al. concludevano che i risultati della loro ricerca rappresentavano il primo contributo relativo alla caratterizzazione di "proteine MT-simili" negli isopodi.

Se la questione relativa alla presenza negli isopodi oniscidei di MT o di proteine MT-simili rimane ancora aperta, incertezze ancora maggiori riguardano la

natura delle proteine di legame per alcuni metalli pesanti quali il piombo nei confronti del quale sembrerebbe essere necessaria, così come dimostrato per altre specie animali, l'espressione di specifiche proteine di legame.

Una ricerca di Ikebuchi et al. (1986), condotta sul fegato di ratti sottoposti alla somministrazione di acetato di piombo, ha avuto come risultato la simultanea induzione dell'espressione di una zinco-tioneina (Zn-BP) e di una proteina di legame per il piombo MT-simile (Pb-BP). Mentre la Zn-tioneina risultava essere identica alla Zn-MT II di ratto, la Pb-BP è risultata contenere una quantità di residui di cisteina leggermente inferiore (circa il 28%) e una piccola quantità di fenilalanina, probabilmente derivante da contaminazione; in conclusione, la Pb-BP di ratto può essere considerata una proteina a basso peso molecolare, ricca in residui di cisteina, MT-simile.

Infine, poiché il bioaccumulo di metalli pesanti rappresenta certamente un importante fattore di stress per le cellule che lo subiscono, un ultimo aspetto della ricerca è stato rivolto ad evidenziare, mediante metodi di immunolocalizzazione basati sull'impiego di anti-Hsp70 mouse monoclonal primary antibody, l'espressione nelle cellule dell'epitelio dell'epatopancreas delle heat shock proteins (Hsp) ed in particolare di Hsp70.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che il bioaccumulo di cadmio e piombo non solo determina l'espressione di Hsp70 ma anche che tale espressione risulta essere chiaramente differenziata in funzione del tipo di metallo saggiato, della concentrazione utilizzata e della specie oggetto di indagine. Mentre negli individui non trattati, la marcatura con l'anticorpo appare localizzata quasi esclusivamente in corrispondenza della superficie apicale delle cellule B ed, in misura più modesta, delle cellule S, in quelli trattati con le concentrazioni più elevate dei metalli l'espressione di Hsp70 si è moderatamente attenuata in corrispondenza della superficie cellulare divenendo chiaramente evidente nel citoplasma delle cellule S, sotto forma di una fitta granulazione, sovrapponibile a quella evidenziata nelle stesse cellule dopo incubazione nell'anticorpo anti-MT. La marcatura più consistente è stata osservata negli individui di *P. laevis* trattati con la concentrazione Cd 50 mg L⁻¹ ed in quelli di *A. vulgare* trattati con la concentrazione Cd 100 mg L⁻¹.

Negli individui trattati con le concentrazioni più elevate di Pb, invece, la positività della superficie cellulare, già osservabile anche negli individui non trattati, appare progressivamente più intensa ed, inoltre, anche i nuclei, specialmente quelli delle cellule B, appaiono moderatamente marcati dall'anticorpo. Nelle sezioni dei tubuli degli individui contaminati con la dose più elevata del metallo è stata osservata, inoltre, una risposta positiva a carico del citoplasma di numerose cellule S, evidente, soprattutto, negli individui di *A. vulgare*, capaci di un maggiore bioaccumulo di tale metallo.

La localizzazione di Hsp70, in corrispondenza della superficie cellulare, non rappresenta una caratteristica peculiare delle cellule dell'epatopancreas degli oniscidei ma sembra essere una localizzazione comune nell'espressione della proteina in risposta a vari tipi di stress; infatti, in una recente ricerca, basata su un approccio immunostochimico, di Poltronieri et al. (2008) anche negli individui di *Cyprinus carpio* sottoposti a stress da trasporto, è stata evidenziata una chiara positività alle Hsp70 nel citoplasma apicale e nell'orletto a spazzola delle cellule epiteliali dei tubuli renali, dell'epitelio branchiale e dell'epidermide.

Negli individui che esprimono i più elevati livelli di positività all'anticorpo anti-Hsp70, la presenza della proteina è stata osservata anche in corrispondenza delle granulazioni presenti nel citoplasma delle cellule S, localizzazione sovrapponibile a quella osservata dopo marcatura con l'anticorpo anti-MT; tale localizzazione sembra coincidere con quella dei granuli di accumulo dei metalli, granuli B di Hopkin (1989), ritenuti di origine lisosomiale.

I risultati di varie ricerche (Cuervo et al., 1995; Reggiori e Klionsky, 2002; Dice et al., 2003) stanno ad indicare che i membri citosolici della famiglia delle Hsp70 ricoprono un ruolo importante nella CMA (Chaperon Mediated Autophagy), un percorso autofagico basato sulla formazione di vacuoli autofagici (autofagosomi) e responsabile della sopravvivenza delle cellule sottoposte a stress termico o a digiuno prolungato; in tale percorso, le Hsp70, insieme ad altri chaperoni molecolari, avrebbero il ruolo di determinare la denaturazione dei substrati proteici prima della loro dislocazione all'interno dei lisosomi. La proteolisi selettiva delle proteine citosoliche realizzata dalla CMA fornirebbe una disponibilità di amminoacidi in

grado di rappresentare una fonte di energia atta a garantire la sopravvivenza della cellula, così come dimostrato nei pesci da Yamashita et al. (2010).

Poiché la contaminazione esercitata dalle alte concentrazioni dei metalli produce negli isopodi oniscidei la manifestazione di effetti largamente sovrapponibili a quelli conseguenti ad un prolungato digiuno (Storch. 1982, 1984; Štrus et al., 1985), la localizzazione di Hsp70 in corrispondenza dei granuli di accumulo dei metalli, considerata la loro derivazione lisosomiale, troverebbe, alla luce di quanto sopra riferito, una valida giustificazione.

9. CONCLUSIONI

I risultati della presente tesi di Dottorato hanno confermato l'opportunità di una proficua utilizzazione degli isopodi oniscidei come bioaccumulatori e bioindicatori nei programmi di monitoraggio ambientale rivolti alla valutazione della contaminazione da metalli pesanti.

Confermando quanto primariamente affermato da Hopkin (1990), la capacità di bioaccumulo dei diversi metalli è risultata essere specie-specifica e, pertanto, l'utilizzazione di tali animali nei programmi di biomonitoraggio deve essere preceduta dalla conoscenza della risposta fornita da ciascuna specie nei confronti di ciascun metallo pesante.

Secondo Köhler et al. (1996), le alterazioni ultrastrutturali indotte a carico delle cellule dell'epatopancreas degli oniscidei dai metalli pesanti possono essere utilizzate come efficaci biomarkers della esposizione subletale ai metalli stessi; poiché, così come peraltro sottolineato dai suddetti autori, buona parte di tali alterazioni mima quelle determinate da un prolungato digiuno e poiché, inoltre, tali alterazioni, come dimostrato dalla presente ricerca, appaiono in parte sovrapponibili e nelle diverse specie studiate e quale effetto dei diversi metalli saggiati, non sembra affidabile attribuire ad esse un valore assoluto quali biomarkers se non accompagnate da dati derivanti dall'analisi relativa al contenuto in metalli dell'organismo.

La fase della ricerca basata sui metodi di immunolocalizzazione delle MT e sulle successive indagini molecolari non ha, ancora una volta, fornito una risposta esaustiva circa l'effettiva presenza negli isopodi di tali proteine o, piuttosto, di proteine di legame per i metalli MT-simili; il fatto che, sino ad oggi, nonostante i tentativi messi in atto da diversi gruppi di ricerca non si siano ancora ottenuti risultati definitivi lascia supporre che i protocolli sperimentali che hanno consentito di caratterizzare le MT negli altri gruppi di invertebrati, ivi compresi i crostacei decapodi, non siano idonei al conseguimento di risultati altrettanto soddisfacenti per gli isopodi oniscidei.

10. RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questa esperienza ricca di energia positiva che ha arricchito le mie conoscenze scientifiche desidero ringraziare quanti hanno contribuito alla realizzazione della mia tesi di Dottorato.

Innanzitutto ringrazio il Prof. Guglielmo Longo per essere stato non solo il mio tutor, ma soprattutto guida preziosa e sostegno irrinunciabile durante tutti questi anni: da grande “Maestro di Scienza” ha contribuito significativamente alla mia formazione scientifica e ha sempre mostrato piena fiducia nelle mie capacità. A lui un grazie colmo d’affetto per avermi guidata “con molta pazienza”, passo dopo passo, fino alla stesura della tesi e per aver sempre reso piacevoli ed allegre le piene giornate di lavoro.

Ringrazio il Prof. Salvatore Fasulo e la Prof.ssa Angela Mauceri (Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina dell’Università di Messina) per il fondamentale supporto professionale e umano e la costante disponibilità nel permettermi di usufruire delle loro strumentazioni; ringrazio tutto il loro staff per la simpatia, immensa disponibilità ed accoglienza, in particolare la Prof.ssa Maria Maisano per avermi offerto validi suggerimenti durante la fase di ricerca sperimentale relativa alle indagini immunocitochimiche e la Dott.ssa Alessia Giannetto per il suo supporto inerente la parte molecolare della mia ricerca.

Ringrazio la Prof.ssa Fulvia Sinatra (Dipartimento “*G. F. Ingrassia*” dell’Università di Catania), per avermi sempre dimostrato la sua stima e per avermi dato piena disponibilità ad effettuare le osservazioni al microscopio elettronico a scansione con il valido aiuto del Sig. Filippo Mondio e del Dott. Francesco Avola.

Ringrazio la Prof.ssa Margherita Ferrante e la Dott.ssa Gea Conti Oliveri (Dipartimento “*G. F. Ingrassia*” dell’Università di Catania) per essersi generosamente occupate della parte relativa alle analisi mediante ICP-MS.

Un ringraziamento va anche al Prof. Domenico Caruso, coordinatore scientifico del XXIV ciclo del Dottorato in Biologia Evoluzionistica nel biennio 2008-2010, e alla Prof.ssa Maria Teresa Vinciguerra attuale coordinatore scientifico, per la loro disponibilità, per avermi dato l’opportunità di partecipare a diversi congressi e per aver organizzato diverse e valide iniziative scientifiche; ringrazio

inoltre tutti i membri del Collegio dei Docenti per i loro preziosi suggerimenti forniti durante la lettura critica del presente manoscritto.

In maniera particolare vorrei ringraziare la Prof.ssa Renata Viscuso e il compianto Prof. Lorenzo Sottile per la dolcezza e l'affetto con cui mi hanno sostenuta in questo percorso e per i consigli espressi sempre con grande competenza.

Ringrazio la Prof.ssa Maria Violetta Brundo, la Dott.ssa Michelanna Trovato e il Dott. Danilo Vitale, colleghi ed amici con cui ho condiviso gran parte del mio dottorato, per il costante aiuto ed incoraggiamento; un pensiero di gratitudine anche a tutti i tesisti, tutti gli amici della sezione di Biologia Animale "*M. La Greca*" e tutti coloro che in questi anni hanno mostrato un grande interesse alla mia ricerca.

Infine un ringraziamento speciale va ai miei genitori e a mia sorella per avermi sempre sostenuta, per aver tanto pazientato e per avermi sempre incoraggiata a non perdere mai l'ottimismo mostrando sempre piena fiducia nelle mie capacità.

Grazie anche a chi avrebbe gioito nel vedermi raggiungere anche questo importante traguardo.

A me ... un grande in bocca al lupo!!!

Catania, 1 dicembre 2011

Veronica

11. BIBLIOGRAFIA

AFONSO L.O.B., BASU N., NAKANO K., DEVLIN R.H., IWAMA G.K., 2003 - Sex-related differences in the organismal and cellular stress response in juvenile salmon exposed to treated kraft mill effluent. *Fish Physiol. Biochem.*, 29:173-179.

AIRAKSINEN S., RABERGH C.M.I., LAHTI A., KAATRASALO A., KAATRASALO A., SISTONEN L., NIKINMAA M., 2003 - Stressor-dependent regulation of the heat shock response in zebrafish, *Danio rerio*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 134:839-846.

AKERMAN K.E.O., HONKANIEMI J., SCOTT I.G., ANDERSSON L.C., 1985 - Interaction of Ca^{2+} with calmodulin activated ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase activity of human erythrocyte ghosts. *Biochim. Biophys. Acta*, 845:48.

ALIKHAN M.A., 1971 - The fine structure of the midgut epithelium in the woodlouse, *Porcellio laevis* Latreille (Isopoda, Porcellionidae). *Crustaceana Suppl.*, 3:101-109.

ALIKHAN M.A., 1972 - Changes in the hepatopancreas metabolic reserves of *Porcellio laevis* Latreille during starvation and the moult-cycle. *Am. Midl. Nat.*, 87:503-514.

ALIKHAN M.A., STORCH V., 1990 - Copper and nickel uptake and accumulation, and their effects on redox and electrical potentials of hepatopancreatic cells of *Oniscus asellus*. *Can. J. Zool.*, 68:651-655.

AMORUSO M.A., WITZ G., GOLDSTEIN B.D., 1982 - Enhancement of rat and human phagocyte superoxide anion radical production by cadmium in vitro. *Toxicol. Lett.*, 10:133-138.

ANDERSSON T., DRAKENBERG T., FORSEN S., THULIN E., 1982 - Characterization of the Ca^{2+} binding sites of calmodulin from bovine testis using ^{43}Ca and ^{113}Cd NMR., *Eur. J. Biochem.*, 126:501-505.

AU D.W., REUNOV A.A., WU R.S., 2001 - Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium. Part II: Effects on sperm development. *Environ. Pollut.*, 111:11-20.

BALER R., WELCH W.J., VOELLING R., 1992 - Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: Hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J. Cell. Biol.*, 117:1151-1159.

BALER R., DAHL G., VOELLMY R., 1993 - Activation of human shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat-shock transcription factor HSF1. *Mol. Cell. Biol.*, 13:2486-2496.

BARNETT T., ALTSCHULER M., MCDANIEL C.N., MASCARENHAS J.P., 1980 - Heat shock induced proteins in plant cells. *Dev. Genet.*, 1:331-340.

BASU N., NAKANO T., GRAU E.G., IWAMA G.K., 2001 - The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 124:97-105.

BASU N., TODGHAM A.E., ACKERMAN P.A., BIBEAU M.R., NAKANO K., SCHULTE P.M., IWAMA G.K., 2002 - Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295:173-183.

BAYNE B.L., MOORE M.N., WIDDOWS J., LIVINGSTONE D.R., SALKELD P., 1979 - Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve molluscs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 286:563-581.

BENSAUDE O., BELLIER S., DUBOIS M.F., GIANNONI F., NGUYEN V.T., 1996 - Heat shock induced protein modifications and modulation of enzyme activities. In: *Stress-inducible cellular responses*. (Feige U., Morimoto R.I., Yahara I., Polla B., Eds.). Basel: Birkhäuser. pp. 199-219.

BESSE' G., 1976 - Contribution a l'étude expérimentale de la physiologie sexuelle femelle chez les crustacés Isopodes terrestres. Thèse Doctorat d'Etat, Université de Poitiers, CNRS, n° AO13017.

BIANCA S., LI VOLTI G., CARUSO NICOLETTI M., ETTORE G., BARONE P., LUPO L., LI VOLTI S., 2003 - Elevated incidence of hypospadias in

two sicilian towns where exposure to industrial and agricultural pollutants is high. *Reprod. Toxicol.*, 17:539-545.

BIANCHI F., BIANCA S., LINZALONE N., MADEDDU A., 2004 - Sorveglianza delle malformazioni congenite in Italia: un approfondimento nella provincia di Siracusa. *Epidemiologia e Prevenzione*, 28:87-93.

BIERKENS J., MAES J., VANDER PLAETSE F., 1998 - Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure to different classes of environmental pollutants. *Environ. Pollut.*, 101:91-97.

BOFILL R., CAPDEVILA M., COLS N., ATRIAN S., GONZÁLEZ-DUARTE P., 2001 - Zinc (II) is required for the *in vivo* and *in vitro* folding of mouse copper metallothionein in two domains. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6:405-417.

BOGGESS W.R., WIXSON B.G., 1977 - Lead in the environment. NSF/RA-770214, National Science Foundation, Washington, D.C., pp. 272.

BRADLEY R.W., DUQUESNAY C., SPRAGUE J. B., 1985 - Acclimation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to zinc: kinetics and mechanism of enhanced tolerance induction. *J. Fish Biol.*, 27:367-379.

BROUWER M., WINGE D.R., GRAY W.R., 1989 - Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the american lobster *Homarus americanus*. *J. Inorg. Biochem.*, 35:289-303.

BROUWER M., BROUWER-HOEXUM T., 1991 - Interaction of copper-metallothionein from the American lobster, *Homarus americanus*, with glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, 290:207-213.

BROUWER M., BROUWER-HOEXUM T., 1992a - Glutathione-mediated transfer of copper (I) into American lobster apohemocyanin. *Biochem.* 31:4096-4102.

BROUWER M., SCHLENK D., HUFFMAN-RINGWOOD A., BROUWER HOEXUM T., 1992b - Metal-specific induction of metallothionein-isoforms in the blue crab *Callinectes sapidus* in response to single- and mixed-metal exposure. *Arch. Biochem. Biophys.*, 294:461-468.

BROUWER M., ENGHILD J., HOEXUM-BROUWER T., THOGERSEN I., TRUNCALI A., 1995 - Primary structure and tissue-specific expression of blue crab (*Callinectes sapidus*) metallothionein isoforms. *Biochem. J.*, 31:617-622.

BROWN M.A., UPENDER R.P., HIGHTOWER L.E., RENFRO J.L., 1992 - Thermoprotection of a functional epithelium: Heat stress effects on transepithelial transport by flounder renal tubule in primary monolayer culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:3246-3250.

BRYCE-SMITH D., 1989 - Zinc deficiency-the neglected factor. *Chem. Brit.*, 25, pp. 783-786.

BUCHELI T.D., FENT K., 1995 - Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystem. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 25:201-268.

CALDERWOOD S.K., STEVENSON M.A., PRICE B.D., 1993 - Activation of phospholipase C by heat shock requires GTP analogs and is resistant to pertussis toxin. *J. Cell. Physiol.*, 156:153-159.

CALEVRO F., BEYERSMANN D., HARTWIG A., 1998 - Effect of cadmium (II) on the extent of oxidative DNA damage in primary brain cell cultures from *Pleurodeles* larvae. *Toxicol. Lett.*, 94:217-225.

CAPASSO C., CARGINALE V., CRESCENZI O., DI MARO D., SPADACCINI R., TEMUSSI P.A., PARISI E., 2005 - Structural and functional studies of vertebrate metallothioneins: cross-talk between domains in the absence of physical contact. *Biochem. J.*, 391:95-103.

CAPDEVILA M., COLS N., ROMERO-ISART N., GONZALEZ-DUARTE R., ATRIAN S., GONZALEZ-DUARTE P., 1997 - Recombinant synthesis of mouse Zn³-beta and Zn⁴-alpha metallothionein 1 domains and characterization of their cadmium (II) binding capacity. *Cell. Mol. Life Sci.*, 53:681-688.

CARUSO D., BAGLIERI C. DI MAIO M.C., LOMBARDO B.M., 1987 - Isopodi terrestri di Sicilia ed Isole circumsiciliane. *Animalia*, 14 suppl., pp. 211.

CHAN J., MERRIFIELD M.E., SOLDATOV A.V., STILLMAN M.J., 2005 - XAFS spectral analysis of the cadmium coordination geometry in cadmium thiolate clusters in metallothionein. *Inorg. Chem.*, 44:4923-4933.

CHAO S.H., SUZUKI Y., ZYSK J.R., CHEUNG W.Y., 1984 - Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius. *Mol. Pharmacol.*, 26:75-82.

CHEN Y.C. E SMITH J.B., 1992 - A putative lectin-binding receptor mediates cadmium-evoked calcium release. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 117:249-256.

CHERIAN M.G., 1994 - The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells. *Environ. Health Perspect.*, 3:131-135.

CHEUNG W.Y., 1984 - Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity. *Fed. Proc.*, 43:2995-2999.

CHOMCZYNSKI P., SACCHI N., 1987 - Single-step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162:156-159.

CHOU C.L., GUY R.D., UTHE J.F., 1991 - Isolation and characterization of metal-binding proteins (metallothioneins) from lobster digestive gland (*Homarus americanus*). *Sci. Total Environ.*, 105:41-59.

CIOCCA D.R., OESTERRECH S., CHAMNESS G.C., MCGUIRE W.L., FUQUA S.A., 1993 - Biological and clinical implications of Heat Shock Protein 27000 (Hsp27): a review. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85:1558-1570.

CLIFFORD B., WITKUS E.R., 1971 - The fine structure of the hepatopancreas of the woodlouse, *Oniscus asellus*. *J. Morphol.*, 135:335-350.

COBBETT C., GOLDSBROUGH P., 2002 - Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53:159-182.

COLS N., CAPDEVILA M., ROMERO N., OLIVA B., GONZÁLEZ-DUARTE P., GONZÁLEZ-DUARTE R., ATRIAN S., 1997 - Binding of excess

cadmium (II) to Cd7-metallothionein from recombinant mouse Zn7-metallothionein. *J. Inorg. Biochem.*, 68:157-166.

COLS N., ROMERO-ISART N., BOFILL R., CAPDEVILA M., GONZÀLEZ-DUARTE P., GONZÀLEZ-DUARTE R., ATRIAN S., 1999 - *In vivo* copper and cadmium binding ability of mammalian metallothionein b domain. *Protein Eng.*, 12:265-269.

COUSINS R.J., 1985 - Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ruloplasmin. *Physiol. Rev.*, 2:238-309.

COX J.L., HARRISON S.D. JR., 1983 - Correlation of metal toxicity with *in vitro* calmodulin inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115:106-111.

COYLE P., PHILCOX J.C., CAREY L.C., ROFE A.M., 2002 - Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59:627-647.

CROMMENTUIJN T., DOODEMAN C.J.A.M., DOORNEKAMP A., VAN DER POL J.J.C., BEDAUX J.J.M., VAN GESTEL C.A.M., 1994 - Lethal body concentrations and accumulation patterns determine time-dependent toxicity of cadmium in soil arthropods. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1781-1789.

CUERVO A.M., KNECHT E., TERLECKY S.R., DICE J.F., 1995 - Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.*, 269:1200:1208.

DALLINGER R., 1993 - Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates* (Dallinger R., Rainbow P.S., Eds.). Lewis, Boca Raton, FL, pp. 245-289.

DALLINGER R., PROSI F., 1986 - Fractionation and identification of heavy metals in hepatopancreas of terrestrial isopods: evidence of lysosomal accumulation and absence of cadmium-thionein. In: *Proceedings of 3rd European Congress on Entomology*. (Velthuis H.H., Ed.). Nederlandse Entomologische Vereniging, Amsterdam, p. 328.

DALLINGER R., BERGER B., BIRKEL S., 1992 - Terrestrial isopods: useful biological indicators of urban metal pollution. *Oecologia*, 89:32-41.

DALLINGER R., BERGER B., HUNZIKER P., KÄGI J.H., 1997 - Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature*, 388:237-238.

DECAPRIO A.P., 1997 - Biomarkers: coming of age for environmental health and risk assessment. *Environ. Sci. Tech.*, 31:1873-1848.

DEMAYO A., TAYLOR M.C., TAYLOR K.W., HODSON P.V., 1982 - Toxic effects of lead and lead compounds on human health, aquatic life, wildlife plants, and livestock. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, 12:257-305.

DICE J., FINN P., MAJESKI A., MESIERES N., CUERVO A., 2003 - Chaperone-mediated autophagy. In: *Autophagy*. (Klionsky D.J., Ed.). Landes Bioscience, Georgetown, TX., pp. 158-177.

DIXON M., WEBB E.C., 1979 - Enzyme inhibition and activation. In: *Enzymes*. (Dixon M., Webb E.C., Eds). Academic Press, New York, p. 332.

DONADEY C., 1966 - Contribution à l'étude du rôle excréteur des caecums digestifs du Crustacés. Etude au microscopie électronique sur *Sphaeroma serratum* (Crustacea Isopoda). *C. R. Acad. Sci., D*, 263:1401-1404.

DONKER M.H., KOEVOETS P., VERKLEIJ J.A.C., VAN STRAALEN N.M., 1990 - Metal binding compounds in hepatopancreas and haemolymph of *Porcellio scaber* (Isopoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 97C:119-126.

DONNELLY T.E., 1978 - Effects of zinc chloride on the hydrolysis of cyclic GMP and cyclic AMP by the activator-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine heart. *Biochim. Biophys. Acta*, 522:151-160.

EISLER R., 1985 - Cadmium hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. Patuxent Wildlife Research Center, Biological Report n.2.

EISLER R., 1988 - Lead hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. Patuxent Wildlife Research Center, Biological Report n. 14.

ENSLEY S., 2003 - Lead-Metals and Minerals. In: *Clinical Veterinary Toxicology*. (Plumlee K.H., Ed.). Mosby, 22, pp. 204-210.

EPA., 1980 - Ambient water quality criteria for lead. U.S. Environ. Protection Agency Rep., 440/5-80-057.

FABISIAK J.P., PEARCE L.L., BORISENKO G.G., TYHURINA Y.Y., TYURIN V.A., RAZZACK J., LAZO J.S., PITT B.R., KAGAN V.E., 1999 - Bifunctional anti/pro-oxidant potential of metallothionein: redox signaling of copper binding and release. *Antiox. Redox Sign.*, 1:349-364.

FADER S.C., YU Z., SPOTILA J.R., 1994 - Seasonal variation in heat shock proteins (hsp70) in stream fish under natural conditions. *J. Thermal. Biol.*, 19:335-341.

FEDER M. E., HOFMANN G. E., 1999 - Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. Physiol.*, 61:243-282.

FERNANDEZ J.A., EDERRA A., NUNEZ E., MARTINEZ-ABAIGAR J., INFANTE M., HERAS P., ELIAS M.J., MAZIMPAKA V., CARBALLEIRA A., 2002 - Biomonitoring of metal deposition in northern Spain by moss analysis. *Sci Total Environ.*, 300:115-127.

FLAHERTY K.M., DELUCA-FLAHERTY C., MCKAY D.B., 1990 - Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat shock cognate protein. *Nature*, 346:623-628.

FOGARTY C.T., WITKUS R., 1989 - A comparative cytophotometric study of the epithelial cell nuclei of the hindgut and hepatopancreas of *Porcellio scaber* Latreille, 1804 (Crustacea, Isopoda). *Monit. Zool. Ital. Monogr.*, 4:175-190.

FORSEN S., THULIN E., LILJA H., 1979 - ^{113}Cd NMR in the study of calcium binding proteins: troponin. *C. Febs Lett.*, 104:123-126.

FOWLER B.A., HILDEBRAND C.E., KOJIMA Y., WEBB M., 1987 - Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl.*, 52:19-22.

FRENKEL K., KARKOSZKA J., COHEN B., BARANSKI B., JAKUBOWSKI M., COSMA G., TAIOLI E., TONIOLO P., 1994 - Occupational exposures to Cd, Ni, and Cr modulate titers of antioxidantized DNA base autoantibodies. *Environ. Health Perspect.*, 102 Suppl., 3:221-225.

FRENZEL J., 1884 - Über die Mitteldarmdrüse der Crustaceen. *Mitt. Zool. Staz. Neapel*, 5:50-101.

GABOR S., ANCA Z., BORDAS E., 1978 - Cadmium-induced lipid peroxidation in kidney and testes: effect of zinc and copper. *Rev. Roum. Biochim.*, 15:113-117.

GHADIALLY F.N., 1988 - Ultrastructural pathology of the cell and matrix, 3rd Edn., Butterworths, London.

GOERING P.L., WAALKES M.P., KLAASEN C.D., 1995 - Toxicology of cadmium. In: *Toxicology of metals, Biochemical aspects*. (Goyer R.A., Cheria M.G. Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcellona, Budapest, p. 189.

GRUMMT I., KUHN A., BARTSCH I., ROSENBAUER H., 1986 - A transcription terminator located upstream of the mouse rDNA initiation site affects rRNA synthesis. *Cell*, 47:901-911.

GUILLOU M., OUINIOU F., HUART B., PAGANO G., 2000 - Comparison of embryonic development and metal contamination in several populations of the sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck) exposed to anthropogenic pollution. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39:337-44.

GUPTA R.S., GOLDING G.B., 1993 - Evolution of Hsp70 gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *J. Mol. Evol.*, 37:573-582.

HABERMANN E., CROWELL K., JANICKI P., 1983 - Lead and other metals can substitute for Ca²⁺ in calmodulin. *Arch. Toxicol.*, 54:61-70.

HALL J.L., 2002 - Cellular mechanisms of heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Botany*, 53:1-11.

HANAS J.S., HAZUDA D.J., BOGENHAGEN D.F., WU FY-H., WU C.W., 1983 - *Xenopus* transcription factor A requires zinc for binding to the 5S RNA gene. *J. Biol. Chem.*, 258:14120-14125.

HANNA L.A., PETERS J.M., WILEY L.M., CLEGG M.S., KENN C.L., 1997 - Comparative effects of essential and nonessential metals on preimplantation mouse embryo development in vitro. *Toxicol.*, 116:123-131.

HARTWING A., 1994 - Role of DNA repair inhibition in lead and cadmium induced genotoxicity a: review. *Environ. Health Perspect.*, 102 Suppl., 3:45-50.

HIGHTOWER L.E., GUIDON JR. P.T., WHELAN S.A., WHITE C.N., 1985 - Stress response in avian and mammalian cells. In: *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress*. (Atkinson B.D., Waldens D.B., Eds) New York: Accademic Press. pp.197-210.

HIGHTOWER L.E., 1993 - A brief prospective on the heat-shock response and stress proteins. *Marine Environ., Res.*, 35:79-83.

HIGHTOWER L.E., GUIDON JR. P.T., WHELAN S.A., WHITE C.N., 1985 - Stress responses in avian and mammalian cells. In: *Changes in eucaryotic gene expression in response to environmental stress*. (Atkinson B.G., Whaien D.B., Eds.). Academic Press, New York. pp. 197-210.

HOPKIN S.P., 1989 - Terrestrial isopods as biological indicators of zinc pollution in the Reading area, south east England. *Monit. Zool. Ital. Monogr.*, 4:477-488.

HOPKIN S.P., 1990 - Species-specific difference in the net assimilation of zinc, cadmium, lead, copper and iron by the terrestrial isopods *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber*. *J. Appl. Ecol.*, 27:460-474.

HOPKIN S.P., MARTIN M.H., 1982 - The distribution of zinc, cadmium, lead and copper within the woodlouse *Oniscus asellus* (Crustacea, Isopoda). *Oecologia*, 54:227-232.

HOPKIN S.P., MARTIN M.H., 1984 - Heavy metals in woodlice. In: *The biology of terrestrial isopods*. (Sutton S.L., Holdich D.M., Eds.). The Zoological Society of London. Clarendon Press, Oxford, pp. 143-166.

HOPKIN S.P., HARDISTY G.N., MARTIN M.H., 1986 - The woodlouse *Porcellio scaber* as a "biological indicator" of zinc, cadmium, lead and copper pollution. *Environ. Pollut., Ser. B.*, 11:271-290.

HORNUNG E., FISHER E., FARKAS S., 1998 - Isopod reproduction as a tool for sublethal-toxicity tests. *Isr. J. Zool.*, 44:445-450.

HUNTER B.A., JOHNSON M.S., THOMPSON D.J., 1987 - Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem. II. Invertebrates. *J. Appl. Ecol.*, 24:587-599.

HUNZIKER P.E., 1991 - Amino acid sequence determination. *Methods Enz.*, 205, B:421-426.

IKEBUCHI H., TESHIMA R., SUZUKI K., TERAOKA T., YAMANE Y., 1986 - Simultaneous induction of Pb-metallothionein-like protein and Zn-thionein in the liver of rats given lead acetate. *Biochem. J.*, 233:541-546.

JEANTET A.Y., BALLAN-DUFRANCAIS C., RUSTE J., 1980 - Quantitative electron probe analysis on insects exposed to mercury. 11. Involvement of the lysosomal system in detoxification processes. *Biol. Cell.*, 39:325-334.

KÄGI J.H.R., 1993 - Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In: *Metallothionein III*. (Suzuki K.T., Imura N., Kimura M., Eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. pp. 29-55.

KÄGI J.H.R., VALLEE B.L., 1960 - Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.*, 235:3460-3465.

KÄGI J.H.R., HAPKE H.J., 1984 - Biochemical interaction of mercury, cadmium and lead. In: *Changing metal cycles and human health*. (Nriagu J.O. Ed.). Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 237.

KÄGI J.H.R., KOJIMA Y., 1987 - Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Suppl.*, 52:25-61.

KELLY P. M., SCHLESINGER M. J., 1978 - The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell*. 15:1277-1286.

KHALID R.A., GAMBRELL R.P., PATRICK W.H. JR., 1981 - Chemical availability of cadmium in Mississippi River sediment. *J. Environ. Qual.*, 10:523-528.

KIANG J.G., TSOKOS G.C., 1998 - Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacol. Ther.*, 80:183-201.

KILLE P., HEMMINGS A., LUNNEY E.A., 1994 - Memories of metallothionein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1205:151-161.

KLAASSEN C.D., WONG K.L., 1982 - Cadmium toxicity in the newborn rat. *Can J. Physiol. Pharmacol.*, 60:1027-1036.

KLAASSEN C.D., LIU J., 1998 - Metallothionein transgenic and knock-out mouse models in the study of cadmium toxicity. *J. Toxicol. Sci.*, 23:97-102.

KNIGGE T., STERENBORG I., VAN STRAALEN N., KÖHLER H.R., 2002 - An approach to metallothioneins in isopods. Annual meeting Soc. Env. Tox. Chem., (Website, 22-24).

KÖHLER H.R., ALBERTI G., 1992 - The effect of heavy metal stress on the intestine of diplopods. In: *Advances in Myriapodology*. (Meyer E., Thaler K., Schedl W. Eds.). *Ber. Nat.-Med. Ver. Innsbruck, Suppl.*, 10:257-267.

KÖHLER H.R., HÜTTENRAUCH K., BERKUS M., GRÁFF S., ALBERTI G., 1996 - Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. *Appl. Soil. Ecol.*, 3:1-15.

KOJIMA Y., HUNZIKER P.E., 1991 - Amino acid analysis of metallothionein. *Methods Enzymol.*, 205:419-421.

LAZO J.S., KONDO Y., DELLAPIAZZA D., MICHALSKA A.E., CHOO K.H., PITT B.R., 1995 - Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J. Biol. Chem.*, 270:5506-5510.

LEIGNEL V., MARCHAND J., MOREAU B., CHÉNAIS B., 2008 - Metallothionein genes from hydrothermal crabs (Bythograeidae, Decapoda): characterization, sequence analysis, gene expression and comparison with coastal crabs. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 148:6-13.

LELE Z., ENGEL S., KRONE P.H., 1997 - Hsp47 and Hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebrafish embryos. *Dev. Genet.*, 21:123-133.

LEMEUX P.G., HERENDEEN S. L., BLOCH P.L., NEIDHARDT F.C., 1978 - Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *Escherichia coli* following temperature shifts. *Cell*, 13:427-434.

LEWIS S., HANDY R.D., CORDI B., BILLINGHURST Z., DEPLEDGE M.H., 1999 - Stress proteins (Hsps): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicol.*, 8:361-368.

MARCAILLOU C., TRUCHET M., MARTOJA R., 1986 - Rolê des cellules de l'èpithelium caecal des Crustacés Isopodes dans la capture et la dégradation de protéines hémolympathiques, et dans le stockage de catabolites (acide urique, sulfure de cuivre, phosphates). *Can. J. Zool.*, 64:2757-2769.

MARGOSHES M., VALLEE B.L., 1957 - A cadmium binding protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, 79:4813-4814.

MARET W., VALLEE B.L., 1998 - Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:3478-3482.

MARTIN M.H., COUGHTREY P.J., 1982 - Biological monitoring of heavy metal pollution: land and air. Elsevier, London, pp. 475.

MAY T.W., MCKINNEY G.L., 1981 - Cadmium, lead, mercury, arsenic, and selenium concentrations in freshwater fish, 1976-77 - National Pesticide Monitoring Program. *Pestic. Monitor. J.*, 15:14-38.

MCALEER M.F., TUAN R.S., 2001 - Metallothionein over-expression in human trophoblastic cells protects against cadmium-induced apoptosis. *Vitr. Mol. Toxicol.*, 14:25-42.

MCALISTER L., FINKELSTEIN D.B., 1980 - Heat shock protein and thermal resistance in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 93:819-824.

MCMURRICH J.P., 1898 - The epithelium of the so-called midgut of the terrestrial isopods. *J. Morphol.*, 14:83-108.

MILLS J.S., JOHNSON J.D., 1985 - Metal ions as allosteric regulators of calmodulin. *J. Biol. Chem.*, 260:15100.

MORGAN A.J., MORRIS B., 1982 - The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil. *Histochem.*, 75:269-287.

MORGAN J.J., STUMM W., 1991 - Chemical processes in the environment, relevance of chemical speciation. In: *Metals and Their Compounds in the Environment*. (Merian E., Ed.). VCH, Weinheim, pp. 67-103.

MORIMOTO R. I., TISSIERES A., GEORGOPOULOS C., 1990 - Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.

MORIMOTO R.I., SANTORO M.G., 1998 - Stress inducible responses and Hsp: new pharmacological target for cytoprotection. *Nat. Biotechnol.*, 16:833-838.

MOSSER D.D., BOOLS N.C., 1998 - Relationship between heat shock protein synthesis and termotolerance in rainbow trout fibroblasts. *J. Comp. Physiol.*, 158:457-467.

NARULA S.S., BROUWER M., HUA Y., ARMITAGE I.M., 1995 - Three-dimensional solution structure of *Callinectes sapidus* metallothionein-1 determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem.*, 34:620-631.

NEMER M., WILKINSON D.G., TRAVAGLINI E.C., STERNBERG E.J., BUTT T.R., 1985 - Sea urchin metallothionein sequence: key to an evolutionary diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:4992-4994.

NICOSIA E., 2007 - Cause di rischio e sostenibilità urbana nella città di Augusta. Atti delle Giornate della Geografia "Rischi e territorio nel Mondo Globale", Udine, 24-26 maggio 2006 (pubblicazione in CD-R).

NORDBERG G.F., JIN T., NORDBERG M., 1994 - Subcellular targets of cadmium nephrotoxicity: cadmium binding to renal membrane proteins in animals with or without protective metallothionein synthesis. *Environ. Health Perspect* 102 Suppl., 3:191-194.

NUSBAUM-HILAROWICZ J. 1921 - Zur Histologie und Physiologie der Verdauungsorgane der Landasseln, zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Resorptionsvorgänge im Tierreich. Bull. Int. Acad. Pol. Sci. Lett. Ser., B 1920:67-117.

OCHI T., ISHIGURO T., OHSAWA M., 1983 - Participation of active oxygen species in the induction of DNA single-strand scissions by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. Mutat. Res., 122:169-175.

OGRA Y., SUZUKI K.T., 2000 - Nuclear trafficking of metallothionein: possible mechanisms and current knowledge. Cell. Mol. Biol., 46:357-365.

OLSSON I.M., ERIKSSON J., OBORN I., SKERFVING S., OSKARSSON A., 2005 - Cadmium in food production systems: a health risk for sensitive population groups. Ambio, 34:344-351.

OSKARSSON A., PALMINGER HALLEN I., SUNDBERG J., PETERSSON GRAWEK., 1998 - Risk assessment in relation to neonatal metal exposure. Analyst, 123:19-23.

OVERNELL J., 1982 - Copper metabolism in crabs and metallothionein: in vivo effects of copper (II) on soluble hepatopancreas metal binding components in the crab *Cancer pagurus* containing various amounts of cadmium. Comp. Biochem. Physiol., B. Comp. Biochem., 73:555-564.

OVERNELL J., TREWHELLA E., 1979 - Evidence for the natural occurrence of (cadmium, copper)-metallothionein in the crab *Cancer pagurus*. Comp. Biochem. Physiol., C. Comp. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol., 64:69-76.

PAOLETTI M.G., HASSALL M., 1999 - Woodlice (Isopoda: Oniscidea): their potential for assessing sustainability and use as bioindicators. Agr. Ecos. Environ., 74:157-165.

PARSELL D. A., LINDQUIST S., 1993 - The function of Hsps in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu. Rev. Genet., 27:437-496.

PATRICK D.M., 1926 - An experimental study of the cells of the hepatopancreas of *Ligia*. Brit. J. Exp. Biol., 4:27-37.

PEAKALL U.K., WALKER C.H., 1994 – The role of biomarker in environmental assessment. *Ecotoxicol.*, 3:173-179.

PEDERSEN K.L., PEDERSEN S.N., HOJRUP P., ANDERSEN J.S., ROEPSTORFF P., KNUDSEN J., DEPLEDGE M.H., 1994 - Purification and characterization of a cadmium-induced metallothionein from the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Biochem. J.*, 297:609-614.

PEDERSEN S.N., PEDERSEN K.L., HOJRUP P., KNUDSEN J., DEPLEDGE M.H., 1998 - Induction and identification of cadmium-, zinc- and copper-metallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 120:251-259.

POLTRONIERI C., NEGRATO E., BERTOTTO D., MAJOLINI D., SIMONTACCHI C., RADAELLI G., 2008 - Immunohistochemical localization of constitutive and inducible Heat Shock Protein70 in carp (*Cyprinus carpio*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to transport stress. *Eur. J Histochem.*, 92:191-198.

PRASAD M.N.V., 1995 - Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Experim. Botany.*, 35:525-545.

PROSI F., STORCH V., JANSSEN H.H., 1983 - Small cell in the midgut glands of terrestrial Isopoda. Sites of heavy metal accumulation. *Zoomorph.*, 102:53-64.

RABERGH C.M., AIRAKSINEN S., SOITAMO A., BJORKKLUND H.V., JOHANSSON T., NIKINMAA M., SISTONEN L., 2000 - Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J. Exp. Biol.*, 203:1817-1824.

RABINDRAN S.K., WISNIEWSKI J., LI L., LI G.C., WU C., 1994 - Interaction between heat shock factor and Hsp70 is insufficient to suppress induction of DNA-binding activity in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 14:6557-6561.

RAMISTELLA E.M., BELLIA M., DI MARE S., ROTIROTI G., DUSCIO D., 1990 - Inquinamento ambientale di origine industriale e mortalità per tumore. Revisione della situazione di Augusta e Priolo. *Bollettino dell'Accademia Gioenia di Scienze Naturali*, Catania 23:437-462.

REGGIORI F., KLIONSKY DJ., 2002 - Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot. Cell*, 1:11-21.

RENDELL J.L., FOWLER S., COCKSHUTT A., CURRIE S., 2006 - Development-dependent differences in intracellular localization of stress proteins (Hsps) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, following heat shock. *Comp. Biochem. Physiol., D* 1:238-252.

REYNOLDS E., 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17:208-212.

RICHARD G., FEDEROLF G., HABERMANN E., 1985 - The interaction of aluminium and other metal ions with calcium-calmodulin-dependent phosphodiesterase. *Arch. Toxicol.*, 57:257-259.

RIGGIO M., TRINCHELLA F., FILOSA S., PARISI E., SCUDIERO R., 2003 - Accumulation of zinc, copper, and metallothionein mRNA in lizard ovary proceeds without a concomitant increase in metallothionein content. *Mol. Reprod. Dev. Dec.*, 66:374-382.

RITOSSA F. M., 1962 - A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18:571-573.

ROMERO-ISART N., COLS N., TERMANSEN M.K., GELPI J.L., GONZALEZ-DUARTE R., ATRIAN S., CAPDEVILA M., GONZALEZ-DUARTE P., 1999 - Replacement of terminal cysteine with histidine in the metallothionein alpha and beta domains maintains its binding capacity. *Eur. J. Biochem.*, 259:519-527.

RUHLING A., TYLER G., 2004 - Changes in the atmospheric deposition of minor and rare elements between 1975 and 2000 in south Sweden, as measured by moss analysis. *Environ. Pollut.*, 131:417-423.

SAMSON S.L., GEDAMU L., 1998 - Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 59:257-288.

SATO M., SASAKI M., HOJO H., 1995 - Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6. *Arch. Biochem. Biophys.*, 316:738-744.

SCHILDERMAN P.A., MOONEN E.J., KEMPKERS P., KLEINJANS J.C., 1997 - Bioavailability of soil-adsorbed cadmium in orally exposed male rats. *Environ. Health Perspect*, 105:234-238.

SCUDIERO R., TEMUSSI P.A., PARISI E., 2005 - Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study. *Gene*, 345:21-26.

SHUGART L.R., MCCARTHY J.F., HALBROOK R.S., 1992 - Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Anal.*, 12:353-360.

SHUSTER C.N. JR. E PRINGLE B.H., 1969 - Trace metal accumulation by the American Oyster, *Crassostrea virginica*. 1968 *Proc. Nat. Shellfish. Assoc.*, 59:91-103.

SIMKISS K., 1976 - Intracellular and extracellular routes in bio-mineralization. *Symp. Coc. Exp. Biol.*, 30:423-444.

SIMKISS K., 1977 - Biomineralization and detoxification. *Calcif. Tiss. Res*, 24:199-200.

SMITH J.B., DWYER S.D., SMITH L., 1989 - Cadmium evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. Evidence for a cell surface receptor that cadmium stimulates and zinc antagonizes. *J. Biol. Chem.*, 264:7115-7118.

SMITH T.R., TREMBLAY G.C., BRADLEY T.M., 1999 - Hsp70 and a 54 kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. *J. Exp. Zool.*, 284:286-298.

SMUCKLER E.A., ARCASOY M., 1969 - Structural and functional changes of the endoplasmic reticulum of hepatic parenchymal cells. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 17:305-418.

SPORN A., DINU I., STOENESCU L., CIRSTEA A., 1969 - Beitrage zur Ermittlung der Wechselwirkungen zwischen Cadmium und Zink. *Nahrung*, 13:461-469.

STACEY N.H., CANTILENA L.R. JR, KLAASEN C.D., 1980 - Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 53:470-480.

STOEPLER M., 1991 - Cadmium. In: *Metals and their compounds in the environment*. (Merian E., Ed.). VCH, New York, p. 803.

STORCH V., 1982 - Der einfluss der ernährung auf die ultrastruktur der grossen zellen in den Mitteldarmdrüsen terrestrischer Isopoda (*Armadillidium vulgare*, *Porcellio scaber*). *Zoomorph.*, 100:131-142.

STORCH V., 1984 - The influence of nutritional stress on the ultrastructure of the hepatopancreas of terrestrial isopods. *Symp. Zool. Soc., London*, 53:167-184.

STORCH V., LEHNERT-MORITZ K., 1980 - The effects of starvation on the hepatopancreas of the isopod *Ligia oceanica*. *Zool. Anz.*, 204:137-146.

STORCH V., ŠTRUŠ J., 1989 - Microscopic anatomy and ultrastructure of the alimentary canal in terrestrial isopods. *Monit. Zool. Ital. (NS) Monogr.*, 4:105-126.

ŠTRUS J., BURKHARDT P., STORCH V., 1985 - The ultrastructure of the midgut glands in *Ligia italica* (Isopoda) under different nutritional conditions. *Helgoländer Meeresunters* 39:367-374.

SUNDERMAN F.W. JR, PLOWMAN M.C., KROFTOVA O.S., GRBAC-IVANKOYIC S., FOGLIA L., CRIVELLO J.F., 1995 - Effects of teratogenic exposures to Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , and Cu^{2+} on metallothionein mRNA contents of *Xenopus* embryos. *Pharmacol. Toxicol.*, 76:178-188.

SUZUKI K.T., YAMAMURA M., 1979 - Distribution of cadmium in liver and kidneys by loadings of various Cd-complexes and relative metal ratios in the induced metallothioneins. *Biochem. Pharmacol.*, 28:3643-3649.

SYRING R.A, HOEXUM-BROUWER T., BROUWER M., 2000 - Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 125:325-332.

TAMAI K.T., GRALLA E.B., ELLERBY L.M., VALENTINE J.S., THIELE D.J., 1993 - Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeastcopper-zinc superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 90:8013-8017.

THORNALLEY P.J., VASAK M., 1985 - Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta.*, 827:36-44.

TISSIERES A., MITCHELL H. K., TRACY V.M., 1974 - Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 84:389-398.

TRIEBSKORN R., KÖHLER H.R., 1992 - Plasticity of the endoplasmic reticulum in three cell types of slugs poisoned by molluscicides. *Protoplasma*, 169:120-129.

UDOM A.O., BRADY F.O., 1980 - Reactivation in vitro of zinc-requiring apo-enzymes by rat liver zinc-thionein. *Biochem. J.*, 187:329-335.

VALLEE B.L., ULMER D.D., 1972 - Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu. Rev. Biochem.*, 41:91-128.

VALLEE B.L., GLADES A., 1974 - The metallobiochemistry of zinc enzymes. *ADV. Enzymol.*, 56:283-430.

VALLEE B.L., MARET W., 1993 - The functional potential and potential functions of metallothioneins: a personal perspective. In: *Metallothionein III - Biological roles and medical implications*. (Suzuki K.T., Imura N., Kimura M., Eds.). Birkhauser Verlag, Basel Switzerland, pp. 1-27.

VALLS M., BOFILL R., ROMERO-ISART N., GONZALEZ-DUARTE R., ABIAN J., CARRASCAL M., GONZALEZ-DUARTE P., CAPDEVILA M., ATRIAN S., 2000 - *Drosophila* MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms. *FEBS Lett.*, 467:189-194.

VALLS M., BOFILL R., GONZALEZ-DUARTE R., GONZALEZ-DUARTE P., CAPDEVILA M., ATRIAN S., 2001 - A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The in vivo and in vitro metal

binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. J. Biol. Chem., 276:32835-32843.

VAN CAPELLEVEEN H.E., 1987 - Ecotoxicity of heavy metals for terrestrial isopods. Ph.D thesis, Free University Press, Amsterdam, pp. 79-89.

VASAK M., 1998 - Application of ¹¹³Cd NMR to metallothioneins. Biodegradation, 9:501-512.

VASAK M., OVERNELL J., GOOD M., 1987 - Spectroscopic and chemical approaches to the study of metal-thiolate clusters in metallothionein (MT). Experientia Suppl., 52:179-189.

VENUGOPAL B. E LUCKEY T.D., 1978 - Chemical toxicity of metals and metalloids. Metal Toxicity In: Mammals 2 Plenum Press, New York and London, pp. 24-32, 69-86, 185-195, 248-253, 275-283.

VOELLMY R., 1996 - Sensing stress and responding to stress. In: *Stress-inducible cellular responses*. (Feige U., Morimoto R.I., Yahara I., Polla B.S., Eds.). Birkhäuser Verlag Switzerland pp. 121-138.

WÄGELE J.W., 1992 - Isopoda. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (Harrison F.W., Humes A.G., Eds.). Wiley-Liss, New York, pp. 529-617.

WAHBA Z. E WAALKES M.P., 1990 - Effect on in vivo low-dose cadmium pretreatment on the in vitro interactions of cadmium with isolated interstitial cells of the rat testes. Fund. Appl. Toxicol., 15:641-650.

WASHBURN B.S., MORELAND J.J., SLAUGHTER A.M., WERNER I., HINTON D.E., SANDERS B.M., 2002 - Effects of handling on heat shock protein expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem., 21:557-560.

WEBB M., 1979 - The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. Elsevier North Holland Biochemical, New York.

WELCH W. J., 1993 - How cells respond to stress. Sci Am., 269:56-64.

WIESER W., 1968 - Aspect of nutrition and metabolism of copper in isopods. Am. Zool., 8:495-506.

WIESER W., BUSCH G., BIJCHEL L., 1976 - Isopods as indicators of the copper content of soil and litter. *Oecologia*, 23:107-114.

WINGE D.R., NIELSON K.B., 1984 - Formation of the metal-thiolate clusters of rat liver metallothionein. *Environ. Health Perspect.*, 54:129-133.

WINGE D.R., NIELSON K.B., GRAY W.R., HAMER D.H., 1985 - Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J. Biol. Chem.*, 260:14464-14470.

WITKUS R., HORGAN M.J., DOWLING P., KLEIN M., FASO L., 1987 - Comparative elemental analysis of the S and B cells of the hepatopancreas of *Armadillidium vulgare*, a terrestrial isopod. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol.*, 87:149-152.

YAMAMORI T., ITO K., NAKAMURA Y., TURA T., 1978 - Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. *J. Bacteriol.*, 134:1133-1140.

YAMASHITA M., YABU T., OJIMA N., 2010 - Stress Protein HSP70 in fish. *Aqua-BioSci. Monogr.*, 4:111-141.

ZAROOGIAN G.E., 1979 - Studies on the depuration of cadmium and copper by the American oyster *Crassostrea virginica*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 23:117-122.

ZAROOGIAN G.E., CHEER S., 1976 - Cadmium accumulation by the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Nature*, 261:408-410.

ZHU Z., DE ROSE E.F., MULLEN G.P., PETERING D.H., SHAW C.F., 1994 - Sequential proton resonance assignments and metal cluster topology of lobster metallothionein-1. *Biochem.*, 33:8858-8865.

ŽNIDARŠIČ N., TUŠEK-ŽNIDARIČ M., FALNOGA I., ŠČANČAR J., ŠTRUS J., 2005 - Metallothionein-like proteins and zinc-copper interaction in the hindgut of *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda) exposed to zinc. *Biol. Trace Elem. Res.*, 106:253-264.