

Università della Calabria



**SCUOLA DI DOTTORATO IN "LIFE SCIENCES"
DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE**

SSD: BIO/06

XXV CICLO

Dott.ssa Merylin Zizza

Merylin Zizza

**Effetti neuro-comportamentali del rame nei teleostei:
ruolo dell'HSP90 e del sistema ORXergico**

COORDINATORE

Prof.ssa Maria Carmela Cerra

Maria Carmela Cerra

TUTOR

Dott.ssa Rosa Maria Facciolo

Rosa Maria Facciolo

IL DIRETTORE DELLA SCUOLA

Prof. Marcello Canonaco

Marcello Canonaco

Indice

Riassunto.....	1
Abstract	5
Introduzione	9
Capitolo I.....	14
TOSSICITA' DEI METALLI PESANTI.....	15
I.1 I metalli pesanti.....	15
I.1.2 Neurotossicità	18
I.1.3 Alterazioni comportamentali.....	21
I.2 Il rame	23
I.2.1 Effetti del Cu ²⁺ sui pesci	26
Capitolo II	32
LA RISPOSTA ALLO STRESS A LIVELLO NEURONALE.....	33
II.1 Le HSPs	33
II.1.1 HSPs e stress nei pesci.....	35
II.2 HSP90: struttura e funzioni	37
II.2.1 Funzioni dell'HSP90 a livello neuronale.....	40
II.2.2 HSP90 e contaminanti ambientali	41
II.3 Il sistema ORXergico	42
II.3.1 Le Orexine	42
II.3.2 Recettori ORXergici	45
II.3.3 Distribuzione delle Orexine nell'encefalo dei vertebrati	48
II.3.4 Funzioni del sistema ORXergico.....	49
Capitolo III.....	58
MATERIALI E METODI.....	59
III.1 Modelli sperimentali	59
III.1.1 <i>Carassius carassius</i>	59
III.1.1.1 Ecologia e Biologia di <i>Carassius carassius</i>	59

III.1.1.2 Encefalo di <i>Carassius carassius</i>	62
III.1.2 <i>Thalassoma pavo</i>	68
III.1.2.1 Ecologia e Biologia di <i>Thalassoma pavo</i>	68
III.1.2.2 Encefalo di <i>Thalassoma pavo</i>	70
III.2 Mantenimento degli animali e trattamenti.....	79
III.2.1 Determinazione della LC ₅₀ e scelta delle concentrazioni	80
III.2.2 Trattamenti con ORX-A.....	82
III.2.3 Test di recupero.....	82
III.3 Analisi Comportamentale.....	83
III.4 Analisi citoarchitettoneica: colorazione di Nissl.....	84
III.5 Analisi neurodegenerativa.....	85
III.6 Studi d'espressione genica: ibridazione <i>in situ</i>	87
III.7 Analisi statistica	90
Capitolo IV.....	91
RISULTATI.....	92
IV.1 Effetti del CuCl ₂ a breve termine.....	92
IV.1.1 Effetti sul comportamento.....	92
IV.1.2 Effetti neurodegenerativi.....	98
IV.1.3 Effetti sull'espressione dell'HSP90	99
IV.2 Effetti dell'ORX-A sulle alterazioni Cu ²⁺ -indotte	104
IV.2.1 Effetti dell'ORX-A sul comportamento.....	104
IV.2.2 Effetti dell'ORX-A sui fenomeni neurodegenerativi.....	109
IV.2.3 Effetti dell'ORX-A sulla trascrizione dell'HSP90.....	111
IV.3 Valutazione del recupero	115
IV.3.1 Recupero delle alterazioni comportamentali.....	115
IV.3.2 Valutazione del recupero dai danni neuronali.....	123
IV.3.3 Risposta trascrizionale in seguito a recupero	125
IV.4 Esposizione cronica al CuCl ₂	129
IV.4.1 Alterazioni comportamentali.....	129

IV.4.2 Effetti neurodegenerativi del trattamento cronico.....	135
IV.4.3 Effetti trascrizionali del trattamento cronico.....	137
IV.5 Effetti dell'ORX-A dopo esposizione cronica al CuCl ₂	139
IV.5.1 Effetti dell'ORX-A sul comportamento.....	139
IV.5.2 Effetti dell'ORX-A sui fenomeni neurodegenerativi.....	143
IV.5.3 Effetti trascrizionali dell'ORX-A dopo esposizione cronica	144
Discussione	147
Bibliografia	155

Riassunto

Tra i metalli, il rame (Cu^{2+}), sebbene essenziale per il corretto metabolismo corporeo, può risultare un potente agente tossico in grado di promuovere pericolosi eventi nocivi, soprattutto nei pesci. Ad oggi, sono poche le informazioni sulla neurotossicità rame-dipendente e le risposte attivate per la difesa e riparazione da tale tossicità. Su questi presupposti, nel presente lavoro sono stati investigati gli effetti del cloruro di rame (CuCl_2), a diverse concentrazioni e tempi di esposizione, sia a livello comportamentale che neuronale nel teleosteo d'acqua dolce, *Carassius carassius*, e marino, *Thalassoma pavo*. Da un punto di vista molecolare, l'attenzione è stata indirizzata alle variazioni trascrizionali dell'Heat Shock Protein 90 (HSP90), *chaperon* con ruolo critico sia in condizioni fisiologiche che di stress. Alla luce di recenti evidenze che propongono il sistema orexinergico come cruciale nella coordinazione delle reazioni fisiologiche allo stress, è stata valutata anche la capacità dell'orexina-A (ORX-A), somministrata ogni giorno intraperitonealmente (10 ng/g peso corporeo) durante l'esposizione al Cu^{2+} , di modulare gli effetti neuro-comportamentali di tale metallo nei suddetti teleostei.

Il trattamento a breve termine (48h) con due concentrazioni di metallo, selezionate mediante *screening* preliminari in *Carassius carassius* (1.45 mg/L e 0.30 mg/L CuCl_2) e *Thalassoma pavo* (1.07 mg/L e 0.25 mg/L CuCl_2), ha causato evidenti alterazioni comportamentali. In particolare, il *feeding* è risultato notevolmente ($p < 0.001$; $p < 0.01$) ridotto, vs i controlli, in *Carassius carassius* e in *Thalassoma pavo*, rispettivamente. Nel primo pesce, la concentrazione di 1.45 mg/L ha causato anche una moderata ($p < 0.05$) riduzione dello *swimming*, accompagnata da un simultaneo incremento del *resting state*. In modo analogo, in *Thalassoma pavo*, la riduzione dello *swimming* durante l'esposizione alla più bassa concentrazione, si è tradotta in un concomitante incremento del *resting state*. Nei teleostei marini, esposti a 1.07 mg/L di metallo, l'assenza di effetti significativi sul *rest* era dovuta alla comparsa di *abnormal motor behaviors*, caratterizzati da perdita di equilibrio e movimenti repentini ed improvvisi. In *Carassius carassius* tali atteggiamenti insorgevano solo moderatamente dopo 48h di esposizione alla alta concentrazione. Inoltre, durante l'esposizione, entrambi i teleostei mostravano una considerevole tendenza a nuotare verso la superficie (*swimming towards surface*). Accanto agli effetti sul comportamento, l'Amino Cupric Silver Stain ha anche mostrato segni di neurodegenerazione a carico dei neuroni, soprattutto nel nucleo laterale del telencefalo dorsale (DL) degli esemplari esposti alle alte concentrazioni di contaminante. Parallelamente, l'ibridazione *in situ* ha fatto registrare nell'encefalo di *Thalassoma pavo*, trattato con la concentrazione più alta, un'*up-regulation* dell'HSP90 in differenti nuclei, come DL (+87%). In *Carassius carassius* la risposta

trascrizionale è stata invece meno evidente, con moderati incrementi dell'mRNA rinvenuti, ad esempio, nella valvola del cervelletto (VCe; +31%), in seguito a trattamento con la più alta concentrazione che causava anche moderate *down-regulations* a livello del telencefalo.

E' stato interessante notare che molte delle alterazioni comportamentali venivano ridotte dalla somministrazione di ORX-A, soprattutto a livello del *feeding* di entrambi i teleostei. In *Carassius carassius* si è potuto osservare, inoltre, una riduzione degli *abnormal motor behaviors* e dello *swimming towards surface*. Anche a livello neurodegenerativo, l'ORX-A è stata in grado di prevenire i danni indotti dal Cu^{2+} , come nel DI di *Carassius carassius* esposto alla più alta concentrazione. Dal punto di vista molecolare, l'ORX-A ha prevenuto la *down-regulation* indotta dal metallo in DI, favorendo addirittura una moderata *up-regulation* del trascritto in TLo (+32%) di *Carassius carassius* esposto a 1.45 mg/L di CuCl_2 , rispetto ai controlli. Anche in *Thalassoma pavo*, il neuropeptide induceva una significativa *up-regulation* dell'espressione di HSP90, come nel nucleo laterale del telencefalo ventrale (VL; +92%) durante esposizione alla concentrazione più bassa di CuCl_2 . Quando i pesci esposti al Cu^{2+} per 48h sono stati trasferiti in acqua priva di metallo, molti deficit neuro-comportamentali erano, almeno parzialmente, ripristinati. Inoltre, quasi tutti i nuclei encefalici di entrambi i teleostei, esposti alla più alta concentrazione, hanno mostrato incrementi significativi dell'mRNA per l'HSP90, sia rispetto al precedente trattamento che ai controlli.

Alla luce dei dati ottenuti e in virtù del fatto che la bassa concentrazione aveva fatto rinvenire alterazioni neuro-comportamentali più lievi, in alcuni casi recuperabili, è stato interessante verificare gli effetti di questa stessa concentrazione in un trattamento cronico (21 giorni). Nel corso di tale trattamento, il *feeding* di *Carassius carassius* era drasticamente ridotto, rispetto ai controlli, a partire dal giorno 7 di esposizione mentre in *Thalassoma pavo* la riduzione diveniva elevata al giorno 14. A livello encefalico, si riscontrava una più estesa degenerazione che colpiva molti più campi neuronali, compreso il nucleo diffuso del lobo inferiore (NDLI). Al contempo, il trattamento cronico era responsabile di una generalizzata *up-regulation* dell'HSP90 in *Thalassoma pavo* e di un effetto trascrizionale sito-specifico in *Carassius carassius*. In quest'ultimo teleosteo, infatti, si riportavano *down-regulations* nel telencefalo (~-30%) e in NDLI (-55%), ed *up-regulations* in TLo (+30%), VCe (+43%) e nel corpo del cervelletto (CCe; +52%). La somministrazione di ORX-A al 21 giorno, sebbene causasse un'attenuazione degli effetti del Cu^{2+} sul comportamento, non era però capace di ridurre i danni neuronali e, a livello trascrizionale, non influenzava in modo efficiente l'espressione dell'HSP90.

Nel complesso, i risultati di questo lavoro di Dottorato forniscono importanti evidenze degli effetti neuro-comportamentali del Cu^{2+} in *Carassius carassius* e *Thalassoma pavo*, sottolineando il coinvolgimento dell'HSP90 nei meccanismi di protezione e riparazione innescati a livello encefalico. In aggiunta a ciò, per la prima volta, si suggerisce l'implicazione del sistema ORXergico nell'attivazione di risposte adattative allo stress indotto dal Cu^{2+} , sia nei teleostei marini che d'acqua dolce.

Abstract

Among the different metals, copper (Cu^{2+}) although being an essential metal involved with some biological processes, it might behave as a toxic agent especially in fish. At date, little is known on Cu^{2+} -dependent neurotoxicity and about neuronal responses, which can be activated to protect and repair toxic events. On this basis, behavioral and neuronal copper chloride (CuCl_2) effects were investigated at different concentrations and exposure times in the freshwater fish, *Carassius carassius*, as well as in the marine teleost *Thalassoma pavo*. From a molecular point of view, attention was focused on the transcriptional variations of the Heat Shock Protein 90, (HSP90) *chaperone* with a critical role during both physiological and stress conditions. Moreover, in view of recent evidences that indicate orexinergic (ORX) system as a crucial neuroreceptor implicated in physiological reactions against stress, ORX-A was also tested to establish whether this neuronal system is capable of modulating metal neuro-behavioral effects in both teleosts, via daily intraperitoneal administrations of such a neuropeptide (10 ng/g body weight) during Cu^{2+} exposure.

Short-term (48h) treatment with the two different Cu^{2+} concentrations, which were selected on the basis of a preliminary study carried out in both *Carassius carassius* (1.45 mg/L and 0.30 mg/L CuCl_2) as well as *Thalassoma pavo* (1.07 mg/L and 0.25 mg/L CuCl_2), caused evident behavioral alterations. In particular, feeding activities resulted to be notably reduced ($p < 0.001$; $p < 0.01$) vs controls, in *Carassius carassius* and *Thalassoma pavo*, respectively. In the former fish species, a copper concentration of 1.45 mg/L also caused a moderate ($p < 0.05$) swimming reduction together with a concomitant increase of the resting state. In a similar manner, a reduction of swimming maneuvers in *Thalassoma pavo* during exposure to the lower metal concentration accounted for a simultaneous enhancement of the resting state. Conversely, the lack of any significant effects on resting states in marine teleosts exposed to 1.07 mg/L of Cu^{2+} was due to the onset of abnormal motor behaviors characterized by a loss of equilibrium during swimming gait along with rapid and sudden movements. In *Carassius carassius* these behaviors moderately appeared only after 48h of treatment with the higher metal concentration. Furthermore, Amino Cupric Silver Stain technique showed evident signs of neurodegeneration especially in the neuronal fields of the lateral part of the dorsal telencephalon (DI) of animals treated with higher copper concentrations. Concomitantly, *in situ* hybridization analysis displayed a general HSP90 up-regulation in different neuronal nuclei such as DI (+87%) of *Thalassoma pavo* treated with the higher Cu^{2+} concentration. On the contrary, transcriptional responses were less evident in *Carassius carassius*, with moderate mRNA enhancements in i.e. the cerebellar valvula (VCe; +31%) after the treatment with the higher

Cu²⁺ concentration. This same treatment also induced moderate HSP90 down-regulations at telencephalic level.

It was interesting to note that most behavioral alterations caused by Cu²⁺ were reduced by ORX-A administration especially in the case of feeding activities. Moreover, it was possible to observe an evident reduction of both abnormal motor behaviors and swimming towards surface in *Carassius carassius*. At the neurodegenerative level, ORX-A was able to prevent some neuronal damages induced by Cu²⁺, such as in DI of *Carassius carassius* exposed to the higher metal concentration. From a molecular point of view, ORX-A administration also prevented Cu²⁺-dependent HSP90 down-regulations in DI, thereby promoting a moderate transcriptional up-regulation in the torus longitudinalis (TLo; +32%) of *Carassius carassius* exposed to the same metal dose with respect to controls. In *Thalassoma pavo*, the neuropeptide also induced a significant HSP90 up-regulation such as in the lateral part of the ventral telencephalon (VI; +92%) during exposure to the lower CuCl₂ concentration.

When fish exposed to Cu²⁺ for 48h were transferred into a metal-free aquarium, some neuro-behavioral alterations were recovered, at least partially. In addition, most encephalic sites of both teleosts, which were previously treated with higher copper concentrations and then left in Cu²⁺-free water, showed significant increases of HSP90 mRNA, compared to either Cu²⁺-exposed fish or controls.

On the basis of the above data and in view of lower Cu²⁺ concentrations causing recoverable neuro-behavioral alterations, it was interesting to investigate the effects of this lower concentration during a chronic treatment of 21 days. Such a treatment caused drastically reduced feeding bouts of *Carassius carassius* from 7 days of exposure with respect to controls. On the other hand, an evident reduction of feeding became greater at 14 days in *Thalassoma pavo*. At the brain level, a more notable degeneration was detected in even greater neuronal fields including the diffuse nucleus of the inferior lobe (NDLI). At the same time, chronic treatment was responsible for a general HSP90 up-regulation in *Thalassoma pavo* while the transcriptional effect was site-specific in *Carassius carassius*. Indeed, in the latter teleost, HSP90 down-regulations were observed at both telencephalic level (~-30%) and NDLI (-55%) while some up-regulations were reported in TLo (+30%), VCe (+43%) and in the corpus of the cerebellum (CCe; +52%). The administration of ORX-A at 21 days, although causing an attenuation of Cu²⁺ behavioral effects, was not able to reduce neuronal damages and influence HSP90 expression.

Overall, results of my PhD study provide important evidences regarding neuro-behavioral effects of Cu^{2+} on *Carassius carassius* and *Thalassoma pavo*, as well as highlighting the involvement of HSP90 during protective and reparative mechanisms that are activated at the brain level. In addition the implication of the ORXergic system operating towards promotion of adaptive responses against Cu^{2+} -induced stress has been suggested, for the first time, in both marine and freshwater teleosts.

Introduzione

La contaminazione degli ecosistemi acquatici costituisce un serio pericolo per gli organismi che li popolano. In particolare, i metalli pesanti sono tra i più dannosi inquinanti dell'ambiente acquatico. Il dilavamento dei suoli agricoli nonché la vicinanza di impianti industriali o di zone di estrazione di minerali rappresentano la fonte primaria di inquinamento. L'elevata persistenza dei metalli nell'ambiente e la possibilità di eventi di bio-accumulo minacciano la sopravvivenza nei siti di contaminazione. I pesci sono particolarmente sensibili alla presenza di agenti tossici e per tale motivo sono considerati "sentinella" di contaminazione ambientale, utilizzabili anche per la valutazione dei potenziali rischi per la salute umana. Molti contaminanti sono infatti responsabili di gravi disturbi in processi neuronali cruciali per l'espletamento di importanti funzioni comportamentali, quali il comportamento riproduttivo o l'attività locomotoria, critiche per la sopravvivenza di intere specie (Scott e Sloman, 2004).

Soprattutto negli ultimi anni, l'analisi comportamentale ha rappresentato uno strumento altamente efficace negli studi tossicologici per la valutazione dell'impatto degli agenti tossici sulle specie esposte, in particolare i pesci. Le *performances* comportamentali di questi vertebrati acquatici sono caratterizzate dall'esecuzione di specifiche sequenze fisiologiche la cui alterazione può costituire un indice altamente attendibile di danni in specifici organi target. Tra i metalli, il rame (Cu^{2+}), sebbene essenziale per il mantenimento del corretto metabolismo corporeo, visto il suo coinvolgimento in numerosi processi biologici, superata la richiesta cellulare può risultare un potente agente tossico in grado di promuovere pericolosi eventi nocivi che vanno dall'instaurarsi di stati di stress ossidativo, al danneggiamento di DNA e proteine, e morte cellulare per necrosi o apoptosi (Bopp et al., 2008; Jomova e Valko, 2011; Levenson, 2005). I pesci risentono anche di basse concentrazioni di Cu^{2+} nell'ambiente, in quanto causa di numerose alterazioni fisiologiche prime fra tutte i disturbi respiratori e della ionoregolazione a livello branchiale (De Boeck et al., 2007; Pinho et al., 2007). L'epitelio branchiale rappresenta infatti il primo tessuto bersaglio dell'azione tossica del Cu^{2+} nei pesci, che si esplica principalmente attraverso l'inibizione della pompa $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasi}$ (Monteiro et al., 2005).

A livello del sistema nervoso, i meccanismi alla base della neurotossicità del Cu^{2+} non sono stati ancora del tutto chiariti; tuttavia, è noto che molti danni sortiti da questo metallo sono fortemente correlati alla sua abilità nel favorire la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che alterano la stabilità strutturale delle macromolecole biologiche ed in particolare delle proteine (Jomova e Valko, 2011). Ovviamente, gli organismi colpiti mettono in atto strategie per proteggersi, tollerare, limitare e riparare i danni indotti dai

metalli come il Cu^{2+} . Nella maggior parte dei casi, tali strategie si rivelano specie-specifiche, cosicché ogni specie reagirà in maniera differente durante o in seguito all'esposizione (Eyckmans et al., 2011). In risposta allo stress, il sistema nervoso svolge un ruolo chiave nell'attivazione di misure compensatorie e/o adattative che consistono, ad esempio, in modifiche trascrizionali che garantiscano la funzionalità dei processi neuronali per preservare le diverse funzioni fisiologiche. Tali strategie includono certamente le *Heat Shock Proteins* (HSPs), *chaperon* molecolari con ruolo critico nei meccanismi alla base della protezione e riparazione cellulare, la cui azione risulta particolarmente efficiente durante i fenomeni proteotossici (Chen e Zhou, 2009). Tra le HSPs, l'HSP90 è tra le più studiate nei pesci vista la sua implicazione nella risposta ad un ampio range di stress ambientali, compreso quello derivante dall'esposizione ad agenti inquinanti come i metalli pesanti (Liu et al., 2012). Inoltre l'HSP90, costitutivamente espressa a livello encefalico, è coinvolta nei meccanismi che assicurano un'adeguata neurotrasmissione come il corretto inserimento dei recettori neuronali nella membrana delle cellule nervose o la liberazione dei neuromediatori dalla membrana pre-sinaptica (Gerges et al., 2004; Sakisaka et al., 2002).

Accanto all'intervento delle HSPs, studi recenti hanno iniziato a focalizzare l'attenzione sul coinvolgimento del sistema neuro-peptidergico dell'orexina (ORX) durante situazioni di stress promosse da agenti tossici nei pesci (Zizza et al., 2012). Questo sistema neuronale è ormai ritenuto uno dei principali protagonisti della regolazione di diverse attività vitali per gli organismi come il ciclo sonno/veglia (Ohno e Sakurai, 2008), il comportamento alimentare (Sakurai, 1999) e l'attività locomotoria (Matsuda et al., 2011; Thorpe e Kots, 2005). Più di recente, nei mammiferi, il sistema ORXergico è stato proposto come importante promotore di diverse reazioni stress-associate, quali modifiche della pressione sanguigna, del battito cardiaco, del consumo di ossigeno e della temperatura corporea (Berridge et al., 2010). Nonostante, diverse osservazioni sperimentali hanno definitivamente assegnato al sistema ORXergico un ruolo chiave nelle condizioni di stress, poche sono le informazioni ad oggi disponibili sul suo coinvolgimento durante tali condizioni nei pesci, soprattutto per quanto riguarda gli eventi derivanti dall'esposizione a contaminanti ambientali.

Alla luce di quanto esposto, nel presente lavoro verranno valutati gli effetti neuro-comportamentali del Cu^{2+} nel teleosteo marino *Thalassoma pavo* e nel teleosteo d'acqua dolce *Carassius carassius*. La scelta del primo teleosteo come modello sperimentale si è basata sulla sua grande validità in ambito neurotossicologico, già ampiamente dimostrata e

documentata (Zizza et al., 2012; Giusi et al., 2005). Nel caso del ciprinide *Carassius carassius*, le motivazioni che mi hanno spinto a selezionarlo nella sperimentazione sono dovute soprattutto alla sue elevate capacità adattative e di resistenza a condizioni ambientali avverse (Vornanen et al., 2011). I suddetti modelli animali verranno esposti per 48h a due concentrazioni di Cu^{2+} sottoforma di CuCl_2 , una più alta e una più bassa, selezionate in ciascun teleosteo sulla base di *screening* preliminari, per investigare gli effetti a breve termine del contaminante. Inoltre, saranno constatate le capacità di recupero e la reversibilità del danno rilevato nel precedente periodo di esposizione, trasferendo alcuni esemplari in acqua priva di contaminante per un periodo corrispondente a quello di esposizione al metallo.

In un primo momento i pesci, esposti al Cu^{2+} come riportato in precedenza, saranno monitorati durante le principali attività vitali dei teleostei (*feeding, swimming e resting*). L'analisi comportamentale consentirà di appurare sia l'entità delle eventuali alterazioni di queste attività fisiologiche sia la possibilità che tali *performances* ritornino alla normalità durante il test di recupero. Lo studio comportamentale sarà affiancato da studi di espressione genica tramite ibridazione *in situ* (ISH), mirati a verificare eventuali variazioni nel pattern di espressione dell'HSP90 in specifici nuclei encefalici. Inoltre, considerata la capacità dei metalli pesanti di indurre neurodegenerazione (Giusi et al., 2005; Zizza et al., 2012), sarà effettuata un'analisi neurodegenerativa, tramite Amino Cupric Silver Stain (ACS), per verificare i possibili danni mediati dai suddetti trattamenti nelle medesime aree encefaliche. Questa tecnica sarà indispensabile anche dopo la permanenza degli animali trattati in acqua priva di Cu^{2+} , per verificare che in specifici siti encefalici esista la possibilità di riparazione del danno indotto dal metallo.

E' noto che durante periodi di lunga esposizione, gli organismi hanno più tempo per poter attuare strategie difensive che gli consentano di meglio tollerare la presenza dell'agente tossico; al contempo, un'esposizione prolungata può alterare, a volte in modo irreversibile, importanti funzioni neurofisiologiche fino a minacciare la sopravvivenza dell'animale. Per tale motivo, gli animali saranno esposti anche a trattamento cronico con la concentrazione più bassa del Cu^{2+} , per indagare gli effetti neuro-comportamentali prodotti da un'esposizione prolungata al metallo. Tali dati saranno poi confrontati con quelli a breve termine, indotti sia dalla concentrazione più bassa che da quella più alta.

In aggiunta a ciò, in questo lavoro sarà indagata l'influenza del sistema ORXergico sulla modulazione delle risposte neuro-comportamentali allo stress indotto dal metallo, sia a breve termine che in seguito al periodo di esposizione cronica. Per questa parte, gli

animali saranno sottoposti ad iniezioni intraperitoneali (i.p.) di ORX-A contemporaneamente all'esposizione al CuCl_2 . Si valuterà, in questo modo la capacità del neuropeptide di prevenire alcune alterazioni neuro-comportamentali metallo-dipendenti oltre che verificare eventuali misure compensatorie e adattative da esso stimulate per meglio fronteggiare gli effetti tossici del Cu^{2+} .

In conclusione, i risultati del presente lavoro potrebbero fornire valide indicazioni sulle alterazioni delle principali attività fisiologiche indotte dal Cu^{2+} su due teleostei, *Carassius carassius* e *Thalassoma pavo*. Al tempo stesso, i risultati molecolari e della neurodegenerazione potrebbero da un lato assegnare un ruolo fondamentale all'HSP90, come eventuale *marker* di neuroprotezione e riparazione contro la tossicità del Cu^{2+} , e dall'altro proporre il sistema ORXergico come importante regolatore delle risposte attivate, a livello neuronale, contro la tossicità di questo e simili contaminanti ambientali nei teleostei marini e d'acqua dolce.

Capitolo I

TOSSICITA' DEI METALLI PESANTI

I.1 I metalli pesanti

I metalli pesanti sono tra i più pericolosi inquinanti degli ambienti acquatici. La loro elevata presenza nell'ambiente è strettamente correlata ad un continuo utilizzo in ambito industriale, tecnologico, agricolo, medico e domestico (Tchounwou et al., 2012). Grazie alla loro elevata persistenza ambientale i metalli pesanti tendono ad accumularsi in acque e sedimenti causando a volte l'inquinamento di interi corpi idrici (Linnik e Zubenko, 2000). L'esposizione ai metalli pesanti costituisce una minaccia per la sopravvivenza degli organismi che popolano i siti contaminati (Scott e Sloman, 2004).

Accanto ai metalli con azione prevalentemente tossica come piombo (Pb^{2+}), cadmio (Cd^{2+}), alluminio (Al^{2+}) o mercurio (Hg^{2+}) esistono metalli definiti "essenziali" quali ad esempio ferro (Fe^{2+}), zinco (Zn^{2+}) e Cu^{2+} in quanto indispensabili per l'espletamento di numerose funzioni biologiche. Ciononostante anche questi ultimi sono dotati di elevate potenzialità tossiche. Difatti, quando la loro concentrazione supera la richiesta cellulare si può incorrere in pericolosi fenomeni di tossicità. Il destino intracellulare dei metalli essenziali e non, dipende dai livelli intracellulari di due importanti molecole presentati gruppi tiolici quali il glutatione (GSH) e le metallotioneine (MT) (Lange et al., 2002). Il GSH coinvolto nei meccanismi di difesa intracellulare contro l'azione tossica di diverse sostanze, è in grado di modificare la tossicità dei metalli, chelandoli subito dopo il loro ingresso nelle cellule e formando complessi stabili come nel caso del GS-Cu(I) (Canesi et al., 1999; Gravato et al., 2006). Le MT, invece, sono proteine a basso peso molecolare, caratterizzate da un numero elevato di residui cisteinici, implicate nel trasporto e dunque nell'omeostasi di metalli essenziali bivalenti come Cu^{2+} e Zn^{2+} e nella difesa cellulare da metalli non essenziali e da altri agenti tossici (Miyayama et al., 2012; Ceyhun et al., 2012). La tossicità dei contaminanti metallici presenti nei diversi habitat (acquatico e terrestre) dipende, sia dalla concentrazione dei metalli stessi, sia dalla sensibilità degli organismi esposti al metallo (Macken et al., 2009). I metalli pesanti inducono nell'organismo alterazioni neurofisiologiche, biochimiche e comportamentali (Scott e Sloman, 2004) come risultato della loro interazione con differenti molecole biologiche all'interno delle cellule o con sistemi recettoriali, a livello dei quali mediano azioni agonistiche o antagonistiche, che producono una cascata di eventi deleteri per la fisiologia degli organismi (Giusi et al., 2010). Alcuni metalli, infatti, interferiscono con l'attivazione di differenti proteine cellulari

come le proteine attivate da mitogeni (MAP K; Kang et al., 2001) e con il metabolismo del calcio (Ca^{2+}) inducendo apoptosi attraverso attivazione delle caspasi (Fig. I.1).

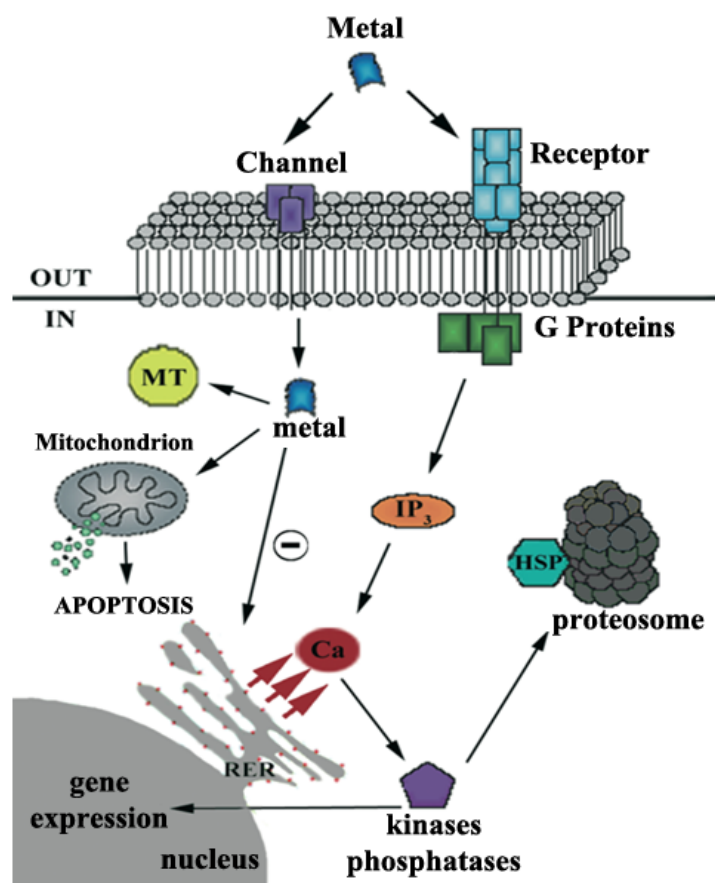


Fig. I.1 Effetti dei metalli a livello cellulare. I metalli pesanti possono entrare nelle cellule attraverso specifici canali o interagire con recettori accoppiati a proteina G. Una volta dentro la cellula possono interferire con il metabolismo del Ca^{2+} a livello mitocondriale e condurre all'apoptosi attraverso l'attivazione delle caspasi. L'accumulo di metalli pesanti nel citoplasma può inoltre, indurre la sintesi e l'attivazione di specifici complessi enzimatici coinvolti nella detossificazione cellulare e sequestro dei metalli come le MT e le HSPs, associate al proteasoma, responsabili del *refolding* delle proteine (Giusi et al., 2010).

Molti metalli pesanti fungono anche da pericolosi *Endocrine disruptors* (EDs) ovvero distruttori endocrini capaci di interferire con la normale attività dell'asse ipotalamo-ipofisi e disregolare importanti funzioni ormonali degli organismi. Tra questi, il Cd^{2+} funge da inibitore dei recettori estrogenici (Le Guével et al., 2000) e disturba la produzione dell'ormone della crescita (Jones et al., 2005), mentre il Pb^{2+} inibisce la sintesi degli ormoni tiroidei causando alterazioni del metabolismo dello iodio (Chaurasia et al., 1996). Anche il Cu^{2+} durante un'esposizione prolungata si comporta da interferente endocrino in quanto promotore di severe alterazioni dello sviluppo sessuale, delle funzioni riproduttive e

del rilascio di ormoni tiroidei (Colborn, 2002). Alcuni metalli tendono anche ad accumularsi nelle gonadi, influenzando negativamente la produzione dei gameti e la motilità degli spermatozoi, condizioni essenziali per la fecondazione. Inoltre, essi sono capaci di agire direttamente a livello embrionale, le conseguenze che ne derivano dipendono dalla quantità del metallo accumulatosi nelle uova e generalmente determinano un numero ridotto delle larve, piccole dimensioni corporee, anomalie morfologiche e funzionali e scarsa vitalità (Jeziarska et al., 2009).

Numerosi effetti nocivi legati all'esposizione ai metalli si devono alla loro capacità di interferire con meccanismi epigenetici. Nello specifico è stato dimostrato che molti metalli pesanti alterano la metilazione del DNA causando pertanto alterazioni dei livelli d'espressione di alcune proteine (Cheng et al., 2012; Fig. I.2).

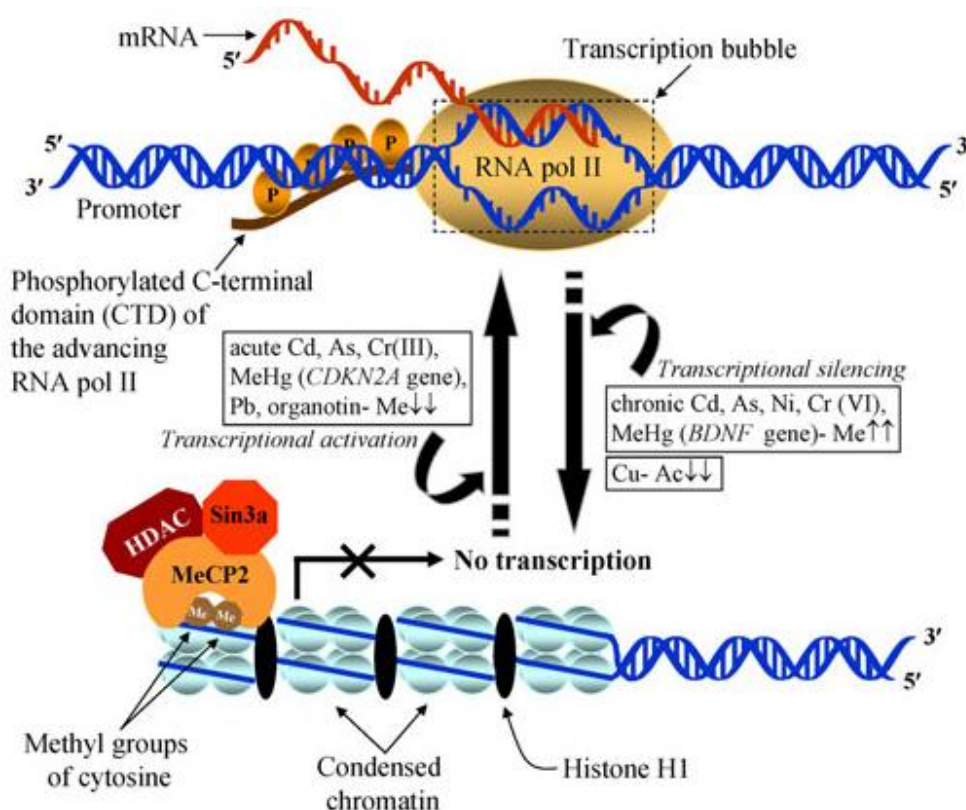


Fig. I.2 Modifiche epigenetiche indotte dai metalli pesanti. L'esposizione cronica ad alcuni metalli come il Cd^{2+} può promuovere ipermetilazione del DNA causando silenziamento genico. Al contrario, trattamento acuto con Cd^{2+} può indurre ipometilazione del DNA. L'esposizione al Cu^{2+} favorisce invece il silenziamento genico attraverso diversi meccanismi come l'ipoacetilazione istonica. Il silenziamento genico prevede l'azione coordinata di MeCP2 (*methyl CpG binding protein 2*), HDAC (*Histone deacetylase*) e Sin3A i quali favoriscono la condensazione della cromatina. Nella figura "Me" indica l'ipermetilazione del DNA mentre "Me" e "Ac" indicano rispettivamente l'ipometilazione del DNA e l'ipoacetilazione istonica (Cheng et al., 2012).

L'Arsenico As^{3+} è il metallo più studiato per gli effetti sul grado di metilazione del DNA. Numerosi studi *in vitro* hanno, infatti, dimostrato una sua associazione ad ipometilazione globale del DNA (Reichard et al., 2007) e ad ipermetilazione gene-specifica (Chanda et al., 2006). Il Cd^{2+} invece è in grado di ridurre la metilazione del genoma attraverso l'inibizione non competitiva della DNA metiltransferasi. E' stato inoltre proposto che la sua correlazione con l'insorgenza di tumori possa essere attribuita con l'inibizione mediata da questo metallo della metilazione di protooncogeni (Takiguchi et al., 2003). Tuttavia, una prolungata esposizione al Cd^{2+} può suscitare l'effetto contrario ovvero ipermetilazione globale del DNA e aumento dell'attività della DNA metiltransferasi (Cheng et al., 2012).

L'esposizione durante lo sviluppo al MeHg promuove la soppressione epigenetica dell'espressione di BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) nell'ippocampo e ciò sembra costituire un fattore di predisposizione alla depressione (Onishchenko et al., 2008).

1.1.2 Neurotossicità

Alcuni metalli pesanti si comportano da potenti neurotossine capaci di indurre neurodegenerazione o di alterare processi neuronali fondamentali. Il sistema nervoso rappresenta infatti uno dei principali target degli effetti di diversi contaminanti. Svariati agenti tossici, se sufficientemente lipofili o poco ionizzati, riescono ad oltrepassare la barriera ematoencefalica (BEE) e ad agire direttamente a livello di specifici siti encefalici. E' stato dimostrato che alte concentrazioni di Pb^{2+} causano la perdita della normale funzione della BEE (Bressler et al., 1999). Il Pb^{2+} tende ad accumularsi a livello delle cellule endoteliali encefaliche influenzando dunque l'interazione tra queste ultime e gli astrociti (Goldstein, 1990) elementi cellulari fondamentali nella costituzione della BEE. La loro interazione con le cellule endoteliali regola la funzionalità della barriera stessa e un'esposizione a metalli come il Pb^{2+} può dunque danneggiarne severamente l'integrità. Anche il MeHg raggiunge facilmente il SNC dove è in grado di indurre processi degenerativi (Galli et al., 2004).

L'esposizione ai metalli pesanti è stata altresì associata all'insorgenza di alcune malattie neurodegenerative. E' stato proposto, ad esempio, il coinvolgimento del Pb^{2+} nella patogenesi della malattia di Alzheimer. In particolare, l'esposizione a questo metallo durante la vita fetale sembra interferire con i normali meccanismi di metilazione del DNA tramite inibizione dell'attività della DNA metiltransferasi. Una riduzione dello stato di

metilazione dei siti CpG nel promotore del precursore della proteina amiloide (APP) si traduce, pertanto, in un incremento trascrizionale del gene a valle. Un simile effetto incide pesantemente sulla produzione della proteina β -amiloide durante la vita adulta e senile (Basha et al., 2005), evento determinante nella formazione delle placche amiloidi (White et al., 2007). In soggetti affetti da Alzheimer sono stati, invece, riscontrati elevati livelli encefalici di Cu^{2+} e l'aggregazione della proteina β -amiloide sembra essere favorita proprio dalla presenza di questo metallo (Strausak et al., 2001). E' noto, inoltre, che il Cu^{2+} essendo coinvolto nei processi cellulari e molecolari che regolano l'apoptosi neuronale, che sta alla base dell'insorgenza di alcune malattie neurodegenerative, può essere un fattore scatenante non solo per l'Alzheimer ma anche per il morbo di Parkinson e la sclerosi laterale amiotrofica (Levenson, 2005). Alla stregua del Cu^{2+} sia l' Al^{2+} che il Pb^{2+} sono stati correlati alla patogenesi del Parkinson. Nello specifico un alto contenuto di Al^{2+} è stato rinvenuto nel siero di pazienti affetti da Parkinson (Ahmed et al., 2010). L'associazione del Pb^{2+} con il Parkinson è supportata, anche, da studi *in vivo* in cui ratti neonati esposti ad alte dosi di metallo presentavano danni a livello dei neuroni dopamimergici dello striato (White et al., 2007).

L'instaurarsi di una condizione di stress ossidativo costituisce una delle possibili cause di neurotossicità mediata da molti metalli che promuovendo la formazione di radicali liberi sono in grado di causare alterazioni alle macromolecole biologiche. E' stato dimostrato che Al^{2+} sia causa di danno ossidativo a livello nervoso. Difatti, nell'encefalo di ratti esposti a questo metallo è stato riscontrato un aumento della malondialdeide, prodotto di perossidazione lipidica nonché aumento dell'ossidazione proteica (Sharma et al., 2012). Anche per il Hg^{2+} alcune evidenze suggeriscono come esso sia in grado di indurre danni al sistema nervoso accelerando la sintesi di ROS (Xu et al., 2012). Anche metalli come Fe^{2+} e Cu^{2+} presenti nella maggior parte dei compartimenti cellulari, sebbene essenziali, sono riconosciuti per le loro proprietà pro-ossidanti responsabili di disfunzioni neurologiche e di altri disturbi patologici correlati a danno ossidativo (Jomova e Valko, 2011). Lo stress ossidativo si instaura, anche quando si assiste a deplezione dei meccanismi antiossidanti o nel momento in cui essi vengono alterati. A tal proposito, è stato osservato che l'esposizione ad alcuni metalli comporta una riduzione dell'efficienza o dei livelli dei sistemi antiossidanti cellulari. Il Hg^{2+} , ad esempio, è in grado di causare a livello del SNC una deplezione di glutazione (GSH) nonché una riduzione dell'attività degli enzimi glutazione reduttasi (GR) e glutazione perossidasi (GPx) (Stringari et al., 2008; Roos et al., 2009). Nel caso dell' Al^{2+} è stata dimostrata, invece, una correlazione oltre che con

l'aumento di radicali liberi anche con la deplezione del GSH e di enzimi antiossidanti come la GPx nell'encefalo di femmine di ratto esposte a $AlCl_3$ durante la gestazione e nel periodo post-parto (Sharma e Mishra, 2006).

A tal riguardo, l'encefalo dei pesci sembra possedere una spiccata sensibilità ai ROS. Studi effettuati su alcuni pesci hanno evidenziato come a seguito dell'esposizione a metalli pesanti, essi incorrevano in danni a livello neuronale correlati all'instaurarsi di stress ossidativo (Mieiro et al., 2011). In merito è stato osservato che l'esposizione del teleosteo *Cyprinus carpio* a nanoparticelle di Ag determinava a livello encefalico una sostanziale diminuzione dell'attività di alcuni enzimi antiossidanti come la glutatione-S-trasferasi (GST) in concomitanza ad alterazioni istopatologiche (Lee et al., 2012).

Gli effetti dei metalli pesanti sul sistema nervoso e le alterazioni delle funzioni neuronali che ne conseguono sono inoltre fortemente associate alla capacità di interferire con i principali sistemi di neurotrasmissione deputati al controllo di importanti attività fisiologiche come quelli del GABA (acido γ -ammino butirrico) e del glutammato (GLU). Il Pb^{2+} ad esempio è uno dei metalli pesanti con più spiccate proprietà neurotossiche. Esso è responsabile di alterazioni dei sistemi aminergico e colinergico (Basha et al., 2012) sebbene non siano stati del tutto compresi gli esatti meccanismi con cui esplica la sua azione a questo livello. Meglio descritto risulta invece l'effetto di questo metallo sul sistema GLUergico. Dosi anche micromolari di Pb^{2+} sono in grado di bloccare il flusso di ioni attraverso il canale di membrana associato a una classe specifica di recettori del glutammato quelli NMDA (N-metil-D-aspartato). I recettori NMDA, appunto, attraverso il funzionamento del canale ionico, svolgono un ruolo fondamentale nella trasmissione sinaptica eccitatoria e risultano coinvolti attivamente nei processi di formazione delle reti neuronali, nonché nei processi che stanno alla base della memoria e dell'apprendimento (de Lima et al., 2005; McDonald et al., 2005). Sono proprio questi recettori ad essere uno dei bersagli critici del Pb^{2+} a livello dei neuroni del sistema nervoso centrale (SNC) (Toscano e Guilarte, 2005). A questo livello viene alterata anche la neurotrasmissione del sistema GABAergico. Numerose evidenze suggeriscono, ad esempio, che il Pb^{2+} inibisca il rilascio del GABA (Xiao et al., 2006), compromettendone di conseguenza la trasmissione sinaptica.

Il Pb^{2+} , inoltre, mimando l'azione del Ca^{2+} (Garza et al., 2006), è in grado di influenzare il rilascio dei neurotrasmettitori a livello delle terminazioni nervose. In particolare, si assiste ad una riduzione della fusione delle vescicole sinaptiche alla membrana pre-

sinaptica, con conseguente diminuzione della liberazione dei neurotrasmettitori nello fessura sinaptica (Toscano e Guilarte, 2005).

Il sistema neuronale istaminergico implicato nella regolazione di diverse funzioni neurobiologiche e fisiologiche, sembra essere un altro target neuronale degli effetti tossici di metalli quali il Cd^{2+} , il Pb^{2+} (Giusi et al., 2010) la cui alterazione si traduce, a livello comportamentale, in evidenti deficit motori (Santos et al., 2003).

L'esposizione ai metalli può determinare, inoltre, alterazioni delle funzioni neuroendocrine influenzando anche funzioni cognitive complesse (White et al., 2007). Tra i metalli, il Pb^{2+} e il Cu^{2+} sono capaci di interferire con il funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), come confermato dalle variazioni dei livelli di corticosteroidi indotte da tali contaminanti (Cory-Slechta et al., 2004; Dethloff et al., 1999). Un trattamento cronico con Pb^{2+} potrebbe comportare in alcuni casi addirittura un'alterazione permanente delle funzioni dell'asse HPA (White et al., 2007). Un'esposizione al Cu^{2+} invece, causando la perdita della capacità di rispondere alla melatonina circolante (Handy, 2003), disturba i ritmi circadiani dei pesci e ciò ben si correla con i disturbi motori riscontrati negli individui esposti a tale metallo considerato il ruolo esercitato dalla melatonina nella regolazione delle attività motorie (Nelson, 1995).

Pertanto le alterazioni di importanti funzioni neuronali e neuroendocrine promosse da questi metalli in concomitanza con quelle suscitate in altri organi target causando disturbi motori, ormonali e della sfera cognitiva possono sfociare in severe modifiche di alcuni comportamenti complessi che sussistono in natura.

1.1.3 Alterazioni comportamentali

Le alterazioni del comportamento indotte dai contaminanti ambientali, ivi inclusi i metalli pesanti, rappresentano il risultato di eventi tossici sortiti a livello di specifici organi e tessuti target. Pertanto, gli effetti sul comportamento sono anche strettamente dipendenti dalle caratteristiche chimiche di ogni singola sostanza e dalla sua affinità per una determinata struttura cellulare o sistema enzimatico. I vertebrati acquatici sono gli organismi che risentono particolarmente della presenza di sostanze tossiche nell'ambiente e nello specifico i pesci rappresentano un modello eccellente per poter indagare la tossicità di numerosi composti, in quanto mostrando molteplici comportamenti ecologicamente rilevanti forniscono un indice sensibile dello stato di salute e dell'instaurarsi di condizioni di stress (Bervoets et al., 2005).

Numerose attività comportamentali dei pesci risultano severamente compromesse dall'esposizione ai metalli pesanti. Simili contaminanti sono in grado ad esempio di alterare le relazioni sociali tra conspecifici. Difatti, molte sostanze tossiche compresi alcuni metalli sembrano condizionare la formazione e il mantenimento di gerarchie. In particolare, pesci esposti al Cd^{2+} perdono la capacità di dominare pesci della stessa specie non esposti oltre a minacciare la formazione di una dominanza gerarchica tra gruppi (Sloman et al., 2003).

In aggiunta, molti metalli incidono anche sulla capacità di fuga dai predatori (Scott e Sloman, 2004). Tale effetto va sicuramente correlato all'abilità di alcuni di essi di causare alterazioni delle attività motorie come riportato non solo nei pesci (Giusi et al., 2008) ma anche nei mammiferi (Reddy et al., 2003). Le disfunzioni motorie derivanti dall'esposizione ai metalli possono essere attribuite ai loro effetti tossici a livello di specifici siti encefalici preposti al controllo di funzioni motorie come il cervelletto che rappresenta uno dei principali bersagli della neurotossicità di metalli come il Pb^{2+} (Müller et al., 2008) o essere il risultato della loro interferenza con il corretto funzionamento di sistemi di neurotrasmissione (Giusi et al., 2010). In alcuni casi la riduzione delle *performances* motorie potrebbe essere intesa come una misura protettiva volta a preservare ad esempio le riserve energetiche dell'organismo. Metalli come il Cu^{2+} o il Cd^{2+} promuovono nei pesci alterazioni della normale ventilazione e del consumo di ossigeno conseguenti ai danni da essi indotti a livello branchiale. Simili alterazioni hanno un immediato riscontro comportamentale ovvero si traducono in un incremento dell'inattività o in una riduzione della velocità di nuoto (Rajotte e Couture, 2002; De Boeck et al., 2006).

Alcuni metalli sono invece responsabili di disturbi del comportamento alimentare inteso come ricerca del cibo, abitudini alimentari, assimilazione delle sostanze nutritive e frequenza di assunzione del cibo. E' stato dimostrato che l'esposizione a Zn^{2+} o Cu^{2+} induce modifiche nel comportamento alimentare di *Cyprinus carpio* (Kuz'mina, 2011). Alterazioni di questa complessa attività comportamentale sono spesso correlate a danni a carico del sistema olfattivo (Kolmakov et al., 2009). La tossicità dei metalli pesanti a questo livello va ad incidere oltre che sull'alimentazione anche sulla capacità di sfuggire al pericolo avvertendo la presenza del predatore. Il Cd^{2+} è ormai largamente riconosciuto per la sua capacità di alterare tutti quei comportamenti olfatto-dipendenti. In merito è stato dimostrato che l'esposizione di *Oncorhynchus mykiss* al Cd^{2+} è in grado di abolire le risposte comportamentali e fisiologiche a sostanze di allarme alterando, dunque, le strategie antipredatorie dell'animale (Scott et al., 2003). In modo analogo l'esposizione

cronica durante lo sviluppo a questo stesso metallo comporta in *Danio rerio* una pressoché totale inibizione degli atteggiamenti antipredatori (Kusch et al., 2008).

I metalli pesanti sono in grado di disturbare anche tutti quei comportamenti associati alla riproduzione quali la ricerca del partner, il corteggiamento, l'accoppiamento, la cura e la sopravvivenza della prole. Il successo riproduttivo di una specie richiede che ognuno di questi comportamenti venga preservato. L'esposizione a metalli pesanti disturbando il naturale svolgimento di tali comportamenti, riduce pertanto il successo della riproduzione (Hammerschmidt et al., 2002). L'esposizione a Pb^{2+} e Hg^{2+} , ad esempio, sembra influenzare negativamente il corteggiamento, la deposizione delle uova, la scelta e la costruzione del nido (Scott e Sloman, 2004). E' stato dimostrato che il Hg^{2+} induce anche alterazioni del comportamento dei maschi favorendo un aumento dell'aggressività in alcuni pesci e inducendo letargia in altri. Tali effetti comportano una maggiore mortalità dei maschi. La progenie di pesci esposti a questo metallo è inoltre meno capace di riprodursi con successo (Matta et al., 2001). Il Cd^{2+} causa invece, una riduzione della fecondità e della frequenza della deposizione delle uova (Sellin e Kolok, 2006).

Tutti questi disturbi del comportamento possono rappresentare dunque un serio rischio ecologico e non riguardare esclusivamente la sopravvivenza del singolo animale. Gli effetti di una maggiore suscettibilità alla predazione, dell'instabilità delle interazioni sociali o della riduzione del successo riproduttivo si ripercuotono infatti su intere comunità o addirittura specie compromettendo l'intera catena alimentare e di conseguenza il naturale equilibrio degli ecosistemi (Bervoets et al. 2005; Scott et al., 2003).

I.2 Il rame

Il Cu^{2+} è un metallo essenziale implicato in svariati processi fisiologici. Esso infatti funge da importante cofattore in molte reazioni biochimiche. E' richiesto per l'attività catalitica di enzimi, quali la dopamina β -monoossigenasi deputata alla conversione della dopamina in norepinefrina, o la peptilglicina monoossigenasi α -amidante che promuove le modifiche post-traduzionali di numerosi neuroormoni e neuropeptidi come l'ossitocina, il neuropeptide Y, l'ormone di rilascio della tireotropina, la sostanza P, l'ormone di rilascio delle gonadotropine, la colecistochinina e l'ormone α -melanocita stimolante (α -MSH; Prigge et al., 2000; Stevenson et al., 2003). Questo metallo ha un ruolo centrale anche nell'eritropoiesi e nel metabolismo del Fe^{2+} , nonché nello sviluppo e nel mantenimento

dell'integrità strutturale e funzionale dell'apparato cardiovascolare, scheletrico e del SNC ed è fondamentale per il funzionamento della superossidodismutasi (SOD), uno dei più importanti *scavenger* di radicali liberi. Ricopre numerosi ruoli biologici anche a livello neuroendocrino, sebbene nei pesci non siano stati ancora del tutto chiariti. Nei mammiferi, è necessario, inoltre, per la disattivazione delle amine biogene, incluse noradrenalina e istamina (Linder, 1991), funge da cofattore per l'aminaossidasi presente in diversi tessuti ed è importante per il mantenimento della Cu^{2+} -ATPasi pineale, implicata nel mantenimento del ritmo circadiano dei mammiferi (Borjigin et al., 1999).

Nonostante il coinvolgimento di questo metallo in numerosi processi biologici, qualora i suoi livelli superassero la richiesta cellulare si incorrerebbe in pericolosi eventi di tossicità. Eccessi di Cu^{2+} sono infatti dannosi per le cellule considerata anche la sua capacità di inibire l'attività di proteine (Letelier et al., 2005) e di catalizzare la produzione del radicale ossidrilico e in definitiva danneggiare le componenti cellulari (Jomova e Valko, 2011). Sia deficienze che eccessi di Cu^{2+} possono dunque seriamente alterare le funzioni cellulari. L'omeostasi di questo metallo è pertanto un processo finemente regolato grazie ad una complessa rete di meccanismi complementari (Lutsenko, 2010). Le conseguenze devastanti di uno sbilanciamento nell'omeostasi del Cu^{2+} sono evidenti in due disordini genetici quali la malattia di Menkes e la malattia di Wilson, causati da mutazioni nelle ATPasi di tipo P, rispettivamente ATP7A e ATP7B, deputate al trasporto del metallo. Sebbene questi due trasportatori abbiano simili funzioni biochimiche, possiedono distinta espressione tissutale e durante lo sviluppo. Infatti, mentre ATP7A è ubiquitariamente espresso nei mammiferi, ATP7B possiede un'espressione più selettiva in fegato, rene, cellule epiteliali mammarie, encefalo e occhi. Pertanto, l'attività di ATP7A in un più ampio range di tessuti risulta critica per la fisiologia del metallo compreso l'assorbimento intestinale e a livello del Golgi per l'incorporazione in alcuni enzimi Cu^{2+} -dipendenti. La perdita della funzione di ATP7A caratterizza la malattia di Menkes, disordine letale dovuto a deficienza di Cu^{2+} . Al contrario mutazioni in ATP7B causano sintomi epatici e tossicità neuronale visto il ruolo specializzato di tale proteina in questi tessuti (Wang et al., 2011).

Il cervello concentra il Cu^{2+} per le sue funzioni, tuttavia, il contenuto di questo metallo essenziale varia nei diversi distretti encefalici con livelli maggiori nella sostanza grigia rispetto alla bianca (Becker et al., 2005; Dobrowolska et al., 2008). Si ritiene che l'ingresso nell'encefalo di questo metallo si realizzi principalmente come ione libero. Infatti, è stato mostrato che l'ingresso come ione libero nei capillari, nel plesso coroideo e nel fluido

cerebrospinale (CSF) è di molto superiore rispetto all'*uptake* del metallo legato all'albumina o alla ceruloplasmina (Choi e Zheng, 2009).

Alterazioni dell'omeostasi del Cu^{2+} a livello neuronale sono correlate all'invecchiamento (Serpa et al., 2008) e come già accennato alla patogenesi di malattie neurodegenerative (Bush, 2012; Gaggelli et al., 2006; Rivera-Mancia et al., 2010). Diverse evidenze suggeriscono un ruolo fondamentale degli astrociti nel mantenimento dell'omeostasi encefalica del Cu^{2+} . Analisi istochimiche hanno confermato che questo metallo è concentrato negli astrociti che ne regolano il rifornimento ai neuroni proteggendoli dalla sua potenziale neurotossicità. Questa protezione sembra includere sia meccanismi di trasporto, che prevedono la rimozione del metallo mediante *uptake* negli astrociti, che la stabilizzazione del GSH nei neuroni (Fig. I.3) (Scheiber e Dringen, 2012).

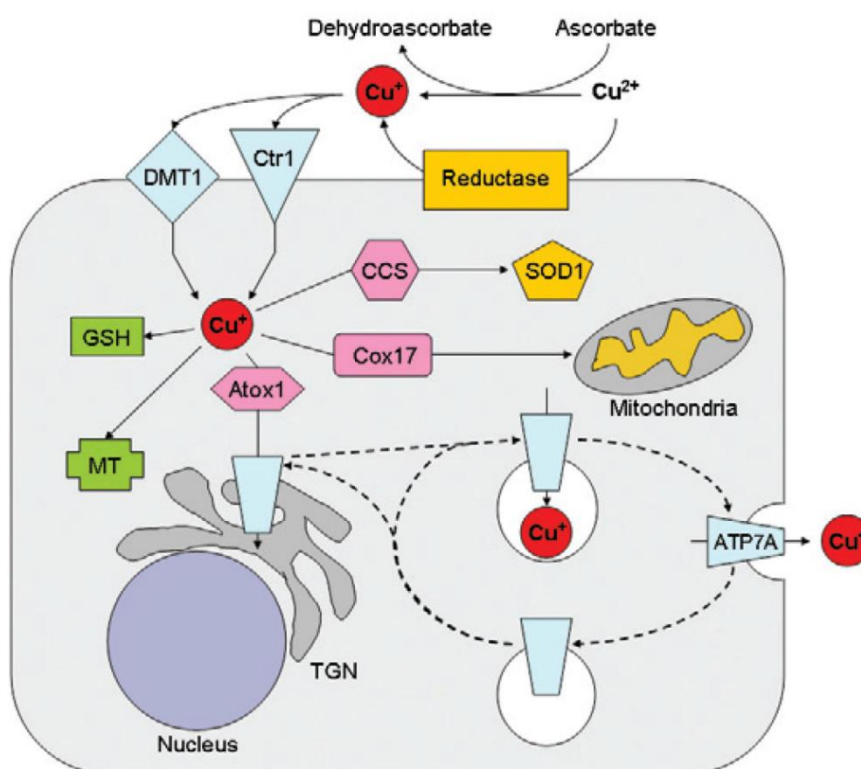


Fig. I.3 Metabolismo del Cu^{2+} negli astrociti. Il Cu^{2+} può entrare negli astrociti tramite Ctr1 (*copper transporter receptor 1*) e DMT1 (*divalent metal transporter 1*). Questi trasportatori preferiscono il Cu^+ come substrato pertanto sembra che gli ioni Cu^{2+} vengano ridotti per l'*up-take*. Negli astrociti il metallo viene sequestrato dal GSH, depositato nelle MT o veicolato verso target cellulari tramite specifici *chaperones* quali CCS (*copper chaperone for Cu/Zn superoxide dismutase*) che lo indirizza verso la SOD1, Cox17 (*Cytochrome c oxidase copper chaperone*) verso la citocromo c ossidasi e Atox1 (*antioxidant protein 1*) verso ATP7A che promuove il trasporto di Cu^+ nella regione trans del Golgi (TNG) per l'incorporazione nella ceruloplasmina. Quando i livelli cellulari di metallo crescono oltre una certa soglia ATP7A trasloca verso la membrana plasmatica per favorirne la fuoriuscita dalla cellula.

A livello encefalico è infatti noto che il Cu^{2+} è in grado di promuovere morte neuronale grazie alla sua abilità nell'innescare processi apoptotici tramite attivazione della proteina p53 che a seguito di un evento fosforilativo trasloca nel nucleo dove favorisce la trascrizione di geni pro-apoptotici, come Bax, che determinano a valle l'attivazione delle caspasi, o di geni coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare, della riparazione del DNA o della sopravvivenza cellulare. Una regione encefalica che risente particolarmente degli effetti tossici del Cu^{2+} sono i gangli della base. Questa spiccata sensibilità al Cu^{2+} potrebbe essere verosimilmente connessa all'elevato contenuto in dopamina che caratterizza tale area cerebrale. Questa catecolamina è infatti estremamente suscettibile al danno ossidativo e il prodotto della sua ossidazione, favorita dalla presenza di alti livelli di Cu^{2+} , agisce da potente agente neurotossico (Levenson, 2005).

1.2.1 Effetti del Cu^{2+} sui pesci

Per ovviare all'accumulo di Cu^{2+} e modularne l'utilizzo, gli organismi hanno evoluto meccanismi fisiologici e cellulari di regolazione (Luoma e Rainbow, 2005). Sebbene i pesci siano tra gli organismi viventi più sensibili alla presenza di Cu^{2+} nell'ambiente, essi hanno sviluppato dei sistemi di difesa specie-specifici contro l'azione tossica di questo metallo (Eyckmans et al., 2011). Diversi studi hanno, infatti, evidenziato la loro sorprendente abilità nell'attivare misure di protezione per meglio tollerare l'esposizione a concentrazioni sub-letali di Cu^{2+} (Eyckmans et al., 2011; Grosell et al., 2002; Hashemi et al., 2008).

La tossicità del Cu^{2+} per le specie acquatiche varia a seconda della specie presa in considerazione e dipende soprattutto da come l'organismo risponde al contaminante, dalla concentrazione dell'inquinante nell'ambiente e dalla sua biodisponibilità (De Oliveira-Filho et al., 2004). Il pericolo tossicologico, dovuto alle elevate concentrazioni di Cu^{2+} negli ecosistemi acquatici, riguarda sia gli organismi marini che quelli di acqua dolce, anche se gli effetti che si manifestano in seguito a una lunga esposizione al metallo sono stati maggiormente studiati nei pesci d'acqua dolce. Ad oggi, infatti, pochi sono i dati inerenti i meccanismi di tossicità di tale metallo nei teleostei marini.

I diversi studi, che si sono concentrati sulla fisiologia dei pesci esposti al Cu^{2+} , hanno rivelato variazioni significative di diverse funzioni vitali, quali l'osmoregolazione branchiale e gli scambi gassosi. Sono proprio i disturbi osmoregolatori (Grosell et al., 2004), indotti dal Cu^{2+} , la principale causa di morte negli organismi acquatici. In aggiunta, può verificarsi una compromissione della fisiologia intestinale (De Boeck et al., 2007).

Tutti gli organismi d'acqua dolce sono iperosmotici, rispetto all'ambiente circostante, e rientrano nella categoria degli osmoregolatori (Grosell et al., 2007); infatti la loro osmolarità è compresa tra 200 e 300 mosm/L, mentre quella dell'acqua dolce è molto inferiore ai 50 mosm/L. Questi organismi devono quindi disciplinare l'equilibrio interno acido-base ed espellere le scorie azotate (Grosell et al., 2007). Gli effetti più immediati, promossi da un'esposizione acuta al Cu^{2+} nei pesci, sono le alterazioni delle funzioni respiratorie e della ionoregolazione, come risultato della tossicità mediata da questo metallo a livello delle branchie (Linder, 1991; De Boeck et al., 2007; Pinho et al., 2007). L'epitelio branchiale, dotato di un'estesa superficie a stretto contatto con l'ambiente esterno, risulta dunque il target preferenziale degli effetti deleteri di numerosi contaminanti acquatici tra cui il Cu^{2+} (Pandey et al., 2008; Dang et al., 2000). A questo livello, il Cu^{2+} induce produzione di muco e rigonfiamento delle cellule epiteliali (Wood, 2001); tutti fenomeni che interferiscono con la respirazione e la ionoregolazione. In particolare, alcune evidenze suggeriscono che nei teleostei d'acqua dolce il Cu^{2+} sia in grado di determinare a livello branchiale l'inibizione dell'attività della pompa Na^+/K^+ -ATPasi (Monteiro et al., 2005) e diminuzione del numero di cellule del cloro (De Boeck et al., 2001). Nello specifico, l'inibizione della Na^+/K^+ -ATPasi può realizzarsi attraverso un legame aspecifico del metallo ai gruppi tioli sulla subunità del trasportatore (Lauren e McDonald, 1987; Li et al., 1998).

In aggiunta a ciò, questo metallo altera l'attività dell'anidrasi carbonica, enzima che regola lo scambio tra l'anidride carbonica (CO_2) e l'acido carbonico (HCO_3^-) alterando di conseguenza l'equilibrio acido-base (Zimmer et al., 2012). Tutto questo comporta cambiamenti isto-patologici dell'epitelio branchiale e variazioni dei parametri sistemici fisiologici (Johnson et al., 2007).

Contrariamente agli organismi d'acqua dolce, quelli marini sono iposmotici rispetto all'ambiente circostante e, poiché adattano la loro osmolarità all'ambiente esterno, sono classificati come osmoconformi (Grosell, 2006). Anche nei teleostei marini, l'esposizione al Cu^{2+} causa disturbi dell'equilibrio acido-base, probabilmente dovuti anche in questo caso ad un'inibizione dell'anidrasi carbonica. Dal momento che tale enzima è sensibile al Cu^{2+} , una sua *down-regulation* potrebbe essere la causa della ridotta capacità di scambiare gas a livello branchiale (Skaggs e Henry, 2002). Nei pesci marini, un accumulo di Cu^{2+} a livello branchiale potrebbe non essere così significativo come quello che si verifica nel pesce d'acqua dolce, a causa della concorrenza del Cu^{2+} con il Na^+ per il legame all'ATPasi branchiale, o della complessazione del Cu^{2+} con ligandi inorganici presenti

nell'acqua marina, con conseguente calo della biodisponibilità del Cu^{2+} stesso. Nonostante ciò, l'esposizione al Cu^{2+} in acque marine può comunque disturbare l'osmoregolazione, risultando in un guadagno netto di Na^+ .

Nei pesci l'esposizione acuta al Cu^{2+} è responsabile anche di disfunzioni neuroendocrine attribuibili ad un'alterata sintesi e/o secrezione di ormoni quali il cortisolo, l'ormone della crescita, gli ormoni tiroidei e la prolattina (PRL). Nei pesci la PRL essendo deputata alla regolazione del bilancio elettrolitico (Sangiao-Alvarellos et al., 2006) è fondamentale per il metabolismo, la crescita, lo sviluppo, la riproduzione, il comportamento e l'immunoregolazione (Power, 2005). In particolare, questo ormone induce un innalzamento della concentrazione di ioni nel plasma e riduce la permeabilità delle membrane e, di conseguenza, lo scambio di ioni con la superficie dell'acqua (Manzon, 2002). L'espressione della PRL viene innalzata a seguito di un'esposizione al Cu^{2+} , in *Oncorhynchus mykiss* diversamente da quanto accade in *Carassius gibelio* per il quale è stata riportata un'accentuata diminuzione (Eyckmans et al., 2010).

A livello comportamentale, il Cu^{2+} promuove severe alterazioni delle funzioni motorie dei pesci. In *Oncorhynchus mykiss* è stata, infatti, riscontrata una diminuzione delle capacità natatorie durante l'esposizione al metallo (De Boeck et al., 2006), e ciò potrebbe essere correlato sia all'aumento della richiesta di ossigeno che ad un'alterazione dell'escrezione di ammoniaca. In aggiunta, si assiste a un concomitante incremento della produzione di ammoniaca, stimolato dal cortisolo, che conduce ad un accumulo di tale sostanza, con conseguente depolarizzazione delle membrane delle cellule muscolari (De Boeck et al., 2006). Simili effetti sulle *performances* motorie sono stati rinvenuti, anche, in *Salmo trutta* esposto a livelli sub-letali di Cu^{2+} (Beaumont et al., 2003).

L'esposizione cronica al Cu^{2+} , a differenza dell'esposizione acuta, non danneggia l'integrità strutturale e funzionale di uno specifico organo, ma induce modifiche del sistema endocrino e neurologico con evidenti adattamenti fisiologici che consentono la sopravvivenza a lungo termine. Durante l'esposizione cronica, il Cu^{2+} tende ad accumularsi a livello di molti tessuti, quali branchie, fegato, reni e in misura minore nei muscoli (Grosell et al., 1996; McGeer et al., 2000a). Gli effetti tossici in specifici tessuti dei pesci mediati da trattamento prolungato con il Cu^{2+} vengono minimizzati grazie al fatto che questi organismi acquatici hanno una maggiore quantità di tempo per ridurre l'assorbimento di metallo, attraverso le branchie, e per ridistribuire la quantità di Cu^{2+} assorbito verso il fegato per poi espellerlo (Grosell et al., 1997, 1998). I pesci, infatti, in modo analogo a quanto accade nei mammiferi riescono a limitare i danni suscitati dal Cu^{2+}

regolandone il metabolismo a livello epatico (Buckley, 1996). Sembra sussistere, inoltre, una correlazione tra l'entità degli effetti tossici del Cu^{2+} nei pesci e le dimensioni corporee (Linder, 1991) tale per cui i pesci adulti e di grandi dimensioni sono più in grado di regolare la concentrazione di Cu^{2+} nel tessuto muscolare (Grosell et al., 1996) e nell'intestino (Handy et al., 2002), rispetto ai pesci più giovani e di piccole dimensioni appartenenti alla stessa specie.

In seguito ad un'esposizione cronica, molti processi fisiologici subiscono profonde variazioni (Handy, 2003). Accanto ai più scontati cambiamenti a livello branchiale (Dang et al., 1999), che comportano modifiche transitorie nella ionoregolazione, sono state riportate alterazioni a carico dell'epitelio intestinale (Berntseen et al., 1999) e del sistema immunitario (Dethloff e Bailey, 1998). A livello comportamentale, pesci esposti a trattamento cronico con il Cu^{2+} tendono a rallentare la velocità di nuoto, al fine di conservare energia metabolica (Handy et al., 1999) o, in alternativa, modificano il loro metabolismo per preservare la *performance* motoria (McGeer et al., 2000b). Da studi condotti su *Oncorhynchus mykiss* è stato evidenziato che l'esposizione cronica al Cu^{2+} , della durata di 3 mesi, induce una progressiva modifica del metabolismo aerobico con cambiamenti della morfologia delle branchie (aumento della lunghezza lamellare) e utilizzo delle riserve epatiche durante il primo mese di esposizione. Ciò consente agli animali di continuare a mantenere la loro capacità di nuoto volontario. Al terzo mese, le riserve epatiche di glicogeno si esauriscono e il pesce tende a diminuire il tempo speso nel nuoto, al fine di mantenere il bilancio energetico (Handy et al., 1999). Tra gli adattamenti che si verificano, in risposta alla tossicità del Cu^{2+} , vi sono modifiche cellulari in tessuti e organi. Queste possono includere aumenti o diminuzione del numero e/o della dimensione delle cellule, con conseguente variazione delle dimensioni di organi o tessuti. In *Oncorhynchus mykiss* è stata infatti riscontrata una considerevole diminuzione delle dimensioni degli epatociti dopo 2 mesi di esposizione al Cu^{2+} (Handy et al., 1999). I cambiamenti a livello cellulare possono includere anche rapidi *turnover* di particolari tipi di cellule. I cambiamenti nella proporzione cellulare all'interno di un tessuto sono stati ampiamente descritti nel caso delle cellule del cloro e delle cellule respiratorie, a livello branchiale, durante esposizione prolungata al Cu^{2+} (Li et al., 1998; Dang et al., 1999). Inoltre, in alcuni casi l'esposizione cronica al Cu^{2+} ha fatto riscontrare una migliore coordinazione dell'attività fisiologica rispetto al trattamento acuto; infatti, durante il trattamento di *Oncorhynchus mykiss* con Cu^{2+} per un periodo di 28 giorni, si è notata una diminuzione iniziale di circa il 50% della quantità massima di Na^+ assorbito, che

gradualmente veniva recuperato al protrarsi del periodo di esposizione. E' stato, infatti, osservato che le modifiche cellulari e fisiologiche durante periodi di prolungata tossicità, non sono eventi casuali ma rappresentano una serie temporalmente ordinata e sincronizzata di processi mirati al miglioramento delle condizioni e delle possibilità di sopravvivenza dell'animale.

La tossicità dei metalli induce anche alterazioni della risposta immunitaria. Sebbene le più importanti funzionalità dei componenti cellulari del sistema immunitario nonché i meccanismi alla base dell'immunità umorale sono ben conservati nei diversi vertebrati (Galloway e Handy, 2003), il sistema ematopoietico dei pesci è piuttosto differente da quello dei mammiferi; il tessuto linfoide è, infatti, rappresentato da piccoli gruppi di cellule, mentre nei mammiferi sono presenti linfonodi ben evidenti. L'esposizione al Cu^{2+} determina una riduzione dei linfociti circolanti e ciò sembra essere indice di un controllo sulla ridistribuzione dei globuli bianchi nel sistema immune, il quale è probabilmente mediato dal rilascio di cortisolo (Handy, 2003; Weyts et al., 1998). Tali modifiche potrebbero essere frutto di una fine regolazione realizzata a livello neuroendocrino. La stimolazione del rilascio di cortisolo, mediata dall'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale (HPI), corrispondente all'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) dei mammiferi, è la principale conseguenza di un'esposizione al Cu^{2+} (Handy, 2003) che tuttavia può in alcuni casi essere inibita dal metallo stesso (Tellis et al., 2012). Nei pesci d'acqua dolce l'incremento dei livelli di cortisolo, a breve termine, promuove il rilascio di globuli rossi nel circolo sanguigno e stimola l'assorbimento di ioni attraverso le branchie (McDonald e Milligan, 1997), mentre lo stress cronico è deleterio e la stimolazione prolungata del rilascio di tale ormone potrebbe essere causa della riduzione del numero di linfociti circolanti (Dethloff e Bailey, 1998). La risposta adrenergica che interviene in risposta all'esposizione ai metalli comporta un aumento di noradrenalina e/o adrenalina circolanti. Ciò può promuovere pertanto l'incremento dell'attività respiratoria (iperventilazione), della gittata cardiaca, del flusso di sangue ai muscoli e anche della mobilitazione di substrati per aumento del metabolismo aerobico (Handy, 2003). Dal momento che sia la risposta adrenergica che il rilascio di cortisolo (Dethloff et al., 1999) rimangono attivi durante l'esposizione cronica al Cu^{2+} è stato possibile rilevare che i sistemi neuroendocrini coinvolti in questi effetti rimangono intatti e funzionalmente attivi. Nei teleostei, la risposta adrenergica coinvolge il rilascio di catecolamine immagazzinate dalle cellule cromaffini, sparse all'interno della parte anteriore del rene e della vena cardinale posteriore (Reid et al., 1995; Sumpter, 1997). Difatti, il rene rimane morfologicamente integro durante trattamento prolungato con

il Cu^{2+} nonostante anche a livello di quest'organo sia stato riscontrato un accumulo di metallo (Handy et al., 1999; McGeer et al., 2000a). L'accumulo di Cu^{2+} nelle cellule cromaffini renali dei pesci potrebbe causare un aumento dell'attività di alcuni enzimi Cu^{2+} -dipendenti quali la dopamina β -idrossilasi, e stimolare di conseguenza il rilascio di catecolamine (Handy, 2003).

In seguito ad esposizione al Cu^{2+} , nell'encefalo di *Cyprinus carpio* sono state individuate differenti regioni encefaliche presentanti accumulo di metallo (De Boeck et al., 1995). In *Oncorhynchus mykiss* invece un trattamento cronico di 6 settimane con Cu^{2+} tramite l'alimentazione promuove morte neuronale a livello del tetto ottico (Handy, 2003). Questo metallo sembra inoltre capace di alterare le funzionalità dell'ipotalamo, tuttavia le modifiche neuroendocrine sembrano non essere strettamente correlate ad un accumulo di metallo a livello dei neuroni ipotalamici o a livello ipofisario (Tellis et al., 2012). Un'esposizione cronica determina importanti variazioni ormonali. In *Oncorhynchus mykiss*, ad esempio, dopo tre mesi di trattamento, è stata riscontrata perdita dei ritmi circadiani (Campbell et al., 2002). Uno studio recente ha mostrato invece che pesci trattati con Cu^{2+} per 40 giorni se esposti ad uno stress acuto aggiuntivo non esibiscono aumenti dei livelli di cortisolo circolante contrariamente ai controlli, abolendo dunque la risposta neuroendocrina post-stress. Un trattamento prolungato con il Cu^{2+} può alterare infatti il *signaling* dell'HPI e la perdita della risposta del cortisolo potrebbe rappresentare dunque una misura volta a limitare i costi durante uno stress cronico e non il risultato di una distruzione endocrina causata dalla tossicità del metallo (Tellis et al., 2012). Tuttavia, gli effetti di un'esposizione cronica potrebbero essere anche devastanti oltre certi limiti e disregolare in maniera irreversibile importanti funzioni fisiologiche.

Capitolo II

Con il termine “stress” ci si riferisce a tutti quegli eventi che minacciano o comunque disturbano l’omeostasi fisiologica (Sinha, 2008). Aspetto chiave durante lo stress è la prontezza con cui gli organismi rispondono all’evento stressante promuovendo una serie di reazioni fisiologiche e comportamentali compensatorie e/o adattative. Immediata sembra essere, infatti, la risposta neuroendocrina che si realizza principalmente attraverso l’HPA, la cui attivazione comporta a livello del nucleo paraventricolare (PVN) ipotalamico un incremento del rilascio del fattore di liberazione della corticotropina (CRF) che a sua volta stimolando l’ipofisi a secernere l’ormone adrenocorticotropo (ACTH) innalza la produzione di corticosteroidi (corticosterone/cortisolo). Sul piano comportamentale ciò sembra modulare una serie di atteggiamenti che vengono considerati come tipici dello stress. Lo stress sembra produrre, infatti, un innalzamento della “vigilanza” (Berridge et al., 2010) che non necessariamente comporta un incremento dell’attività motoria. Alcune di queste reazioni comportamentali sono il risultato di una fine regolazione attuata a livello encefalico mirata a limitare i danni indotti dall’instaurarsi di uno stato di stress e a preservare le principali funzioni fisiologiche. Si assiste difatti sia ad un’intensificazione delle connessioni sinaptiche e conseguente miglioramento della comunicazione tra aree encefaliche critiche per la sopravvivenza, che a modifiche trascrizionali volte a garantire una migliore funzionalità dei processi neuronali. I meccanismi neuronali attivati contro fattori che perturbano il normale equilibrio omeostatico coinvolgono sia tutta una serie di molecole che per le loro funzioni fungono da importanti bioindicatori di stress come le HSPs, le quali possiedono un ruolo cruciale nei processi alla base della protezione e riparazione cellulare (Chen e Zhou, 2009), che sistemi di neurotrasmissione i quali agiscono da importanti modulatori della risposta allo stress. Tra questi il sistema ORXergico è stato recentemente proposto come attivamente coinvolto in una ampia gamma di reazioni fisiologiche correlate a stati di stress (Berridge et al., 2010).

LA RISPOSTA ALLO STRESS A LIVELLO NEURONALE

II.1 Le HSPs

Le HSPs anche note come “proteine dello stress” sono *chaperon* molecolari altamente conservati nel corso dell’evoluzione e ubiquitariamente espressi nelle cellule per contrastare le alterazioni a carico delle proteine (Brown et al., 2007; Hayashida et al., 2010). In condizioni fisiologiche le HSPs assistono il *fold*ing della proteina nascente

legando i segmenti idrofobici e favorendone il corretto ripiegamento e trasporto verso i diversi target cellulari (Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Bukau et al., 2006). Con la loro azione, oltre a prevenire errori nel ripiegamento del polipeptide, impediscono al contempo l'aggregazione inappropriata di intermedi del *foldings* (Hartl, 1996).

La prima osservazione che portò alla scoperta delle HSPs risale al 1962 ad opera di Ritossa, il quale a seguito di uno shock termico riscontrò la presenza di queste proteine nelle ghiandole salivari di *Drosophila*. Sebbene originariamente l'espressione delle HSPs sia stata correlata ad un'esposizione al calore (Ritossa, 1962), è stato ormai largamente dimostrato il loro coinvolgimento in risposta a differenti fattori di stress, quali l'ipossia, le tossine, l'acidosi e condizioni ischemiche (Goel et al., 2010; Yenari, 2002; Hecker e McGarvey, 2011). Negli eucarioti, le HSPs sono classificate in diverse famiglie in base alla loro funzione, all'omologia di sequenza e alla massa molecolare: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e le HSPs a basso peso molecolare (12-43 KDa) incluse tre le *small* HSPs (sHSPs).

La regolazione della trascrizione dei geni codificanti per le HSPs è affidata all'interazione di fattori trascrizionali quali gli "*Heat shock factors*" (HSFs) a livello di specifiche regioni del promotore dette "*Heat shock elements*". Alcuni organismi, come il lievito, hanno un solo HSF, mentre i vertebrati hanno evoluto una famiglia costituita da quattro membri di HSF (Anckar e Sistonen, 2011). Tra gli HSFs, HSF1 è il principale fattore di trascrizione in grado di regolare la risposta sia a stress fisiologici che ambientali (Hwang, 2012; Morimoto e Santoro, 1998). Dal punto di vista strutturale HSF1 presenta un dominio legante il DNA di circa 100 aminoacidi all'estremità N-terminale e una regione adiacente contenente tre motivi *leucine zipper* (Z1-3), che ne garantiscono la trimerizzazione. Negli eucarioti evolutivamente più recenti si aggiunge un quarto dominio *leucine zipper* (Z4) al C-terminale (Fig. II.1). In tutti i vertebrati nella sequenza di HSF1 si riscontra, inoltre, un corto elemento detto ripetizione C-terminale (CTR) (Rabindran et al., 1993).



Fig. II.1 Struttura dell'HSF1. Una regione legante il DNA (*DNA binding*) all'N-terminale è seguita da tre domini "leucine zipper" (Z 1-3) e, nei vertebrati più evoluti, è presente un quarto dominio leucine zipper (Z4) aggiuntivo al C-terminale.

Nelle cellule non stressate la forma monomerica di HSF1 interagisce con l'HSP90. Tale interazione viene rapidamente ridotta in seguito ad un fenomeno proteotossico, suggerendo che l'HSP90 mantiene questo fattore in uno stato inattivo (Zou et al., 1998). Sembra invece venire attivato durante le condizioni di stress (Ciocca et al., 2012). Trasloca, infatti, a livello nucleare dove va incontro ad oligomerizzazione passando dalla forma monomerica a quella trimerica in grado di legare la regione promotrice dei geni che codificano per le HSPs, senza tuttavia attivarne la trascrizione (Jurvich et al., 1992; Bruce et al., 1993). I segnali proteotossici che avviano il funzionamento di HSF1 sono diversi. HSF1 viene attivato ad esempio da metalli pesanti, infezioni batteriche o virali e da stress ossidativo (Anckar e Sistonen, 2011). In aggiunta, anche le MAP chinasi, enzimi coinvolti nella risposta allo stress (Bensaude et al., 1996) causando l'incremento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare nonché l'attivazione di enzimi come le fosfolipasi C e A2 (Calderwood et al., 1993; Kiang e McClain, 1993) e una cascata di segnali trasduzionali intracellulari, possono variarne lo stato fosforilativo modificando in definitiva l'espressione delle HSPs.

II.1.1 HSPs e stress nei pesci

I pesci sono soggetti ad una gran varietà di stress ambientali e alla stregua di altri vertebrati hanno evoluto strategie per contrastarne gli effetti dannosi. Tra queste vi rientra senza dubbio l'abilità nell'indurre la sintesi delle HSPs (Padmini, 2010). Nei pesci l'attività delle HSPs costitutivamente espresse è essenziale nel metabolismo proteico mentre l'attività delle forme inducibili è indispensabile alla sopravvivenza durante l'instaurarsi condizioni di stress durante le quali agiscono in primo luogo cercando di ripristinare la funzionalità di proteine danneggiate (Roberts et al., 2010). L'interazione delle HSPs con le proteine anormali, durante lo stress, rappresenta nel caso delle forme costitutive, un'estensione del ruolo esercitato in condizioni normali (Roberts et al., 2010; Morimoto e Santoro, 1998).

L'espressione di questi *chaperon* dipende in ogni caso dal tipo di stress cui l'organismo è esposto (Liu et al., 2012; Cara et al., 2005; Iwama et al., 1998) e può variare anche in relazione alla specie, al suo stadio di sviluppo (Nakano e Iwama, 2002; Martin et al., 2001) e al tessuto eventualmente coinvolto (Airaksinen et al., 2003; Rabergh et al., 2000). Gli ambienti naturali sono molto complessi e i pesci, sono spesso esposti a molteplici fattori stressanti come, ad esempio, lo stress ossidativo, lo shock termico, o stress di tipo chimico derivante dall'esposizione a composti che contaminano gli ambienti acquatici minacciando le normali funzioni fisiologiche (Fig. II.2).

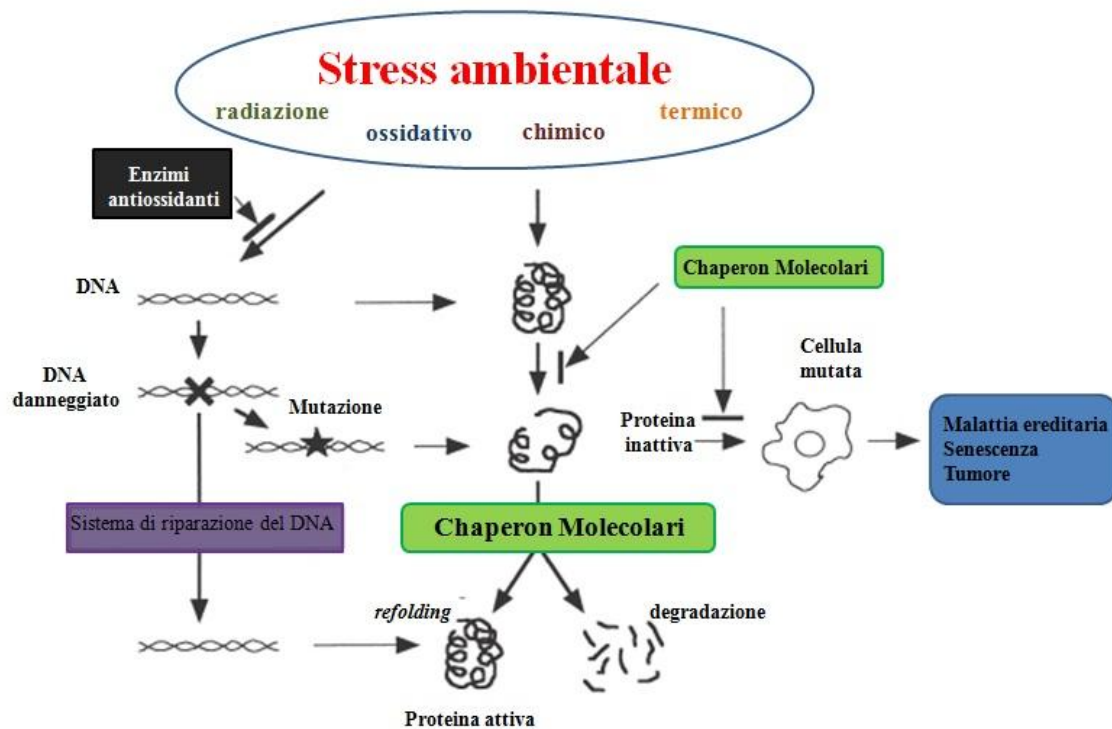


Fig. II.2 Effetti genotossici e proteotossici mediati da stress ambientale. Diverse condizioni di stress possono causare alterazioni delle proteine inducendo mutazioni al DNA o direttamente alle proteine. L'accumulo di proteine anormali e non funzionanti è correlato ad invecchiamento cellulare e alla patogenesi di alcune malattie. Gli *chaperon* molecolari cercano di limitare simili effetti promuovendo il *refolding* ed in alcuni casi la degradazione delle proteine danneggiate.

Numerose evidenze sostengono che lo stress sia in grado di stimolare indirettamente le cellule ad esprimere le HSPs, agendo su *pathway* neuroendocrini che regolano la risposta allo stress. In particolare, esperimenti condotti su altri vertebrati hanno mostrato che l'ACTH, stimolando la produzione di cortisolo è in grado di modulare l'espressione delle HSPs (Soleimani et al., 2012). In alcuni pesci invece come *Oncorhynchus mykiss* è stata messa in relazione l'induzione delle HSPs con l'attività dell'HPI. In particolare, la somministrazione di cortisolo si è dimostrata capace di innalzare notevolmente i livelli epatici di HSP90 (Sathiyaa et al., 2001). In generale, i recettori dei glucocorticoidi mediano gli effetti fisiologici del cortisolo e la funzione, l'assemblaggio e il trasporto dei recettori dei glucocorticoidi dipende dalla loro associazione con alcuni *chaperon* quali l'HSP70 e l'HSP90 (Grad e Picard, 2007).

L'adrenalina è anch'essa capace di stimolare nei pesci la sintesi delle HSPs come è stato osservato negli epatociti di *Oncorhynchus mykiss* dove a seguito di una stimolazione della risposta adrenergica, in presenza di stress termico, si registrava un incremento significativo

dei livelli di HSPs (Currie et al., 2008). I livelli tissutali di HSPs nei pesci sembrano essere influenzati inoltre da altri ormoni quali l'ormone della crescita (GH) e la PRL che a livello epatico inducono una diminuzione di livelli di HSP70 (Deane et al., 1999).

La sintesi delle HSPs nei pesci può essere influenzata anche da fattori biotici. In *Carassius auratus* è stato, infatti, riscontrato un incremento dei livelli di HSP70, quando allevato in presenza di un predatore (Kagawa e Mugiya, 2002). L'espressione delle HSPs è anche associata all'esposizione ad agenti patogeni ed in particolare allo sviluppo dell'infiammazione e alle risposte immunitarie specifiche e aspecifiche contro batteri e virus (Roberts et al., 2010). Ne costituisce un esempio *Oncorhynchus kisutch*, in cui un'infezione da *Renibacterium salmoninarum*, ha fatto osservare un concomitante aumento dei livelli di HSPs (Forsyth et al., 1997).

II.2 HSP90: struttura e funzioni

L'HSP90 è uno *chaperon* ubiquitario che rappresenta circa l'1-2% del contenuto proteico della maggior parte delle cellule e soprattutto una delle *chaperon* più studiate nei pesci (Csermely et al., 1998; Manchado et al., 2008). Possiede un ruolo cruciale in numerosi processi incluso il controllo del ciclo cellulare (Burrows et al., 2004), la sopravvivenza e alcune vie di trasduzione del segnale (Echeverria e Picard, 2010; Pearl e Prodromou, 2000). La sua azione è dunque fondamentale nella risposta allo stress e nel mantenimento dell'omeostasi cellulare (Taipale et al., 2010). Questa HSP è infatti richiesta per la corretta maturazione e attivazione di un gran numero di proteine e complessi proteici. Le proteine sulle quali agisce sono comunemente denominate "clienti" e molte di loro giocano un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale. Si tratta di chinasi o fattori trascrizionali quali la chinasi Akt, cdk4/6, B-Raf, src, tirosin chinasi, recettori per gli ormoni steroidei (recettori per gli estrogeni, per il progesterone, per gli androgeni, e per i glucocorticoidi e i mineralcorticoidi), HSF1, p53 e *v-erb A* oltre a proteine implicate in malattie neurodegenerative come la proteina tau e l' α -sinucleina (Jackson, 2012).

Dal punto di vista strutturale l'HSP90 è una proteina dimerica. Ogni monomero è costituito da un dominio N-terminale, altamente conservato, contenente un'unica tasca di legame per l'ATP e motivi per l'interazione con altri *chaperon*, da un dominio intermedio con siti di legame per le proteine target e da un dominio C-terminale che accoglie il dominio di dimerizzazione (Jackson, 2012). Il dominio N-terminale è connesso con il

dominio intermedio attraverso un *linker*; la quale è in grado di modulare l'attività dell'HSP90 (Hainzl et al., 2009; Tsutsumi et al., 2012). In particolare, analisi cristallografiche del dominio N-terminale dell'HSP90 di lievito e dell'uomo hanno evidenziato che esso è costituito da 220 residui aminoacidici e possiede una conformazione a tasca, avente foglietti- β sul fondo ed eliche e loop che circondano il ligando. Inoltre, il sito di legame ATP/ADP, coadiuvato dalla presenza di magnesio (Mg^{2+}), può essere bloccato attraverso il legame ad alta affinità con inibitori, quali l'antibiotico geldamicina (Prodromou et al., 1997; Stebbins et al., 1997) o il radicicol (Soga et al., 1998). Attraverso il legame dell'ATP e la sua idrolisi, il dominio N-terminale sembra regolare la conformazione e l'attività dell'HSP90 (Taipale et al., 2010). Il dominio C-terminale, contenente un secondo sito con funzione di *chaperon* (Scheibel et al., 1998) possiede un'attività ATPasica-indipendente ed è implicato oltre che nel processo di dimerizzazione (Jackson, 2012) anche nel processo di oligomerizzazione (Nemoto e Sato, 1998) (Fig. II.3).

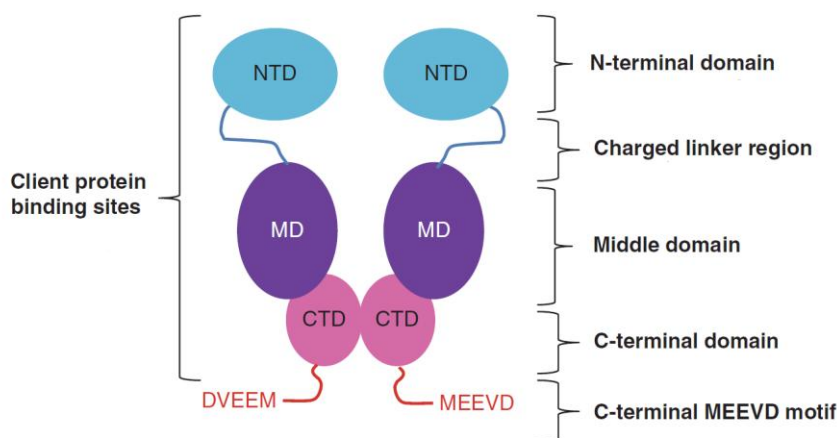


Fig. II.3 Struttura dell'HSP90. L'HSP90 ha una struttura dimerica. Ciascun monomero presenta un dominio N-terminale (NTD), legante l'ATP, seguito da una regione *linker*. Il dominio intermedio (*middle domain*) contiene l'arginina richiesta per l'attività ATPasica, lega le *co-chaperon* e sembra essere il principale sito di legame per le proteine clienti. Al dominio C-terminale (CTD) è presente un motivo altamente conservato di *metionina-acido glutammico-acido glutammico-valina-acido aspartico* (MEEVD) importante per l'interazione con le *co-chaperon*. (Jackson, 2012).

Il recettore per i glucocorticoidi è la prima proteina ad essere stata riconosciuta come "cliente" dell'HSP90 (Sanchez et al., 1985). E' noto infatti che l'attività di questo *chaperon* è fondamentale per il *folding* e la maturazione dei recettori steroidei (Echeverria e Picard, 2010). Sembra che il recettore neosintetizzato interagisca inizialmente con HSP40/HSP70 e successivamente venga trasferito all'HSP90 grazie al *co-chaperon* Hop (*Hsp70/Hsp90 organizing protein*) capace di legare simultaneamente HSP90 e HSP70. E'

stato supposto che a questo stadio l'HSP90 sia privo di nucleotidi ed in una conformazione aperta. Il passo successivo prevede, infatti, il legame dell'ATP, l'idrolisi e il cambiamento conformazionale dell'HSP90 con la dimerizzazione del suo dominio N-terminale, il rilascio di Hop e/o dell'HSP70 (Fig. II.4; Jackson, 2012).

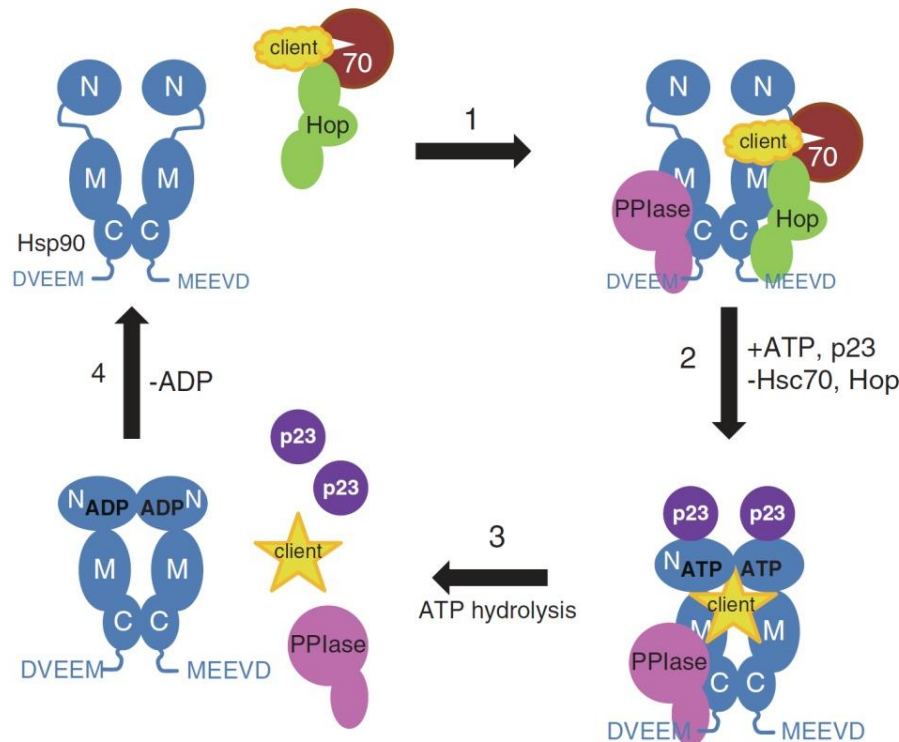


Fig. II.4 Modello di attivazione dei recettori steroidei, proteine “clienti” del complesso del *folding* dell'HSP90. L'HSP90 è rappresentata in blu, l'HSP70 in rosso scuro, in verde la *co-chaperon* Hop, in viola p23 e in rosa la prolil isomerasi (PPIase) ad alto peso molecolare coadiuvante il *folding* proteico (Jackson, 2012).

Molte delle funzioni dell'HSP90 si realizzano proprio grazie all'interazione con l'HSP70 (Bose et al., 1996) che rappresenta il suo principale *partner* molecolare. Questo complesso è in grado di innescare numerosi meccanismi di citoprotezione e promuovere, ove necessario, la degradazione delle proteine indirizzandole verso il proteasoma (Yamano et al., 2008). Inoltre, l'attività dell'HSP90 è regolata da più di venti *co-chaperon* che hanno diversi effetti sulle sue attività biochimiche. Ne regolano, infatti, la capacità di idrolisi dell'ATP, il legame a specifici substrati o l'assemblaggio dei complessi proteici (Makhnevych e Houry, 2012). Inoltre, diversi *co-chaperon* possono modulare la funzione dell'HSP90 anche catalizzando l'ubiquitinazione o la defosforilazione dei substrati proteici (Pratt et al., 2006; Vaughan et al., 2008).

L'HSP90 ha inoltre la capacità di interagire con le componenti citoscheletriche (Csermely et al., 1998; Pearl e Prodromou, 2000; Young et al., 2001). E' stata, infatti, proposta l'associazione tra l'HSP90 e la tubulina, principale costituente dei microtubuli del citoscheletro (Giustiniani et al., 2009), coinvolta nella divisione cellulare, morfogenesi, compartimentalizzazione e motilità degli organelli. L'HSP90 sembra sia in grado di proteggere la tubulina dalla denaturazione promossa da stress termico mantenendola in una conformazione compatibile con l'assemblaggio nei microtubuli (Weis et al., 2010).

II.2.1 Funzioni dell'HSP90 a livello neuronale

A livello neuronale l'attività delle HSPs risulta cruciale sia in condizioni fisiologiche che di stress. I neuroni sono infatti particolarmente sensibili alle alterazioni derivanti da scorretto avvolgimento delle proteine (Muchowski e Wacker, 2005). La neurotrasmissione deve infatti svolgersi in modo ottimale anche in condizioni avverse come in presenza di temperature che potrebbero risultare dannose (Karunanithi et al., 1999). I principali processi neuronali vengono infatti preservati dall'espressione costitutiva delle HSPs (Karunanithi et al., 2002). Queste proteine sono state, infatti, ritrovate sia nelle cellule neuronali che gliali (Foster e Brown, 1997). Tra gli *chaperon* molecolari, l'HSP90 svolge numerose e importanti funzioni critiche per il corretto svolgimento dei processi neuronali. Essa risulta, infatti, costitutivamente espressa a livello encefalico (D'Souza e Brown, 1998) ed attivamente coinvolta nel traffico subcellulare di varie proteine con ruolo critico per le funzioni neuronali. La presenza di questo *chaperon* è stata riscontrata sia sulle membrane pre- che post-sinaptiche (Tobaben et al., 2001). A livello post-sinaptico, in particolare, risulta implicata nei meccanismi di attivazione di alcuni sistemi di neurotrasmissione, come quello GLUergico. L'attività di questa HSP è infatti importante nei processi che rendono l'AMPA (recettore dell'acido- α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazol-propionico) funzionalmente attivo negli eventi di *Long Term Potentiation* (LTP), oltre a promuoverne la corretta localizzazione nella membrana (Gerges et al., 2004) per garantire un'adeguata neurotrasmissione. A livello pre-sinaptico, invece, sembra essere implicata nella regolazione dei meccanismi di rilascio dei neurotrasmettitori (Sakisaka et al., 2002). L'HSP90 è stata rinvenuta anche a livello dei *lipid raft* del cervelletto di ratto dove la sua attività è mirata a preservare la neurotrasmissione sia in condizioni fisiologiche che di stress (Chen et al., 2005). A livello di questi microdomini di membrana si concentra infatti l'1% delle proteine encefaliche (Maekawa et al., 2003) compresi diversi sistemi di

neurotrasmissione come il recettore nicotinico per l'acetilcolina (Bruses et al., 2001), il recettore GABA_B (Becher et al., 2001), gli AMPAR, e gli NMDAR (Besshoh et al., 2005).

Anche durante il neurosviluppo l'espressione dell'HSP90 sembra essere determinante. Infatti, è stato proposto il suo coinvolgimento nella migrazione neuronale durante lo sviluppo del SNC. Inoltre, risulta altamente espressa nella fase G0 durante la differenziazione del neuro-ectoderma dei mammiferi, suggerendo che essa sia richiesta per il mantenimento delle cellule in questa fase (Walsh et al., 1997). Anche i fattori di crescita o le neurotrofine che svolgono un ruolo critico per lo sviluppo e corretta maturazione del sistema nervoso fornendo importanti segnali per la differenziazione cellulare, la sopravvivenza dei neuroni e il mantenimento del fenotipo neuronale potrebbero richiedere l'HSP90 per funzionare correttamente (Loones et al., 2000).

II.2.2 HSP90 e contaminanti ambientali

L'attività delle HSPs è fondamentale nei meccanismi che presiedono alla citoprotezione e riparazione dei danni indotti da tossine ambientali. Questi *chaperon* risultano particolarmente efficienti nel limitare gli effetti dei metalli pesanti, soprattutto sulle proteine principali target molecolari della loro tossicità (Chen e Zhou, 2009). È infatti noto che gli ioni metallici attaccando i gruppi tiolici delle proteine causando denaturazione o altri danni strutturali (Letelier et al., 2005). Le HSPs tentano dunque di ripristinare la struttura e quindi la funzione delle proteine danneggiate. È stato dimostrato infatti che agenti inquinanti come i bifenili policlorinati (Guo e Ki, 2012), i pesticidi (Eder et al., 2009) e alcuni metalli pesanti, come Cu²⁺ e Cd²⁺, stimolano l'incremento dei livelli di HSPs (Liu et al., 2012). In alcuni casi l'esposizione a contaminanti ambientali è stata tuttavia associata ad alterazioni della funzionalità delle stesse HSPs. A tal proposito è stato osservato che il Pb²⁺, soprattutto ad alte concentrazioni, tende ad accumularsi negli organuli cellulari (Qian e Tiffany-Castiglioni, 2003) compromettendo le proprietà di alcune proteine, incluse le HSPs, con conseguenze anche letali per le cellule (Feder e Hofmann, 1999). A tal proposito è stato osservato che un'esposizione di *S. rhombus* a CuSO₄ comporta riduzione del contenuto di HSPs (Chairi et al., 2010).

Tra le HSPs, l'HSP90 è riconosciuta come uno dei principali indicatori di stress ambientale, visto il suo coinvolgimento nella risposta ad un ampio *range* di fattori di stress come le variazioni di umidità e temperatura (Sonoda et al., 2006), la privazione di cibo (Cara et al., 2005), nonché la tossicità di pesticidi (Yang et al., 2010) e metalli pesanti (Liu et al., 2012). Nel caso del Cu²⁺ è stato riportato che durante l'esposizione a questo metallo

il ciprinide *Tanichthys albonubes* mostra un'espressione dell'HSP90 che risulta strettamente tempo-dipendente (Liu et al., 2012). Alcuni lavori hanno sottolineato invece l'azione protettiva, esercitata dall'HSP90, nei confronti del recettore per i glucocorticoidi contro gli effetti tossici di un altro metallo quale il Cd^{2+} (Dundjerski et al., 2000). L'espressione dell'HSP90 sembra essere condizionata dalla specie, dal tipo di stress indotto dai metalli e dal metallo a cui si viene esposti. Ad esempio, il gene che codifica per l'isoforma α dell'HSP90 nelle cellule polmonari umane viene over-espresso in seguito ad esposizione ad As^{3+} , mentre la sua espressione si riduce quando queste cellule sono esposte a Cd^{2+} , Ni^{2+} e Cr^{2+} (Andrew et al., 2003).

A livello encefalico l'induzione da parte del Pb^{2+} di eventi neurodegenerativi nei pesci è accompagnata dall'attivazione delle HSPs. In particolare, nel teleosteo marino *Thalassoma pavo* l'esposizione al Pb^{2+} è correlata a variazioni nel pattern trascrizionale encefalico dell'HSP90 oltre che dell'HSP70 in aree encefaliche critiche per il controllo motorio e per la regolazione del comportamento alimentare (Giusi et al., 2008).

L'esposizione a pesticidi come l'atrazina, causa nei pesci di evidenti lesioni istopatologiche a carico di rene e branchie, è correlata a sostanziale riduzione dell'HSP90 in entrambi i tessuti (Yang et al., 2010). Altri studi hanno evidenziato un forte incremento dell'espressione di HSP90 nel fegato di salmoni esposti a pesticidi (Eder et al., 2009) e sempre negli epatociti la stimolazione dell'HSP90 è stata anche correlata ad un'esposizione all'ED 17 α -etinilestradiolo nella trota (Osborne et al., 2007).

Tali evidenze suggeriscono dunque l'HSP90 come un fattore indispensabile nei meccanismi di citoprotezione contro contaminanti ambientali che minacciano importanti funzioni fisiologiche di vertebrati acquatici (Liu et al., 2012) oltre che come ottimo *marker* di contaminazione ambientale (Costa et al., 2011) e di danni sortiti da agenti tossici a livello di tessuti target (Yang et al., 2010).

II.3 Il sistema ORXergico

II.3.1 Le Orexine

Le Orexine (ORXs), anche conosciute come ipocretine, sono neuropeptidi ipotalamici cruciali nella regolazione del ciclo sonno-veglia (Nuñez et al., 2009; Volkoff, 2012) e del comportamento alimentare (Sakurai, 1999) e dell'attività locomotoria (Thorpe e Kots, 2005). Più di recente tali neuropeptidi sono stati correlati anche ai meccanismi di dipendenza e di ricompensa (Mahler et al., 2012), al controllo della respirazione (Williams

e Burdakov, 2008; Song et al., 2012) e delle funzioni cardiovascolari (Samson et al., 2007) e a diverse reazioni fisiologiche all'instaurarsi di stati di stress (Berridge et al., 2010). Un singolo gene codifica per un comune precursore la prepro-ORX (PPORX) che viene processato attraverso opportuni tagli proteolitici in ORX-A e in ORX-B. La PPORX dei mammiferi è costituita da 131 aminoacidi e risulta altamente conservata nelle diverse specie mostrando anche una stretta somiglianza con quella di specie non mammifere. Anche la sequenza del gene della PPORX è ben conservata, con una struttura a due esoni di cui l'esone 2, che è quello di dimensioni maggiori, codifica per i peptidi maturi: ORX-A e ORX-B (Fig. II.5; Wong et al., 2011)

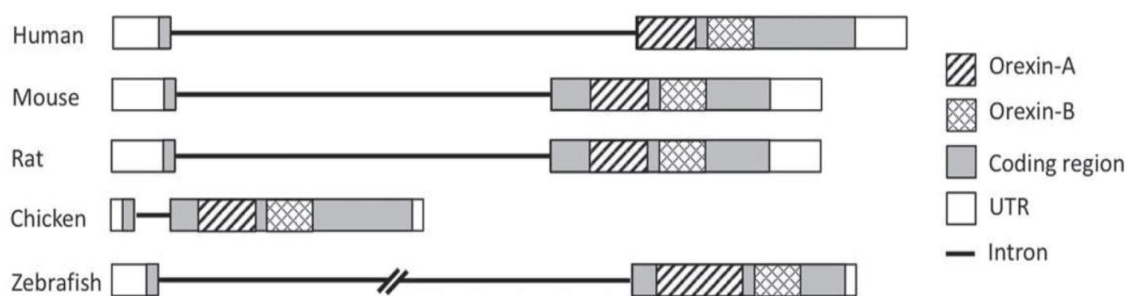


Fig. II.5 Struttura del gene della PPORX nell'uomo, nel topo, nel ratto, nel pollo e nello zebrafish. I rettangoli rappresentano gli esoni mentre le linee rappresentano gli introni. La porzione codificante per l'ORX-A è rappresentata con righe diagonali, quella codificante per l'ORX-B è rappresentata a scacchi. Le regioni UTR sono riportate invece in bianco (Wong et al., 2011).

Nei teleostei quali *Danio rerio*, il gene che codifica per la PPORX possiede solo un esone (Kaslin et al., 2004). In *Gadus morhua*, il gene della PPORX codifica per un peptide di 143 aminoacidi che origina l'ORX-A di 47 aminoacidi e l'ORX-B di 29 aminoacidi (Xu e Volkoff, 2007). La regolazione dell'espressione del gene della PPORX non è ancora del tutto chiara, ma è stato dimostrato che l'mRNA di questo peptide precursore, subisce un'*up-regulation* in condizioni di digiuno, indicando che i neuroni ORXergici, in qualche modo, regolano il bilancio energetico degli organismi viventi (Sakurai et al., 1998). Nel polipeptide PPORX, entrambi i peptidi sono seguiti da un motivo consenso costituito dalla glicina seguita da due aminoacidi basici che consente il taglio proteolitico e amidazione nella regione C-terminale. L'estremità C-terminale sembra essere estremamente variabile e probabilmente non funzionale (Wong et al., 2011). Nei mammiferi l'ORX-A è un peptide di 33 aminoacidi con due ponti disolfuro (Cys6-Cys12 e Cys7-Cys14) che risultano pienamente conservati nei tetrapodi. Questa struttura consente all'ORX-A, a differenza

dell'ORX-B di oltrepassare la BEE e di accumularsi nel liquido cefalo-rachidiano (Kukkonen et al., 2002). L'ORX-B, invece, è un peptide più corto di 28 aminoacidi privo di ponti disolfuro (Fig. II.6).

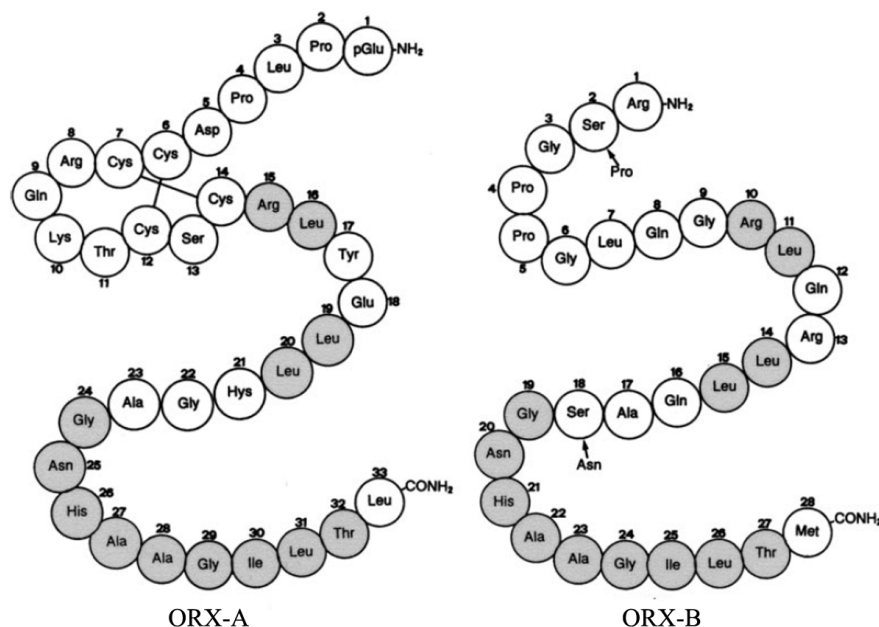


Fig. II.6 Sequenza aminoacidica dell'ORX-A e dell'ORX-B dell'uomo. L'ORX-A possiede due ponti disolfuro intramolecolari tra i residui Cys6 e Cys12 e tra Cys7 e Cys14. Mentre la sequenza dell'ORX-A è identica in uomo, pecora, maiale, ratto e topo, l'ORX-B umana differisce da quella di maiale, ratto e topo per due sostituzioni aminoacidiche in posizione 2 e 18 (indicate dalle frecce). Gli aminoacidi identici tra i due neuropeptidi sono rappresentati in grigio (Spinazzi et al., 2006).

Durante le modifiche post-traduzionali entrambe le ORXs subiscono ammidazione all'estremità C-terminale. Solo l'ORX-A, invece, va incontro anche a modifiche a livello dell'estremità N-terminale. Nei tetrapodi l'ORX-A risulta più conservata dell'ORX-B, mentre l'opposto vale per le ORXs nei teleostei. Nello specifico, l'ORX-A dei teleostei è più lunga (47 aminoacidi in goldfish e zebrafish e 50 nel merluzzo) a causa di una sequenza spaziatrice aggiuntiva tra la posizione 24 e 25. Questo peptide condivide comunque il 52.4% di identità con i mammiferi. Dei quattro importanti residui cisteinici presenti nei tetrapodi, l'ORX-A dei pesci manca della Cys12 e possiede invece un residuo di Cys in posizione 21. La mancanza della Cys12 causa al contempo perdita del ponte disolfuro Cys6-Cys12 e probabilmente promuove la formazione di un ponte disolfuro alternativo (Xu e Volkoff, 2007). Come negli altri vertebrati l'ORX-B dei teleostei è costituita da 28 aminoacidi ad eccezione del merluzzo che ne possiede 29. Nel complesso

la struttura genetica e molecolare delle ORXs risulta relativamente ben conservata nelle diverse specie e questo sottolinea la forte pressione evolutiva mirata a preservare la struttura e di conseguenza le funzioni fisiologiche di questi neuropeptidi (Wong et al., 2011).

II.3.2 Recettori ORXergici

Le ORXs legano selettivamente il recettore ORXergico di tipo 1 (ORX₁R) e/o il recettore ORXergico di tipo 2 (ORX₂R) appartenenti alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR). ORX₂R sembra si sia evoluto per primo, mentre ORX₁R è il prodotto di una duplicazione genica verificatasi a seguito della divergenza evolutiva che portò ai mammiferi (Wong et al., 2011). ORX₁R è una proteina, costituita nell'uomo da 425 amminoacidi, in grado di legare con elevata affinità (~ 30 nM) l'ORX-A e con affinità di molto inferiore l'ORX-B (Sakurai et al., 1998). Il ORX₂R, invece, presenta nell'uomo 444 amminoacidi e mostra simile affinità di legame per entrambe le ORXs (Onho e Sakurai, 2008) (Fig. II.7).

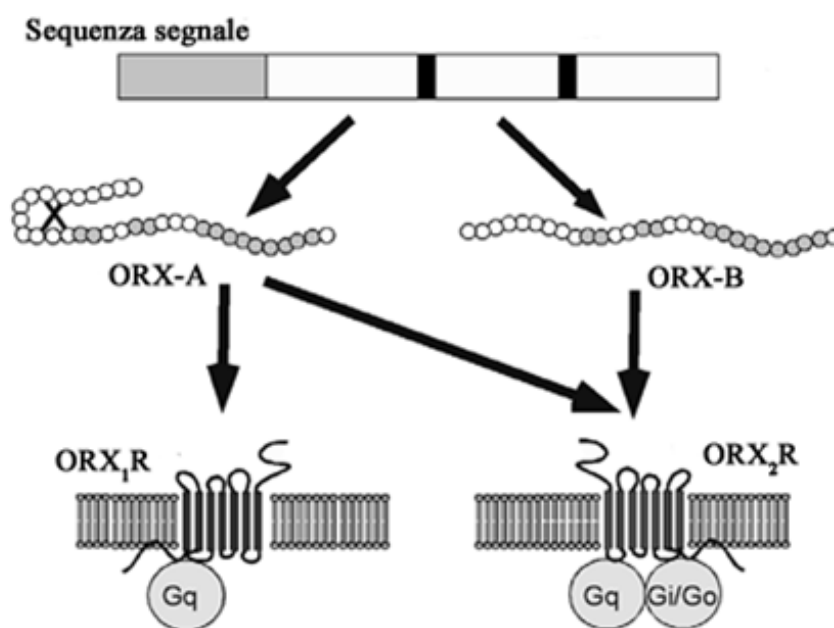


Fig.II.7 Le due ORXs sintetizzate a partire da un comune precursore proteico interagiscono nei mammiferi con due recettori accoppiati a proteina G ovvero ORX₁R e ORX₂R. ORX₁R mostra una maggiore affinità di legame per l'ORX-A mentre ORX₂R lega entrambe le ORXs con affinità paragonabile (Onho e Sakurai, 2008).

Mentre ORX₁R è accoppiato esclusivamente a proteina G_q, ORX₂R è accoppiato sia alla sottoclasse G_q che G_{i/o} (Zhu et al., 2003). Nonostante tali differenze gli ORXR nei

vertebrati sono altamente conservati e tra loro sussiste un'identità pari al 64% (Ohno e Sakurai, 2008). Sono provvisti di sette domini transmembrana, ciascuno dei quali presenta una porzione N-terminale extracellulare ed un dominio C-terminale intracitoplasmatico idrofilico. Possiedono inoltre un sito di glicosilazione extracellulare e quattro di fosforilazione intracellulare, uno per la proteina chinasi A (PKA) e tre per la proteina chinasi C (PKC) (Sakurai et al., 1998). Evidenze sperimentali hanno dimostrato che, affinché entrambi i recettori vengano attivati, è richiesta la presenza di una particolare sequenza amminoacidica all'estremità C-terminale delle ORXs. Questo motivo è lungo 19 aminoacidi nell'ORX-A e 21 aminoacidi nell'ORX-B (Lang et al., 2004). Più in particolare, questi residui aminoacidici sono indispensabili nella fase di riconoscimento e di legame dell'ORX-A al proprio recettore (ORX₁R) e la sostituzione di anche uno solo di questi residui ne compromette l'affinità di legame (Takai et al., 2006). Nel caso dell'ORX-B, i residui amminoacidici della regione C-terminale sono, invece, fondamentali per l'interazione con entrambi i recettori (Lang et al., 2004).

Oltre alla loro abbondante espressione a livello encefalico, ORX₁R e ORX₂R sono localizzati anche in tessuti periferici. Entrambi i recettori risultano espressi, infatti, nella ghiandola surrenale, a livello gastro-intestinale (Johren et al., 2001) e nel pancreas (Näslund et al., 2002). ORX₁R è espresso anche a livello testicolare, nei reni e nella tiroide, mentre l'ORX₂R nei polmoni (Johren et al., 2001).

A differenza dei mammiferi in cui è stata accertata la presenza di entrambi i recettori, nei vertebrati non mammiferi, come uccelli e pesci, è stato rinvenuto un unico recettore (Wong et al., 2011). Negli uccelli, esso è noto come “*chicken orexin receptor*” (cORXR). Il suo cDNA è lungo 1869 bp e il peptide maturo è costituito da 501 aminoacidi. Il cORXR mostra un'omologia dell'80% con il recettore ORX₂R dei mammiferi ed è espresso non solo a livello dell'HTH, del telencefalo e del tetto ottico (OT) (Ohkubo et al., 2003), ma anche in vari tessuti periferici come la ghiandola pituitaria, il surrene, i testicoli e, in misura minore, le ovaie (Ohkubo et al., 2002), suggerendo che le ORXs, in tali specie, svolgono anche azioni di tipo endocrino (Ohkubo et al., 2003).

L'unico recettore rinvenuto nei pesci corrisponde strutturalmente all'ORX₂R dei mammiferi. In particolare in *Danio rerio*, tale recettore presenta un'omologia del 70% con l'ORX₂R dei mammiferi, del 60% con l'ORX₁R (Prober et al., 2006). L'espressione di tale recettore nell'adulto di zebrafish è stata riportata in diverse aree del sistema nervoso centrale, inclusa la zona grigia periventricolare dell'OT, nel nucleo periventricolare del tubercolo posteriore (TPp) nel nucleo tuberale posteriore, nella zona ventrale

dell'ipotalamo periventricolare e nel diencefalo anteriore (Yokogawa et al., 2007). Un'estesa localizzazione è stata rinvenuta anche in *Thalassoma pavo* (Facciolo et al., 2010) e *Carassius auratus* (Facciolo et al., 2011). Anche i neuroni noradrenergici del *locus coeruleus* e le cellule dopaminergiche diencefaliche esprimono tale recettore nei pesci (Prober et al., 2006) nonché i neuroni istaminergici del nucleo tuberomammillare (TMN; Kaslin et al., 2004).

Il legame delle ORXs ai propri recettori innesca diversi meccanismi cellulari. L'interazione con le proteine G eterotrimeriche, determina infatti l'attivazione dei canali Ca^{2+} -voltage dipendenti, con conseguente accumulo di Ca^{2+} nelle cellule che esprimono tali recettori. La mobilitazione del Ca^{2+} dai depositi intracellulari può essere promossa dalla fosfolipasi C, attivata dalla proteina recettoriale G_q (Smart et al., 1999; Lund et al., 2000) che dunque rilascia l'inositolo trifosfato (IP_3) ed il diacilglicerolo (DAG). Il DAG può causare dunque l'attivazione della PKC, mentre l' IP_3 favorisce la fuoriuscita del Ca^{2+} dai depositi intracellulari ed in definitiva promuove anch'esso l'attivazione della PKC (Spinazzi et al., 2006).

Un ulteriore pathway che potrebbe venir attivato porta alla sintesi e dunque al rilascio da parte dell'adenilato ciclasi, dell'adenosinomonofosfato ciclico (cAMP), determinandone un aumento a livello cellulare (Mazzocchi et al., 2001) e di conseguenza l'attivazione della PKA (Spinazzi et al., 2006; Fig. II.8).

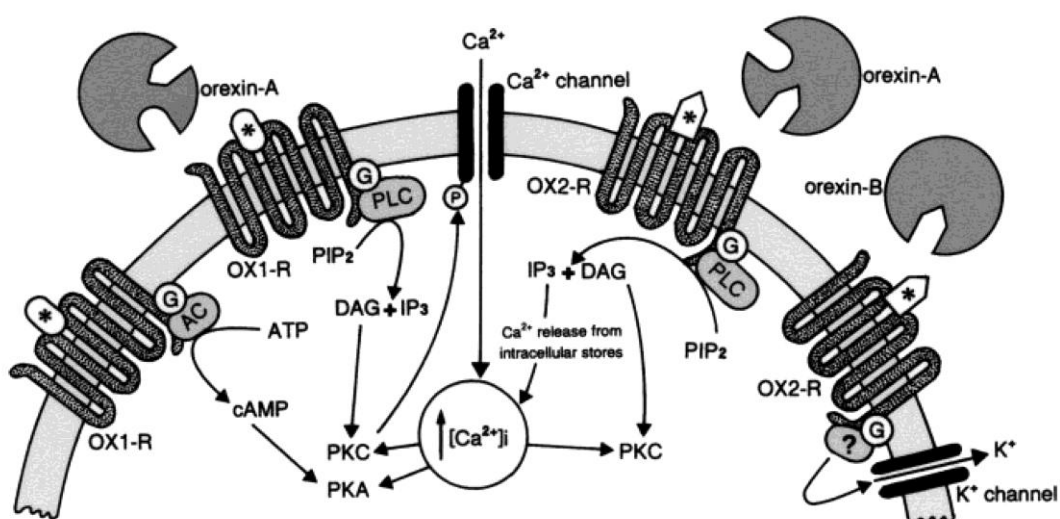


Fig. II.8 Rappresentazione dei principali pathway trasduzionali attivati dall'interazione dell'ORX-A e dell'ORX-B con i propri recettori (Spinazzi et al., 2006).

II.3.3 Distribuzione delle Orexine nell'encefalo dei vertebrati

Nei mammiferi i neuroni ORXergici sono localizzati nell'area ipotalamica laterale (LHA), nell'area perifornicale (PFA), nell'HTH dorso-mediale (DMH) e nell'HTH dorsale. Al contrario le fibre di tali neuroni proiettano in diverse regioni encefaliche come l'eminenza mediana, l'ipofisi (Date et al., 2000), il nucleo arcuato, i bulbi olfattivi (Shibata et al., 2008), la corteccia, il talamo sub-fornicale, l'area postrema, l'ippocampo, l'amigdala. In modo analogo nel pollo ibridazione *in situ* e analisi di immunoistochimica hanno identificato il nucleo paraventricolare (PVN) ipotalamico e la LHA come siti encefalici esclusivi di localizzazione dei neuroni ORXergici (Ohkubo et al., 2002). Dal PVN le fibre ORXergiche si estendono verso l'area preottica caudale dove raggiungono la più alta densità (Singletary et al., 2006). Similmente nei rettili i neuroni ORXergici sono confinati nell'ipotalamo e nello specifico nel PVN e nei nuclei dorso laterali (Dominguez et al., 2010; Farrell et al., 2003). Al contrario, le fibre ORXergiche sono state rinvenute in abbondanza oltre che nell'ipotalamo anche nell'area preottica e nella regione del setto. Diversamente da mammiferi, uccelli e rettili, i neuroni ORXergici negli anfibi sono stati ritrovati fuori dall'ipotalamo in diverse regioni encefaliche, soprattutto nel nucleo sovrachiasmatico e in misura minore nell'area preottica (POA) e nella regione tuberale (Lopez et al., 2009a). Nei pesci la distribuzione dei neuroni ORXergici varia molto a seconda della specie (Wong et al., 2011). Per esempio essi sono localizzati nella POA sia nel lungfish (Lopez et al., 2009b) che nello zebrafish (Kaslin et al., 2004) mentre nel goldfish nel nucleo posteriore periventricolare (NPPv) e nucleo laterale tuberale (Huesa et al., 2005). Al contrario le fibre ORXergiche nei pesci innervano numerosissime regioni encefaliche quali i nuclei aminergici, il *raphe*, il locus coeruleus (LC), l'area omologa a quella mesopontina dei mammiferi, i cluster dopaminergici e i neuroni istaminergici (Yokogawa et al., 2007; Kojima et al., 2009). Nel *goldfish*, le fibre nervose ORXergiche innervano numerose aree del telencefalo dorsale e ventromediale, diverse aree diencefaliche come l'HIP, il talamo periventricolare, il nucleo talamico ventrolaterale (NVL) e il nucleo periventricolare del tubercolo posteriore (TPp); nel mesencefalo proiettano ai tori semicircolari (TS), al *tegmentum* e al tronco encefalico (Horvath et al., 1999; Peyron et al., 1999a,b; Nambu et al., 1999). In *Danio rerio*, invece, le fibre ORXergiche innervano aree encefaliche quali il tetto ottico (OT), i TS, l'ARC ed il PVN (Kaslin et al., 2004). In ultimo, in questo stesso teleosteo, le proiezioni dei neuroni

ORXergici raggiungono anche l'ipofisi, suggerendo il coinvolgimento del sistema ORXergico nel controllo dell'attività endocrina ipofisaria (Kaslin et al., 2004).

II.3.4 Funzioni del sistema ORXergico

Regolazione del comportamento alimentare

La regolazione del comportamento alimentare è una delle funzioni principali del sistema ORXergico (Sakurai, 1999). Nei mammiferi, i neuroni ORXergici sono difatti localizzati principalmente nell'LHA e nel DMH, che costituiscono quello che viene definito il “centro dell'appetito”. Le fibre ORXergiche innervano anche importanti nuclei inclusi il PVN, l'ARC, e il LC, i cui neuroni esprimono molecole chiave nel controllo dell'assunzione di cibo come il recettore della leptina o il Neuropeptide Y (NPY; Wong et al., 2011). A parte la localizzazione anatomica dei neuroni ORXergici e la loro proiezione in siti cruciali per il controllo di tutti i comportamenti correlati all'alimentazione la somministrazione dei neuropeptidi a livello encefalico ha fornito una prova inconfutabile del ruolo di questo sistema. Iniezioni intracerebroventricolari (i.c.v.) di ORX-A nei ratti inducono infatti un incremento del consumo di cibo in maniera dose-dipendente (Haynes et al., 2000). Aumenti considerevoli del food intake sono stati registrati anche a seguito di iniezione di ORX-A direttamente nella LHA, nella PFH e nel nucleo dorsomediale. In accordo con l'induzione di iperfagia mediata dall'ORX-A, animali knock-out per la PPORX (Willie et al., 2001) o ablazione genetica dei neuroni per l'ORX-A (Hara et al., 2001) si traducono in un fenotipo ipofagico. Inoltre, il fatto che a digiuno e quindi in condizione di ipoglicemia, si assista ad un incremento dell'espressione della PPORX, implica necessariamente l'associazione delle ORXs nei meccanismi di feedback che regolano il food intake (Sakurai et al., 1998). Inoltre è stato anche dimostrato che iniezioni di leptina nel terzo ventricolo causano una *down-regulation* della PPORX (Hara et al., 2001), mentre nei ratti iniezioni intraperitoneali (i.p.) di un antagonista selettivo del ORX₁R, SB-334867, inibiscono il comportamento alimentare e bloccano l'effetto iperfagico dell'ORX-A (Rodgers et al., 2001).

L'ORX-A risulta anche indispensabile anche per l'azione orexigenica di NPY e grelina, considerato che iniezioni i.c.v. di anti-sieri per l'ORX-A attenuano gli effetti sul comportamento alimentare mediati da questi due ormoni (Niimi et al., 2001; Toshinai et al., 2003). Delle due ORXs, proprio l'ORX-A, sembra essere dunque quella maggiormente coinvolta nel controllo del comportamento alimentare. Somministrazioni di ORX-B a livello centrale, infatti sembrano non stimolare in maniera significativa la risposta

alimentare (Rodgers et al., 2002). L'ORX-A pare essere più potente a basse dosi e la sua azione, rispetto all'ORX-B, risulta anche più duratura; ciò è da attribuirsi alla sua struttura molecolare molto resistente all'attacco delle peptidasi (Sakurai et al., 1998). Gli effetti più evidenti promossi dall'ORX-A sull'assunzione di cibo potrebbero essere anche attribuibili al fatto che tale neuropeptide sia in grado di interagire con entrambi i recettori (ORX₁R ed ORX₂R), mentre l'ORX-B interagisce con il solo ORX₂R (Kalra et al., 1999).

Negli uccelli sembra che il sistema ORXergico abbia un ruolo non rilevante nella regolazione del comportamento alimentare (Wong et al., 2011). Infatti, sebbene i neuroni ORXergici siano presenti nel PVN e nell'LHA è stato osservato che entrambe le ORXs non siano in grado di stimolare l'appetito nel pollo e nella colomba (da Silva et al., 2008; Furuse et al., 1999). Questo potrebbe essere dovuto alla differenza strutturale delle ORXs in questa classe di vertebrati rispetto agli altri tetrapodi (Wong et al., 2011).

Anche nei pesci, molti studi sostengono il coinvolgimento delle ORXs nel controllo del comportamento alimentare. La specie maggiormente studiata a tal proposito è il goldfish nel quale iniezioni sia i.p. che i.c.v. di ORXs inducono un aumento dell'assunzione di cibo (Facciolo et al., 2011; Nakamachi et al., 2006) mentre iniezioni i.p. di glucosio o di siero anti-ORX ne causano una riduzione (Nakamachi et al., 2006; Volkoff et al., 1999). In questa specie l'effetto orexigenico mediato dall'ORX-A risulta modulato da peptidi quali CART (*cocaine- and anphetamin-regulated transcript*) e leptina (Matsuda et al., 2011) entrambi capaci di promuovere senso di sazietà causando quindi riduzione del food intake (Volkoff, 2006). Come nei mammiferi anche nei teleostei le ORXs sono in grado di stimolare l'assunzione di cibo sia direttamente che attraverso l'interazione con altri peptidi come NPY (Kojima et al., 2009) o la grelina. Nel goldfish, infatti, la stimolazione dell'assunzione di cibo mediata da questi ultimi risulta essere completamente inibita dalla somministrazione di un antagonista per ORXR (Miura et al., 2007). Nei pesci è stata inoltre osservata una regolazione bidirezionale tra food intake e attività locomotoria in quanto iniezioni i.c.v. di ORXs innalzano il *food intake* e al contempo l'attività locomotoria, mentre somministrazione di anticorpi anti-ORXs diminuiscono il *food intake* ma non sortiscono alcun effetto sull'attività motoria (Panula, 2010). In modo analogo ai mammiferi, nei teleostei sembra proprio l'ORX-A ad avere un'azione più efficace e potente nello stimolare l'assunzione di cibo rispetto all'ORX-B (Novak et al., 2005). Anche in pesci come il *goldfish* o lo *zebrafish*, inoltre, il digiuno incide sull'espressione encefalica delle ORXs. Condizioni di digiuno prolungato, infatti, promuovono un innalzamento dei livelli di ORXs (Nakamachi et al., 2006; Novak et al., 2005).

Nel *goldfish* il sistema ORXergico è stato inoltre recentemente proposto come un *link* tra l'ipotalamo e altre aree encefaliche critico la promozione della ricerca di cibo nei teleostei anche attraverso i processi di ricompensa. In merito a ciò è stato osservato che iniezioni i.p. di ORX-A riducono notevolmente il tempo di latenza per il raggiungimento e l'ingestione di cibo (ricompensa) in esemplari di goldfish condizionati nel T-maze test con stimoli luminosi (Facciolo et al., 2011).

Regolazione del Ciclo sonno/veglia

Il sistema ORXergico ha destato grande interesse circa il suo coinvolgimento nei meccanismi alla base della regolazione del ciclo sonno/veglia quando due gruppi di ricerca in maniera indipendente dimostrarono in modelli animali che disfunzioni a carico di questo sistema neuronale sono strettamente associate alla comparsa dei sintomi caratteristici della narcolessia (Chemelli et al., 1999; Lin et al., 1999). Studi successivi sull'uomo verificarono che pazienti narcolettici possedevano ridotti livelli di ORX nel CSF e mostravano perdita di tutti o della maggior parte dei neuroni ORXergici (Nishino et al., 2000; Nishino, 2007). Dopo tali importanti scoperte la funzione principale che fu attribuita al sistema ORXergico fu la regolazione del mantenimento dello stato di veglia. A supporto di questa idea i maggiori target delle proiezioni ORXergiche furono identificati nei classici nuclei del risveglio come il LC (Sutcliffe e de Lecea, 2002) e l'ORX sembrava in grado di attivare le cellule di tali nuclei (Brown et al., 2002; Eriksson et al., 2004; Korotkova et al., 2003). L'espressione dell'mRNA per ORX₁R è particolarmente abbondante proprio nel LC, mentre la presenza dell'ORX₂R è più cospicua nel nucleo tuberomammillare (TMN). In aree, quali il raphe e l'area tegmentale ventrale (VTA) che contengono neuroni dopaminergici, sono stati rinvenuti invece entrambi i recettori (Marcus et al., 2001). Tutto ciò suggerisce che i neuroni ORXergici sono in grado di promuovere un effetto eccitatorio sui neuroni monoaminergici, promuovendone l'attivazione, oltre a mettere in risalto la capacità del sistema ORXergico di modulare i neuroni colinergici e di influenzare quindi il risveglio e le fasi di sonno REM (Onho e Sakurai, 2008; Fig. II.9).

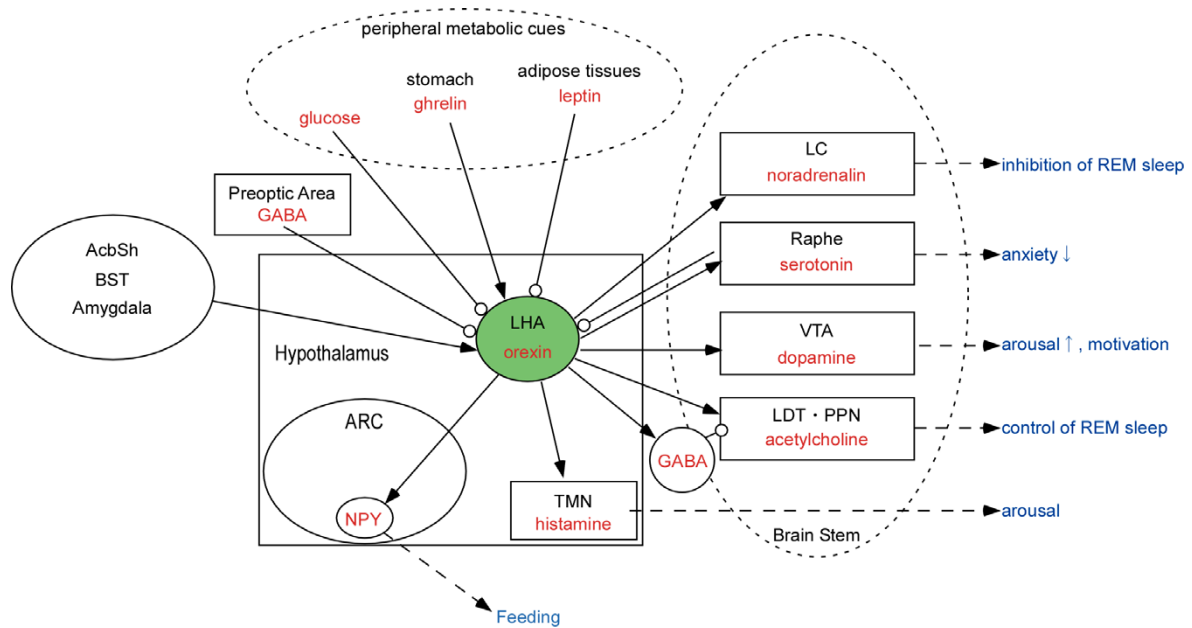


Fig. II.9 Segnali di input e output dei neuroni ORXergici. Il sistema ORXergico regola l'attività di nuclei ipotalamici implicati nel comportamento alimentare, mentre agendo sui nuclei aminergici e su altri nuclei deputati al controllo del sonno promuove lo stato di veglia. Tramite stimolazione di centri dopaminergici, colinergici e limbici, le ORXs possono inoltre modulare i processi di ricompensa, l'attività motoria e il risveglio (Onho e Sakurai, 2008).

E' stato osservato che i neuroni ORXergici risultano attivi durante lo stato di veglia e mostrano invece ridotta attività durante il sonno. Da esperimenti condotti sia *in vivo* che *in vitro* è emerso che è proprio durante la fase di veglia che i neuroni ORXergici inviano segnali che stimolano la depolarizzazione dei neuroni del "centro del risveglio" (Saper et al., 2001; Yoshida et al., 2006). Anche i livelli di PPORX variano durante il ciclo sonno/veglia in quanto raggiungono un picco massimo durante i periodi di luce e minimi al termine del periodo diurno (Fujiki et al., 2001; Taheri et al., 2000; Yoshida et al., 2001).

Negli uccelli iniezioni i.c.v. di ORX-A di mammifero stimolano il risveglio in modo dose-dipendente. La somministrazione di ORX-A evoca anche una riduzione dose-dipendente della durata degli atteggiamenti sonno-simili e causa un incremento dello stato di allerta (Katayama et al., 2010). In alcuni uccelli ciò risulta accompagnato anche da un sostanziale incremento dei movimenti esploratori di testa e collo e del battito delle ali (da Silva et al., 2008).

Nei pesci le caratteristiche comportamentali e i periodi di riposo con riduzione dello stato di veglia sono stati rinvenuti in numerose specie. E' stato infatti osservato che lo stato di *rest* che caratterizza questa classe di vertebrati rappresenta un comportamento sonno-simile. Il ciclo *rest*/veglia risente molto nei pesci dei ritmi circadiani (Whitmore et al.,

2000; Cahill, 2002) in virtù del fatto che esposizioni prolungate alla luce sopprimono il *rest*, mentre il buio lo favorisce (Yokogawa et al., 2007; Facciolo et al. 2009). Un'over-espressione dei peptidi ORXergici, per esempio nello zebrafish, determina l'instaurarsi di un fenotipo insonnia-simile (Prober et al., 2006). Questo teleosteo a causa delle sue abitudini diurne è un modello estremamente interessante per lo studio del sonno in contrasto con la natura notturna di importanti modelli sperimentali mammiferi quali il topo e il ratto (Panula, 2010). E' stato osservato che iniezioni i.c.v. di ORX-A nello zebrafish aumentano la durata totale del sonno, mentre l'ORX-B sembra non promuovere alcun effetto (Yokogawa et al., 2007), contrariamente a quanto riscontrato in larve di questo stesso teleosteo over-esprimenti le ORXs che di notte non erano in grado di mantenere lo stato di *rest* (Prober et al., 2006). Sulla base di queste divergenti evidenze risulta dunque difficoltoso comprendere se nello zebrafish questo sistema neuronale agisca da promotore dello stato di veglia o del sonno (Wong et al., 2011).

Analogamente a quanto visto nei mammiferi (Sakurai, 2007), anche nei pesci le fibre ORXergiche innervano diverse aree implicate nel ciclo *rest*-veglia tra cui un singolo cluster di neuroni istaminergici dell'HTH ventrocaudale, il *raphe*, il LC ed il tegmento assimilabili al "centro del risveglio" dei mammiferi (Kaslin et al., 2004; Kaslin e Panula, 2001; Lopez et al., 2009b). Inoltre, va sottolineato che le fibre ORXergiche e ORXR sono stati rilevati nella ghiandola pineale, deputata al rilascio della melatonina, principale regolatore del sonno nei pesci (Zhdanova et al., 2001). A tal proposito sembra che siano le stesse ORXs a stimolare l'epifisi nel rilascio della melatonina (Appelbaum et al., 2009; Yokogawa et al., 2007), suggerendo che nei pesci similmente ai mammiferi le ORXs possano avere un duplice effetto sul ciclo sonno/veglia sebbene il meccanismo di regolazione rimanga ancora non chiarito.

Regolazione dell'attività motoria

La regolazione del comportamento motorio rappresenta un altro importante compito assolto dal sistema ORXergico. A supporto di ciò somministrazioni di ORX-A inducono un incremento dell'attività locomotoria (Thorpe e Kots, 2005). E' stato osservato che mentre una ridotta attività locomotoria non determina variazioni dei livelli di ORX-A nel CSF, un aumento della stessa attività potrebbe favorire il rilascio di ORX-A e di conseguenza aumentarne la concentrazione a livello centrale (Fujiki et al., 2001). Tuttavia è stato recentemente proposto che somministrazioni di ORX-A nel nucleo paraventricolare del talamo mediale (PVTm) causano una riduzione dell'attività motoria nei ratti con un

contemporaneo incremento del *freezing* (Li et al., 2009). Uno studio precedente aveva già riportato una diminuzione dell'attività motoria immediatamente dopo la somministrazione a livello centrale di ORX-A, un simile effetto durava approssimativamente 15-20 min facendo ipotizzare una breve azione sedativa mediata da tale neuropeptide (Rodgers et al., 2000).

Nella modulazione dell'attività locomotoria, le ORXs promuovono la stimolazione di specifici pathways neuronali, ad esempio nel nucleo esterno dell'*accumbens* (AcbSh), responsabile della regolazione sia del comportamento alimentare che di quello motorio (Thorpe e Kotz, 2005). Iniezioni di ORX-A in quest'area potenziano infatti entrambe le attività. Gli effetti dell'ORX-A sull'attività locomotoria nell'AcbSh sembrano mediati dall'ORX₂R considerato che nei ratti iniezioni di antagonisti di ORX₁R non sono in grado di inibire l'attività motoria ORX-A-dipendente (Thorpe e Kotz, 2005). Anche il sistema dopaminergico sembra essere coinvolto nella mediazione degli effetti locomotori indotti dalle ORXs. Nel ratto è stato dimostrato che nell'insorgenza di iperattività, indotta da iniezioni i.c.v. di ORX-A, si ha la partecipazione della VTA dopaminergica (Nakamura et al., 2000). Un'ulteriore prova dell'azione delle ORX nella regolazione dell'attività motoria è data dall'interazione del sistema ORXergico con quello serotoninergico (Muraki et al., 2004). In modo più specifico, è stato visto che le ORXs sono in grado di eccitare i neuroni serotoninergici del nucleo dorsale del *raphe* (Brown et al., 2002; Liu et al., 2002), nei quali è stata identificata l'espressione sia dell'ORX₁R che dell'ORX₂R (Marcus et al., 2001). Anche nei pesci, come dimostrato in *Carassius auratus*, iniezioni i.c.v. di ORX-A stimolano l'attività locomotoria; tuttavia quando l'azione delle ORXs endogene viene ostacolata tramite immuno-neutralizzazione non si osservano variazioni di tale attività (Nakamachi et al., 2006).

Nello zebrafish la perdita dei neuroni ORXergici sebbene accompagnata da aumento dell'espressione di ORXR, non comporta nelle larve alterazione dell'attività locomotoria, tuttavia, si riscontra un aumento del sonno durante il giorno e incrementi nel numero di transizioni sonno/veglia sia di giorno che di notte. L'esposizione alla luce durante la notte produce una riduzione dell'attività locomotoria in esemplari *wild-type* mentre causa l'effetto opposto nelle larve prive di neuroni ORXergici (Elbaz et al., 2012).

Il sistema ORXergico e lo stress

Diversi neuromediatrici sono noti per il loro coinvolgimento nello stress inclusi le catecolamine e il CRF. Più di recente alcuni lavori hanno suggerito l'implicazione

dell'ORX-A nella risposta comportamentale e fisiologica allo stress (Berridge et al., 2010). L'esposizione di ratti ad uno stress correlato ad un nuovo ambiente induce l'attivazione di neuroni sintetizzanti ORX-A e quelli esprimenti ORX₁R (Berridge et al., 1999) localizzati nell'area del setto mediale (MSA), nell'area preottica mediana (MPOA) nella sostanza innominata e nel LC (España et al., 2003). L'attivazione stress-dipendente dei neuroni ORXergici è stata osservata in risposta ad una gran varietà di stress come il freddo, la privazione di cibo e l'immobilizzazione (Sakurai et al., 1999; Ida et al., 2000; Zhu et al., 2002). L'ORX produce numerose azioni fisiologiche correlate allo stress. È stato infatti osservato che *in vitro* l'ORX attiva i neuroni simpatici (van den Pol et al., 2003) e i neuroni del nucleo del tratto solitario (NTS; Smith et al., 2002). Al contrario, *in vivo*, la somministrazione di ORX nel NTS induce incremento della pressione sanguigna. In topi knock-out per l'ORX si assiste inoltre ad una ridotta risposta cardiovascolare e comportamentale allo stress oltre che ad una diminuzione della pressione arteriosa basale (Kayaba et al., 2003). Tali osservazioni risultano in linea con altre evidenze che dimostrano come iniezioni di ORX promuovano differenti reazioni autonome associate allo stress come l'incremento della pressione arteriosa, la frequenza cardiaca, il consumo di ossigeno e la temperatura corporea (Berridge et al., 2010). Nel complesso questi effetti indicano il sistema ORXergico come importante modulatore delle reazioni fisiologiche a condizioni di stress (Kayaba et al., 2003). Tale ipotesi è supportata da ulteriori studi che hanno dimostrato come l'ORX sia in grado di attivare i neuroni contenenti CRF attivando al tempo stesso l'asse HPA (Jászberényi et al., 2000; Kuru et al., 2000). Al contrario, l'antagonista dell'ORX sembra attenuare la secrezione di ACTH indotta dal fattore di stress (Samson et al., 2007). Pertanto, non solo i neuroni ORXergici sono attivi durante lo stress ma l'ORX attiva simultaneamente diversi circuiti correlati allo stress coordinando le reazioni stress-indotte. Il neuropeptide CRF nello specifico ha un ruolo prominente nelle risposte comportamentali e fisiologiche osservate durante stati di stress. L'attivazione dei neuroni deputati alla sintesi di CRF localizzati nel PVN e il conseguente incremento dei livelli di glucocorticoidi circolanti, attraverso l'azione dell'ACTH, è infatti considerato un evento caratteristico dello stress (Dunn e Berridge, 1990). La somministrazione a livello centrale di CRF e ACTH induce diverse risposte comportamentali osservate durante lo stress come il *grooming* o la masticazione di oggetti non commestibili (Berridge et al., 2010). È interessante notare come le fibre ORXergiche siano localizzate in prossimità dei neuroni che producono CRF sia nel PVN che nell'amigdala e che somministrazioni i.c.v. di ORX producono un innalzamento dei livelli plasmatici di ACTH (Samson et al., 2002).

Sembra dunque che le efferenze ORXergiche evocano azioni eccitatorie nei confronti dei neuroni del PVN che producono CRF. Di converso è stato anche proposto che il sistema peptidergico del CRF sia in grado di fornire input anatomici ai neuroni ORXergici modulandone l'attività come risultato da indagini elettrofisiologiche e durante stress acuti. Il CRF depolarizza, infatti, i neuroni ORXergici mentre un simile effetto viene bloccato dall'azione di un antagonista per il recettore per il CRF di tipo 1 (CRF-R₁). In aggiunta, l'attivazione dei neuroni ORXergici durante lo stress sembra essere ostacolata in topi knock-out per il CRF-R₁ (Winsky-Sommerer et al., 2005).

L'attivazione del sistema ORXergico durante lo stress sostiene dunque l'ipotesi che le ORXs occupino una posizione chiave nell'integrare e trasmettere i segnali di stress ad altre regioni encefaliche o a distretti periferici (Winsky-Sommerer et al., 2004).

Il sistema catecolaminergico prende parte anch'esso alle alterazioni comportamentali correlate allo stress. Lo stress risulta infatti associato ad un aumentato rilascio di norepinefrina e dopamina soprattutto in regioni encefaliche implicate nelle alte funzioni cognitive ed affettive. Inoltre, questi stessi neuromediatrici sembrano promuovere il risveglio e contribuire essi stessi alle alterazioni cognitive e comportamentali stress-dipendenti (Berridge, 2008). Alcuni studi hanno sottolineato che l'ORX è capace di stimolare il sistema catecolaminergico attivando i neuroni del LC in maniera analoga a quanto riscontrato in condizioni di stress. Quando somministrata nel ventricolo laterale o direttamente nella VTA, l'ORX-A evoca l'attivazione dei neuroni dopaminergici. Tuttavia, l'azione dell'ORX-A sulla neurotrasmissione dopaminergica sembra essere ristretta ad una sottopopolazione di neuroni che proiettano verso strutture corticolimbiche implicate nelle alterazioni comportamentali correlate allo stress (Berridge et al., 2010).

I neuroni ORXergici sono anche reciprocamente connessi con i neuroni sintetizzanti il NPY, altro sistema peptidergico coinvolto in disparate risposte allo stress (Heilig, 2004). Sia le ORXs che il NPY hanno aree target comuni, come l'AMY, area encefalica con ruolo cruciale nella generazione di risposte a stati di stress acuto (Baldo et al., 2003). Iniezioni i.c.v. di NPY promuovono un effetto sedativo ed ansiolitico sia nei mammiferi (Karlsson et al., 2005) che nei pesci (Matsuda et al., 2011). È stato osservato inoltre che *in vitro* il NPY determina un'iperpolarizzazione dei neuroni ORXergici (Fu et al., 2004). Considerato il ruolo dell'ORX nel promuovere stati di "ipereccitazione" sembrerebbe che gli effetti mediati dal NPY siano dunque dovuti all'inibizione del sistema ORXergico.

Anche i neuroni del nucleo centrale amigdalare (CeA) sembra siano correlati alla stimolazione dei neuroni ORXergici, i quali a loro volta, attivano i nuclei noradrenergici,

istaminergici e colinergici (Samson et al., 2002). D'altro canto, il CeA risulta riccamente innervato dai neuroni ORXergici e ciò è confermato dagli elevati livelli di espressione di ORX₁R e di ORX₂R in tale nucleo amigdalare (Yoshida et al., 2006). Considerato il ruolo dell'AMY nel garantire la memoria di un evento stressante, la correlazione delle ORXs con quest'area limbica potrebbe essere proprio finalizzata a modularne l'attività. Infatti, nell'AMY, tali funzioni si realizzano in modo efficiente proprio grazie alla fitta rete di connessione con strutture nervose quali l'HTH ed il tronco encefalico (Berretta, 2005).

Capitolo III

MATERIALI E METODI

III.1 Modelli sperimentali

III.1.1 *Carassius carassius*

Uno dei modelli sperimentali utilizzati in questo lavoro è il teleosteo d'acqua dolce *Carassius carassius*. Tante sono le motivazioni che ci spingono a focalizzare l'attenzione su tale specie. In primo luogo potrebbe essere considerato una “*pro-survival species*” per le sue straordinarie capacità di sopravvivenza in condizioni ambientali estreme quali le repentine variazioni di temperatura e gli stati ipossici o addirittura anossici. Si tratta inoltre di una specie riconosciuta per le sue spiccate proprietà di neurogenesi e riparazione dei danni neuronali (Kaslin et al., 2008) e quest'ulteriore peculiarità lo rende un modello estremamente interessante per verificare gli effetti del Cu^{2+} e le risposte innescate a livello neuronale per tollerare l'instaurarsi di condizioni di stress dovute all'esposizione ad un potente contaminante acquatico come il Cu^{2+} e i meccanismi preposti alla riparazione dei danni mediati dalla tossicità di questo o altri agenti tossici.

III.1.1.1 *Ecologia e Biologia di Carassius carassius*

Carassius carassius è una specie di origine asiatica, di cui non è facile stabilire l'areale naturale per le numerose immissioni avvenute già in epoca remota. Questa specie è molto diffusa in Europa dall'Inghilterra sud-orientale e dalla Carelia centro-settentrionale all'Italia e alla penisola Balcanica sud-orientale; è presente inoltre nell'Asia settentrionale e centrale, a sud sino al Turkestan e alla Cina settentrionale. In Italia la specie è alloctona e fu introdotta forse già dalla metà del XIX secolo e ad oggi vive, probabilmente, in tutte le regioni continentali e peninsulari. La sua presenza è stata accertata nella pianura Padana, negli stagni artificiali del Carso triestino e in Romagna. È stato segnalato nella Toscana nord-occidentale (a sud sino al corso dell'Arno), nelle Marche, in Sicilia (Palermo) e nelle acque di diversi fiumi della Calabria (Gallo et al., 2011).

La famiglia dei Ciprinidi a cui questo teleosteo appartiene, collocata all'interno dell'ordine dei Cypriniformes, comprende numerose specie che presentano caratteristiche comuni (Fig. III.1). Inoltre, il *Carassius carassius* ha un notevole interesse commerciale, particolarmente nel caso della varietà con livrea dai riflessi rosso-dorati, varietà spesso confusa, proprio per questo con il *Carassius auratus*.

REGNO	ANIMALIA
<i>PHYLUM</i>	<i>CORDATI</i>
<i>SUBPHYLUM</i>	<i>VERTEBRATI</i>
<i>SUPERCLASSE</i>	<i>GNATOSTOMI</i>
<i>CLASSE</i>	<i>OSTEITTI</i>
<i>INFRACLASSE</i>	<i>TELEOSTEI</i>
<i>ORDINE</i>	<i>CIPRINIFORMI</i>
<i>FAMIGLIA</i>	<i>CIPRINIDI</i>
<i>GENERE</i>	<i>Carassius</i>
<i>SPECIE</i>	<i>Carassius carassius</i>

Fig. III.1 Classificazione sistematica di *Carassius carassius*.

La specie *Carassius carassius* è considerata altamente polimorfica; gli esemplari che vivono nei laghi e nei fiumi maggiori presentano un corpo alto e relativamente corto, mentre quelli che abitano in stagni e paludi sono caratterizzati da una forma un pò più allungata. *Carassius carassius* è molto simile ad una carpa priva però di barbigli. Ha 23-35 branchiospine sul primo arco branchiale. La pinna dorsale, lunga e con il margine dritto o leggermente concavo, presenta 3-4 raggi indivisi e 14-22 divisi, il principale dei quali è debolmente dentellato sul lato posteriore. La pinna anale ha 3 raggi indivisi e 5-8 raggi divisi e la pinna caudale è debolmente bilobata. Possiede 32 vertebre. Il dorso ha un colore bruno o bruno-verdastro, colore che sui fianchi si fa più chiaro o giallastro, assumendo anche riflessi bronzesi. Sulla parte posteriore del peduncolo codale è talvolta presente una macchietta nera. Le pinne pettorali, ventrali e anale sono più o meno rosastre; le altre pinne sono scure. La lunghezza degli adulti tocca i 75 cm (in Italia arriva di solito a 35 cm e solo eccezionalmente a 50 cm). (Fig. III.2) (Kottelat e Freyhof , 2007).



Fig. III.2 Esemplare di *Carassius carassius*

Carassius carassius vive in acque stagnanti ricche di vegetazione o in quelle a corrente lenta. Trascorre l'inverno in latenza, sul fondo dello stagno in cui vive, immerso quasi completamente nel fango che lo protegge in caso di congelamento dell'acqua. Si nutre di zooplancton, di lombrichi e di larve d'insetti, ma anche di vegetali. Per ciò che concerne la riproduzione l'accoppiamento si verifica da maggio a luglio, quando la temperatura dell'acqua è superiore ai 14°C sebbene la temperatura ottimale sia 19-20°C. Le uova si presentano viscido, rosso-chiare e del diametro di 1,5 mm e vengono deposte sulla vegetazione; gli avannotti, lunghi 4.2-4.9 mm, schiudono dopo 5-7 giorni e rimangono inattivi sulle piante per circa 2 giorni. La maturità sessuale è raggiunta generalmente a 3-4 anni. Dopo il secondo anno di vita le femmine crescono più rapidamente dei maschi, che però sono sessualmente recettivi prima delle loro *partner* (Kottelat e Freyhof, 2007).

Strategie pro-sopravvivenza di Carassius carassius

Carassius carassius si distingue per la sua capacità di vivere in habitat anche molto freddi e poveri di ossigeni. Durante l'inverno, al di sotto di lastre di ghiaccio, è costretto ad adattarsi ad un ambiente povero o del tutto privo di ossigeno a causa della limitata diffusione dell'ossigeno dall'aria. La stessa resistenza non caratterizza i suoi predatori che in simili habitat non hanno alcuna possibilità di sopravvivenza. *Carassius carassius* è addirittura in grado di resistere a stati anossici per uno o due giorni anche a temperatura ambiente. A tal proposito, è stato osservato che, l'unico fattore limitante la sopravvivenza

di *Carassius carassius* in un ambiente privo di ossigeno è l'esaurimento delle riserve di glicogeno (Nilsson, 1990). Le cellule in condizioni di anossia hanno la possibilità di sfruttare il glucosio contenuto nel glicogeno come unica fonte energetica. Esclusivamente a livello del tessuto muscolare scheletrico di *Carassius carassius* il lattato viene convertito in etanolo (Van Waarde, 1991). L'etanolo, essendo molto più lipofilico del lattato, entra nel sangue per venire poi eliminato attraverso le branchie. Questo potrebbe essere uno dei potenziali adattamenti che consente il mantenimento dell'attività fisica e metabolica del pesce durante stati anossici sia acuti che cronici. Infatti, dal momento che la produzione di etanolo rimuove il costante accumulo di lattato, il funzionamento di questo *pathway* potrebbe salvaguardare il pesce dalla depressione metabolica.

Un aspetto molto interessante risulta inoltre la capacità di tale specie di compensare i deficit metabolici indotti da anossia mantenendo l'encefalo in uno stato funzionalmente attivo (Nilsson, 2001). In *Carassius carassius* a livello encefalico è possibile assistere ad una riduzione metabolica del 30-40% (Johansson et al., 1995), ma attraverso la via glicolitica (Duncan e Storey, 1991), esso mantiene costanti i livelli di ATP e di conseguenza i gradienti ionici (Johansson e Nilsson, 1995). A livello encefalico in risposta all'anossia è stato inoltre rilevato un incremento del flusso di sangue promosso dall'adenosina (Nilsson et al., 1994). L'adenosina potrebbe partecipare a tale modulazione neuronale inibendo il rilascio di uno dei maggiori neurotrasmettitori eccitatori, ossia il glutammato (Rosati et al., 1995). Durante gli stati anossici si verifica anche l'attivazione di enzimi antiossidanti come la GPx al fine di limitare i danni ossidativi che potrebbero derivare da una successiva riossigenazione dei tessuti (Lushchak et al., 2001).

III.1.1.2 Encefalo di Carassius carassius

Regione telencefalica

Il telencefalo di *Carassius carassius* comprende due bulbi olfattivi (OB) e due emisferi telencefalici. I OB, anteriormente agli emisferi telencefalici, presentano quattro strati concentrici ovvero lo strato dei nervi olfattori primari che rappresenta lo strato più periferico, lo strato glomerulare, lo strato delle cellule mitrali e lo strato delle cellule dei granuli che è invece il più profondo. Nei OB è possibile riscontrare tre tipi cellulari distinguibili sulla base delle dimensioni e degli organelli citoplasmatici presenti: cellule mitrali, cellule dei granuli e cellule dai corti assoni. Gli assoni dei nervi olfattivi primari formano contatti sinaptici con i dendriti delle cellule mitrali a livello dello strato glomerulare. Nello strato delle cellule mitrali possono inoltre essere osservate sinapsi

reciproche tra i dendriti delle cellule mitrali ed i dendriti delle cellule dei granuli. Caudalmente lo strato cellulare più interno si congiunge agli emisferi. L'area telencefalica dorsale (D) denominata pallio, è suddivisa in parte mediale (Dm), dorsale (Dd), laterale (Dl) e posteriore (Dp) (Northcutt, 2006). Dm e Dl costituiscono il polo rostrale, al contrario Dp forma quello caudale. Dm possiede uno strato superficiale di cellule simili a granuli, che vanno a ricoprire un raggruppamento centrale di cellule più grandi, le cui dimensioni tendono ad aumentare verso gli strati più profondi. Questa porzione palliale riceve informazioni gustative attraverso il nucleo talamico posteriore (NTP) oltre che afferenze uditive e chemosensoriali. Rostralmente, un solco ipsilaterale separa Dm da Dl nel quale si riscontra inoltre un evidente incremento delle dimensioni cellulari. Le due suddivisioni dorsale e ventrale di Dl (Dld e Dlv) presentano delle differenze; le dimensioni delle cellule di Dld sono maggiori e tendono a ridursi man mano che ci si sposta verso gli strati più profondi. Mentre queste due suddivisioni sono facilmente riconoscibili a livello della commissura anteriore, a livello della zona caudale del telencefalo non ve ne è traccia, e il polo ventrale è caratterizzato dai soli strati più esterni di Dlv ed inizia a delinearli Dp.

L'altra importante area telencefalica è quella ventrale, o subpallio, anch'essa caratterizzata da suddivisioni cellulari. Nella porzione più rostrale si ritrova la componente dorsale del telencefalo ventrale (Vd) dove è possibile riconoscere tre sottocubi dorsale, intermedio e ventrale. Spostandoci più caudalmente si forma la divisione ventrale del telencefalo ventrale (Vv). La parete dorsomediale è occupata dal nucleo sovracommissurale (Vs). Lateralmente a Vd e Vv vi è la parte centrale del telencefalo ventrale (Vc), mentre ventrocaudalmente Vs viene sostituito dal nucleo post-commissurale del telencefalo ventrale (Vp) che segna il confine tra telencefalo e diencefalo (Northcutt, 2006).

Regione diencefalica

Il diencefalo, posto caudalmente rispetto al telencefalo presenta sette aree principali: la POA, il talamo, l'epitalamo, l'HTH, il tubercolo posteriore, il sinencefalo e il pretetto. La POA comprende, come in altri ciprinidi, i nuclei cellulari seguenti: nucleo preottico (NPO); nucleo preottico magnocellulare (PM), a sua volta suddiviso in parte gigantocellulare (PMg) e parte magnocellulare (PMm); nucleo preottico parvocellulare (PP), costituito dal nucleo preottico parvocellulare anteriore (PPa) e dal nucleo preottico parvocellulare posteriore (PPp). Sempre in quest'area si riscontra inoltre il nucleo sovrachiasmatico (NSC). La POA delimita inferiormente il talamo. In quest'area

distinguiamo un talamo ventrale ed un talamo dorsale. Il talamo ventrale comprende a sua volta il nucleo ventromediale talamico (NVM), il nucleo intermedio, il nucleo ventrolaterale talamico (NVL). La parte rostrale del talamo ventrale è situata inferiormente alla parte rostrale del nucleo abenulare ventrale (NHv). Il talamo dorsale origina invece sotto la porzione caudale di NHv e presenta un nucleo anteriore e due nuclei caudali quali il nucleo talamico dorsale posteriore (NTdP) e il nucleo talamico centrale posteriore (NTcP). Dorsalmente al talamo si ritrova l'epitalamo costituito dal nucleo abenulare (NH), struttura pari di dimensioni paragonabili, e da una regione subabenulare. NH presenta dunque una porzione ventrale NHv e una dorsale NHd.

L'HTH in questo come in altri teleostei presenta un lobo tuberale mediale e due lobi inferiori, il primo dei quali delimita il terzo ventricolo. La porzione mediale di HTH è formata dal nucleo tuberale laterale (NLT), dal nucleo tuberale anteriore (NAT), dal nucleo del recesso posteriore (NRP) e dal nucleo del sacco vascoloso (NSV). NLT è la parte più rostrale dell'HTH ed è ulteriormente suddiviso in parte anteriore (NLTa), parte inferiore (NLTi), parte laterale (NLTl) e parte posteriore (NLTp). Il lobo inferiore dell'HTH invece è costituito dal nucleo anteriore dell'ipotalamo (NAH), il nucleo diffuso del lobo inferiore (NDLI), il nucleo del recesso laterale (NLR) ed il nucleo cerebellare dell'ipotalamo (NCH). Più caudalmente, la zona ipotalamica dorsale forma una coppia di recessi ventricolari laterocaudali. Accanto a tali nuclei, si trovano altri due nuclei derivati presumibilmente dalla migrazione delle cellule periventricolari ovvero il nucleo diffuso, che presenta cellule piccole, e il nucleo centrale, costituito da cellule più grandi del lobo ipotalamico inferiore. La porzione più caudale dell'HTH comprende nella sua zona dorsomediale il corpo mammillare (CM). La zona ipotalamica caudale ha inizio con il nucleo sottile periventricolare situato ventralmente al nucleo tuberale posteriore (NPT) del tubercolo posteriore. Più caudalmente, l'HTH caudale è rappresentato da una coppia di recessi posteroventricolari circondati da nuclei periventricolari. In posizione ventromediale si riscontra il sacco vascoloso (SV) che a livello caudale assume una posizione dorsale rispetto all'HTH. I lobi inferiori nei teleostei presiedono alla ricezione e smistamento di informazioni multisensoriali. Ad essi giungono ad esempio informazioni dal nucleo sovrachiasmatico (NSC) o dal nucleo gustativo secondario e da essi vengono inviate proiezioni alla formazione reticolare della porzione rostrale del peduncolo cerebrale.

Il tubercolo posteriore come negli altri teleostei può essere diviso in area periventricolare e area migrata. L'area migrata comprende un gruppo di nuclei localizzati ventrolateralmente al talamo dorsale e ventrale che viene definito complesso

preglomerulare (NPG), il nucleo caudomediale, il nucleo del toro laterale, NPT ed il nucleo talamico laterale (NTL). Nei ciprinidi NPG presenta quattro nuclei: anteriore (NPGa), laterale (NPGl), mediale (NPGm) ed il nucleo gustativo terziario preglomerulare (pTGN). I nuclei supplementari che fanno parte del tubercolo sono NTP, SG e i tori laterali (TLa). Il principale nucleo di TLa è rappresentato dal nucleo diffuso dei tori laterali (NDTL). In posizione più caudale, tra pTGN e TLa si forma NTP (Yamamoto e Ito, 2005). L'area periventricolare del tubercolo posteriore comprende invece sia il nucleo periventricolare del tubercolo posteriore (TPp) che PVO.

Il pretetto, altra importante area diencefalica, include il pretetto periventricolare, centrale e superficiale. Quest'ultimo comprende i nuclei parvocellulare (PSp) e magnocellulare (PSm). Il PSm caudalmente confina con il nucleo posteriore del pretetto (PO). Il nucleo centrale del pretetto (CPN) si trova in posizione dorsale rispetto a PSm e a PO, mentre il nucleo accessorio del pretetto si trova dorsolateralmente al nucleo posteriore del pretetto.

Regione mesencefalica

Il mesencefalo di *Carassius carassius* è rappresentato dorsalmente dall'OT e ventralmente da tegmento e tori semicircolari (TS). L'OT, come per gli altri teleostei, risulta costituito da strati cellulari concentrici che dall'esterno verso l'interno sono: lo strato marginale (SM), lo strato ottico (SO), strato fibroso grigio esterno (SFGS), lo strato grigio centrale (SGC), lo strato albino centrale (SAC) e lo strato periventricolare (SPV).

Le cellule dello SPV possiedono corpo cellulare piriforme e i dendriti apicali scendono verso lo SGC. Le cellule presenti in SGC di medie e grandi dimensioni, sono di tipo multipolare con soma di forma sferica. I due lobi ottici sono interconnessi da una commessura composta da due fasci di fibre assoniche (Herrero et al., 1999). Le cellule di OT, che si proiettano attraverso il tratto discendente controlaterale verso le strutture più caudali del peduncolo encefalico, inviano un numero limitato di assoni collaterali alle proiezioni tettotettali. Nei teleostei, contrariamente agli altri vertebrati lo strato più superficiale del tetto non presenta le fibre della retina, ma consiste in assoni i cui corpi cellulari si riscontrano a livello del toro longitudinale (TLo). L'ultimo strato cellulare è rappresentato da una coppia di eminenze longitudinali di cellule granulari attigue al tetto ed è localizzato a livello del ventricolo mediale del tetto (Wullimann et al., 1996).

I tori semicircolari (TS) dei ciprinidi, incluso *Carassius carassius* sono sede di integrazioni sensoriale e comprendono il nucleo semicircolare centrale (TSc) coinvolto nell'udito ed il

nucleo semicircolare ventrolaterale (TSvl) coinvolto nella meccano-recezione (McCormick e Hernandez, 1996). In tutti i teleostei i TS sono deputati, infatti, alla ricezione di proiezioni ascendenti di natura auditiva e quelle provenienti dal sistema della linea laterale (Meek e Nieuwenhuys, 1998).

Cervelletto

Il cervelletto di *Carassius carassius* presenta tre regioni fondamentali: il lobo vestibololaterale, il corpo del cervelletto (CCe) e la valvola del cervelletto (VCe), comprendente una porzione mediale (Vam) e laterale (Val). Sebbene la VCe si estenda all'interno del ventricolo del tetto, viene considerata per le sue caratteristiche istologiche come una struttura cerebellare. La valvola del cervelletto è presente unicamente nei pesci. Importante tipo cellulare che caratterizza il cervelletto dei ciprinidi è la cellula euridendroide (Ikenaga et al., 2005). Trattasi di cellule con corpo di dimensione notevole che nel corpo del cervelletto vengono distinte in tre tipologie sulla base della loro morfologia: fusiformi, poligonali e monopolari. Le cellule fusiformi hanno corpo cellulare a forma di fuso dal quale si dipartono due dendriti primari. Le cellule di tipo poligonale hanno invece corpo cellulare piramidale o multipolare dal quale si dipartono da due a quattro dendriti primari. Il tipo monopolare possiede un solo prolungamento dendritico. Le cellule euridendroidi si rinvengono principalmente a livello dello strato del Purkinje ma si ritrovano, anche se in misura minore, anche nello strato molecolare e dei granuli. In particolare il tipo monopolare è distribuito in modo predominante nello strato delle cellule del Purkinje occupando l'area ventrocaudale del CCe (Fig. III.3C). Le cellule presenti nello strato delle cellule del Purkinje e nello strato molecolare inviano i dendriti nello strato molecolare, mentre le cellule presenti nello strato delle cellule dei granuli inviano i propri dendriti nello stesso strato delle cellule dei granuli. I prolungamenti che vengono inviati nello strato molecolare formano numerose sinapsi con le fibre parallele che, al contrario non possono formarsi nel caso di da quelle presenti nello strato delle cellule dei granuli. Queste ultime potrebbero quindi avere funzioni diverse rispetto alle cellule che occupano lo strato delle cellule del Purkinje e lo strato molecolare.

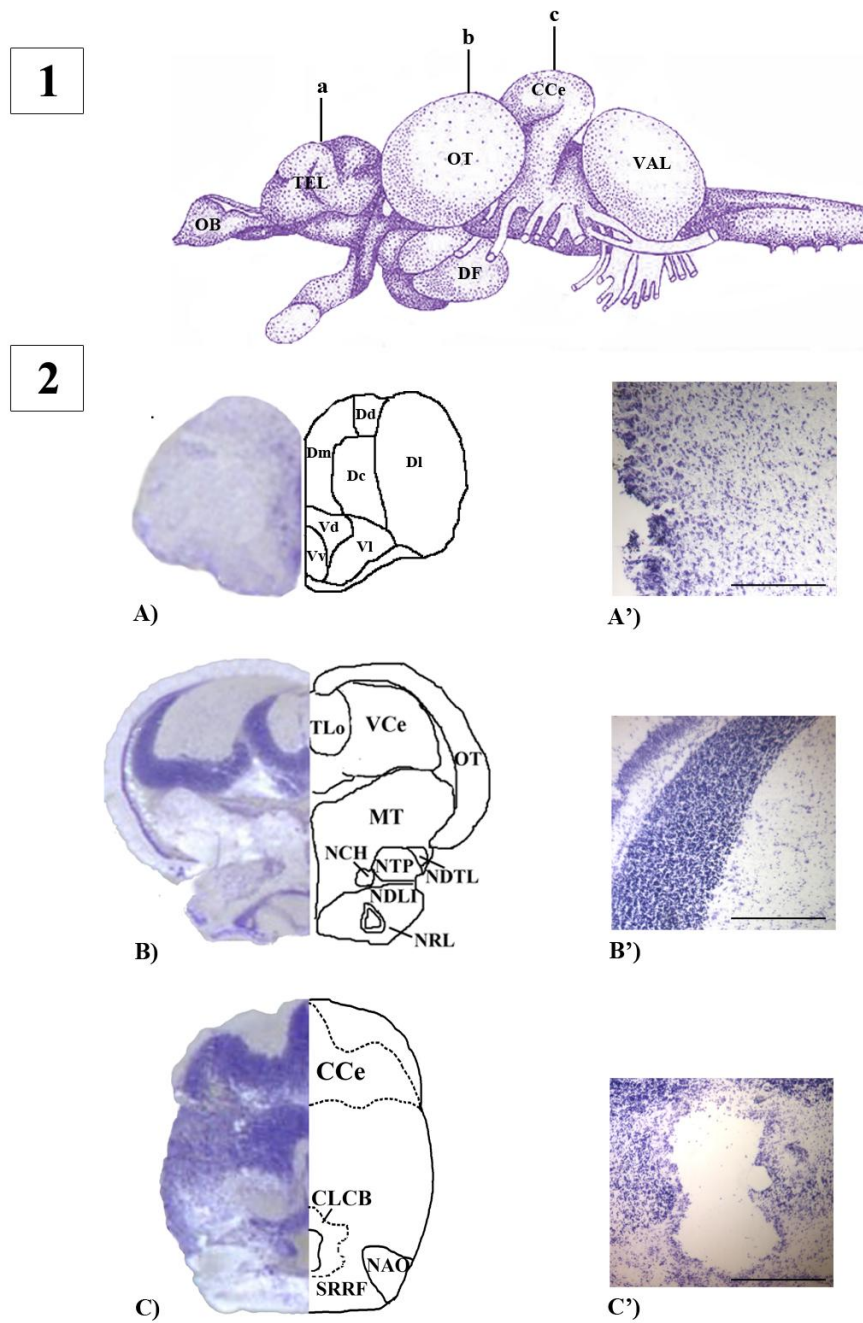


Fig. III.3 1) Encefalo di *Carassius carassius* con piani di taglio a livello delle aree telencefaliche (a), medio-posteriori (b) e cerebellari (c). 2) Sezioni encefaliche trasversali rappresentative dell'area telencefalica (A), medio-posteriore (B) e cerebellare (C) colorate con il metodo di Nissl e relativi particolari di DI (A'), OT (B'), CLCB (C'). Scale bar: 170 μ m. Abbreviazioni: CCe: corpo del cervelletto; CLCB: lobo caudale del corpo cerebellare; Dc: nucleo centrale del telencefalo dorsale; Dd: nucleo dorsale del telencefalo dorsale; DI: nucleo laterale del telencefalo dorsale; Dm: nucleo mediale del telencefalo dorsale; MT: tegmento mesencefalico; NAO: nucleo anteriore octavale; NCH: nucleo cerebelloso dell'ipotalamo; NDLI: nucleo diffuso del lobo inferiore; NDTL: nucleo diffuso dei tori laterali; NRL: nucleo del recesso laterale; NTP: nucleo posteriore del talamo; OT: tetto ottico; SRRF: formazione reticolare superiore romboencefalica; TLo: tori longitudinali; VCe: valvola del cervelletto; Vd: nucleo dorsale del telencefalo ventrale; VI: nucleo laterale del telencefalo ventrale; Vv: nucleo ventrale del telencefalo ventrale.

III.1.2 Thalassoma pavo

La scelta come modello sperimentale del teleosteo marino *Thalassoma pavo*, meglio conosciuto con il nome comune di *Donzella pavonina* si deve a diverse caratteristiche che lo contraddistinguono prima fra tutte il suo importante ruolo ecologico di pesce pulitore critico per la stabilità degli ecosistemi acquatici. Diverse evidenze hanno già sottolineato la validità di tale specie sia nello studio delle alterazioni neurocomportamentali e molecolari promosse dall'esposizione di organismi marini ad inquinanti ambientali, oltre che nello studio dei meccanismi neuronali che sottendono eventuali comportamenti adattativi a condizioni di stress, poco conosciuti nei pesci. Inoltre, l'utilizzo di tale modello ha consentito di recente di ampliare le conoscenze su alcuni sistemi neuronali quali il sistema Istaminergico (Giusi et al. 2008) ed ORXergico (Facciolo et al. 2009) con ruolo critico per la regolazione delle principali funzioni vitali nei teleostei. La facile reperibilità ed adattabilità alle condizioni sperimentali, lo rendono, in fine, un valido modello per studi tossicologici di laboratorio (Giusi et al., 2005); studi che sono in prima istanza volti all'acquisizione delle conoscenze in merito alla pericolosità di alcune sostanze che di continuo vengono immesse nell'ambiente, al fine di preservare una specie così importante per la sopravvivenza anche di altre specie di riconosciuto valore commerciale.

III.1.2.1 Ecologia e Biologia di Thalassoma pavo

Thalassoma pavo è un teleosteo marino particolarmente diffuso lungo tutte le coste del mar Mediterraneo centro-meridionale ma originario delle coste tropicali dell'Atlantico orientale. Appartiene alla famiglia dei Labridi collocata all'interno dell'ordine dei perciformi (Fig. III.4), e comprendente differenti specie che popolano fondali sia a scoglio che sabbiosi di mari ed oceani temperati e tropicali. Nello specifico gli esemplari di *Thalassoma pavo* prediligono fondali ben illuminati, rocciosi, poco profondi e ricchi di alghe. Tendono ad affondarsi nella sabbia, dove si nutrono di molluschi e crostacei e generalmente nuotano costituendo piccoli branchi.

REGNO	ANIMALIA
PHYLUM	CORDATI
SUBPHYLUM	VERTEBRATI
SUPERCLASSE	GNATOSTOMI
CLASSE	OSTEITTI
INFRACLASSE	TELEOSTEI
ORDINE	PERCIFORMI
FAMIGLIA	LABRIDI
GENERE	<i>Thalassoma</i>
SPECIE	<i>Thalassoma pavo</i>

Fig. III.4 Classificazione sistematica di *Thalassoma pavo*.

Questi teleostei presentano dimorfismo sessuale che consiste in livree differentemente colorate in particolare durante la stagione riproduttiva. Entrambi i sessi possiedono striature sul capo, le femmine si distinguono per le bande gialle e brune longitudinali attraversate da cinque bande azzurre verticali, i maschi, invece sono tendenti al verde e presentano dietro la pinna pettorale due bande verticali rispettivamente blu e rossa. Il corpo è allungato e fusiforme ed il profilo superiore dalla testa alla base della pinna dorsale è convesso. Tutto il corpo, ad eccezione della testa, è ricoperto da squame. Possiede una bocca piccola con una sola fila di denti piccoli e aguzzi. Gli adulti presentano un'unica pinna dorsale di altezza uniforme, mentre quella caudale è caratterizzata da diversi lobi appuntiti, più allargati negli individui adulti. Gli animali appartenenti a questa specie possono raggiungere nello stadio adulto una lunghezza di 25 cm al massimo (Fig. III.5). *Thalassoma pavo* è caratterizzato inoltre da ermafroditismo proteroginico di tipo diandrico, ovvero gli individui si riproducono e si sviluppano in un primo momento come femmine, ma qualora la popolazione di individui maschili dovesse diventare esigua, tali individui cambiano il loro assetto sessuale da femminile a maschile. La riproduzione avviene principalmente d'estate e le uova sono planctoniche, cioè vengono trasportate dalle correnti.



Fig. III.5 Esemplare di *Thalassoma pavo*.

III.1.2.2 Encefalo di Thalassoma pavo

Regione telencefalica

Nei pesci a pinna raggiata, l'eversione della metà dorsale delle pareti laterali del prosencefalo dorsolaterale porta alla formazione di due strutture solide che circondano un'unica cavità ventricolare. Il grado di eversione varia in modo considerevole negli attinopterigi. La citoarchitettura del telencefalo di questi pesci è stata ben descritta in diverse specie. Gli emisferi telencefalici e l'ependima sono state proposte come strutture omologhe rispettivamente del subpallio e del pallio dei tetrapodi.

In *Thalassoma pavo* il telencefalo presenta due regioni principali, il telencefalo ventrale e dorsale, che comprendono complessivamente ventidue nuclei diversi. Nei pesci a pinna raggiata il telencefalo ventrale mostra un pattern di organizzazione relativamente costante, nonostante la variabilità di dimensioni e numero di gruppi cellulari. Al contrario, il telencefalo dorsale mostra variazioni nella composizione istologica e morfologica molto più evidenti rispetto a quelle del telencefalo ventrale. Nella regione più rostrale dell'encefalo rinveniamo i OB, strutture sessili che prendono contatto con agli emisferi cerebrali attraverso lunghi e sottili peduncoli che circondano le estensioni dei ventricoli emisferici. I OB hanno una struttura organizzata in cinque lamine concentriche in cui si susseguono: lo strato delle fibre olfattive primarie (OLN), lo strato glomerulare (GL), lo strato cellulare esterno (ECL), lo strato di fibre olfattive secondarie (SOF), e lo strato cellulare interno (ICL). Caudalmente, la stratificazione in lamine tipica dei bulbi diviene

meno evidente e le cellule dell'ICL si uniscono nel telencefalo ventrale. Il telencefalo ventrale è composto da quattro ammassi cellulari periventricolari: i nuclei dorsale, ventrale, sopracommissurale e postcommissurale, e da quattro gruppi cellulari disposti lateralmente ovvero i nuclei laterale, centrale, intermedio ed entopeduncolare. Questa regione è suddivisa in due regioni ovvero le regioni pre- e post-commissurali. Ai nuclei precommissurali appartengono: Vd, Vv e VI. Il Vd rappresenta la regione più rostrale che compare nel telencefalo ventrale e presenta cellule di medie dimensioni. Il Vv, più caudalmente, è composto da cellule di piccole dimensioni e meno compatte. Uno strato di cellule endodimali che corrisponde alla parte più dorsale di Vv riveste il ventricolo; questa regione prende il nome di organo settale laterale (LSO) per la somiglianza con la omonima struttura descritta negli Uccelli. Neuroni piccoli e sparsi caratterizzano invece il VI localizzati dorsomedialmente al solco esterno. Il Vc si ritrova in posizione caudale e dorsolaterale rispetto a VI, a livello commissurale. Il Vs localizzato rostralmente alla commissura anteriore, presenta cellule più piccole e meno compatte di Vc. In posizione post-commissurale, incontriamo invece il nucleo post-commissurale (Vp), il nucleo intermedio (Vi) ed il nucleo entopeduncolare (E). Il Vp, possiede cellule piccole che vanno a delimitare la regione di transizione tra le regioni telencefaliche e quelle diencefaliche. Il Vi, nella regione caudale del telencefalo ventrale si ritrova in posizione dorsomediale rispetto alla porzione laterale del cervello anteriore. Infine, E presenta cellule molto piccole e densamente raggruppate.

La porzione dorsale del telencefalo in *Thalassoma pavo* presenta tredici nuclei che risultano organizzati in cinque regioni principali quali le regioni mediale, dorsale, laterale, centrale e posteriore. In questa area sulla superficie dell'emisfero cerebrale è possibile distinguere tre solchi: il solco ipsiliforme, sulla superficie dorsale del telencefalo, il solco *limitans*, nella zona mediale, che delimita medialmente le aree telencefaliche dorsali e ventrali ed il solco esterno, una profonda fessura nella regione basale che segna i confini ventrolaterali tra il telencefalo dorsale e ventrale. Le cinque popolazioni cellulari del telencefalo dorsale vanno a costituire Dm, Dd, Dc, che occupa la regione centrale del telencefalo dorsale tra Dm e Dd; Dl, che è la regione più estesa del telencefalo dei pesci (Fig. III.6.2A), e Dp, in posizione più caudale. Nella regione telencefalica posteriore si riscontra inoltre il nucleo tenia (NT), in cui risiede la tela coroidea .

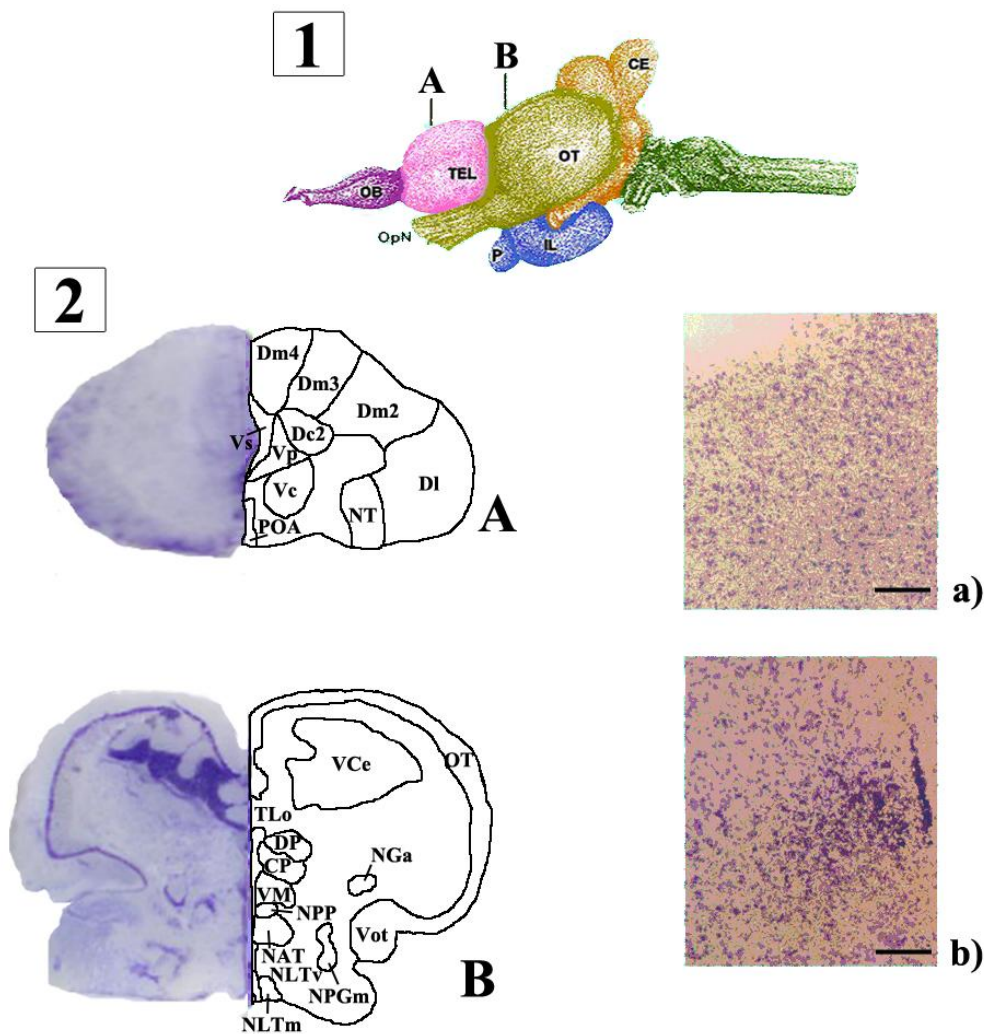


Fig. III.6 1) Encefalo di *Thalassoma pavo* con piani di taglio a livello delle aree telencefaliche (A) e medio-posteriori (B). 2) Sezioni trasversali dell'area telencefalica (A) e particolare di DI (a), medio-posteriore (B) con particolare di NAT (b). Scale bar: 90 μ m. Abbreviazioni: CE: cervelletto; CP: nucleo talamico centrale posteriore; Dc2: seconda parte centrale del telencefalo dorsale; DI: nucleo laterale del telencefalo dorsale; Dm2, Dm3, Dm4: seconda, terza e quarta divisione mediale del telencefalo dorsale; DP: nucleo talamico dorsale posteriore; IL: lobo inferiore dell'HTH; OB: bulbi olfattivi; OpN: nervo ottico; NAT: nucleo del tubercolo anteriore; NPGm: nucleo preglomerulare mediale; NLTm: parte mediale del nucleo laterale tuberale; NLTv: parte ventrale del nucleo tuberale laterale; NPP: nucleo posteriore periventricolare; NT: nucleo tenia; OT: tetto ottico; P: ipofisi; POA: area preottica; TEL: telencefalo; TLo: toro longitudinale; Vc: nucleo centrale; VCe: valvola del cervelletto; VM: nucleo talamico ventromediale; Vp: nucleo postcommissurale; Vs: nucleo sovracommissurale.

Regione diencefalica

Il diencefalo è probabilmente la regione più complessa dell'encefalo dei teleostei nella quale sono compresi centri di integrazione di informazioni gustative, olfattive, riproduttive e soprattutto visive. Tra i pesci a pinna raggiata è stata riscontrata una variazione notevole

del diencefalo. In particolare, le differenze inter-specie sembrano interessare per lo più il tubercolo posteriore ed il pretetto che rappresentano le regioni di maggiore variabilità nei teleostei.

Il diencefalo appare costituito strutturalmente e funzionalmente in otto regioni quali la POA, il talamo ventrale e dorsale, l'epitalamo, l'HTH, il tubercolo posteriore, il sinencefalo, il pretetto ed i nuclei ottici accessori. La POA mostra un'elevata conservazione nei teleostei, mentre elevata variabilità si riscontra a livello ipotalamico (Cerdà-Reverter et al., 2001b). In *Thalassoma pavo* la POA confina rostralmente con la commissura anteriore, dorsalmente con il telencefalo, con il talamo ventrale e con il tubercolo posteriore, ventralmente con il chiasma ottico e con l'HTH dorsale. Nella regione più anteriore di POA, in posizione caudale rispetto alla commissura anteriore, si rinviene la presenza del nucleo preottico parvocellulare (NPO), che circonda la parte rostrale del recesso preottico, che per le differenze funzionali e morfologiche è suddiviso in due parti: la anteroventrale (NPOav) e parvocellulare (NPOpc). NPOav presenta cellule di piccole dimensioni e densamente stipate contro la parete del recesso preottico. Le piccole cellule di NPOpc si dispongono invece in lamine longitudinali a ridosso del ventricolo. Il nucleo preottico magnocellulare (PM), localizzato più ventralmente rispetto a NPOpc è costituito da tre regioni una regione parvocellulare (PMpc), una magnocellulare (PMmc), localizzate caudalmente al nucleo periventricolare anteriore (NAP) ed una gigantocellulare (PMgc), all'estremità caudale di POA, dorsalmente alla suddivisione magnocellulare, caratterizzata dalla presenza di cellule giganti. I nuclei PMpc e PMmc sono costituiti da cellule di grandi dimensioni che nel PMmc si organizzano in una lamina di maggiore spessore formata da tre o quattro cellule. Il nucleo periventricolare anteriore (NAPv) confina dorsalmente con il PMgc e ventralmente con NSC, ed è caratterizzato da cellule di medie e grandi dimensioni organizzate in lamine parallele. Al polo caudale di POA, al confine della regione ipotalamica, NAP è sostituito dal nucleo periventricolare posteriore (NPPv). Il talamo ventrale presenta quattro nuclei principali in direzione rostro-caudale quali: il nucleo dell'eminenza talamica (NTe) nella zona più rostrale del talamo ventrale, costituita da cellule piccole e intensamente colorate; il nucleo talamico ventromediale (VM), costituito da un ispessimento dello strato ependimale composto da piccole cellule saldamente stipate contro la superficie ventricolare; il nucleo talamico ventrolaterale (VL), lateralmente a VM, che mostra neuroni fusiformi con processi dendritici laterali; il nucleo talamico intermedio (I), collocato ventralmente all'abenula ipotalamica e dorsalmente a VM, che non mostra più la connessione con la superficie ventricolare. Il talamo dorsale è

costituito da tre nuclei: il nucleo talamico anteriore (A), il nucleo talamico posteriore dorsale (DP) ed il nucleo talamico posteriore centrale (CP). Il più rostrale di questi è A che si trova ventro-caudalmente all'abenula contenente cellule piccole e rotonde, che sembrano relativamente stipate in posizione periventricolare. Il DP origina in posizione ventromediale rispetto al fascicolo retroflesso. In questo nucleo è possibile osservare un addensamento di piccole cellule addossate alla parete del ventricolo, mentre cellule piccole e più sparse si estendono lateralmente. Caudalmente il DP aumenta di dimensione e le sue cellule diminuiscono in densità. Il CP, invece, si trova in posizione ventrale rispetto al DP e risulta costituito rostralmente da due o più lamine orientate dorsoventralmente le cui cellule mostrano processi dendritici diretti lateralmente. Tali cellule sono più grandi e più intensamente colorate di quelle del DP, possiedono una forma fusiforme e mostrano un gradiente di dimensione dalla porzione dorsale a quella ventrale della lamina. Ancora più caudalmente, il CP presenta un caratteristico orientamento dorsomediale-ventrolaterale con le cellule più mediali strettamente addensate contro il solco ventricolare.

L'epitalamo è tra le regioni diencefaliche di maggiore variabilità nei teleostei. E' costituito da NH, dalla commissura abenulare e dall'epifisi. NH è una struttura pari e simmetrica posizionata dorsalmente al talamo ventrale, nell'area dorsale del diencefalo rostrale con medesime dimensioni in entrambi i lati dell'encefalo. I nuclei dell'abenula sono suddivisi anche in questo teleosteo in una parte dorsale NHd, contenente cellule piccole e intensamente colorate, e una ventrale, NHv con cellule più piccole e meno colorate, organizzate in lamine cellulari periventricolari.

L'HTH emerge, invece, centralmente al polo caudale della POA ed è composto da un lobo tuberale mediale e da due lobi inferiori. Il lobo tuberale confina con il terzo ventricolo, che si espande lateralmente a livello rostrale dando origine a due diverticoli, noti come recessi laterali. Al contrario la parte caudale del ventricolo ipotalamico forma il recesso posteriore, che spesso mostra diverticoli diretti ventrolateralmente. Nel lobo tuberale mediale si possono distinguere diversi raggruppamenti neuronali che costituiscono: il nucleo tuberale laterale (NLT), il nucleo tuberale anteriore (NAT), il nucleo del sacco vascoloso (NSV). Il NLT occupa la parte rostrale dell'HTH ed è diviso in quattro parti: laterale, mediale, ventrale, dorsale. Quella laterale (NLTl) presenta cellule molto grandi e intensamente colorate che si dispongono rostro-lateralmente al ventricolo ipotalamico. Le parti mediale (NLTm) e ventrale (NLTv) emergono in corrispondenza del punto di origine del ventricolo ipotalamico, in particolare la parte ventrale delimita la porzione ventrale del ventricolo e la mediale è disposta lateralmente alla suddivisione

ventrale. Lateralmente alla parte dorsale di NLT appaiono invece cellule sparse e fusiformi, a tipica forma triangolare, che vanno a formare il NAT. Caudalmente al NAT, il ventricolo ipotalamico mostra un solco dorsale ed uno ventrale, associati rispettivamente alle parti dorsali e ventrali di NLT. Lateralmente a tali solchi, si estendono due gruppi cellulari, costituiti da cellule caratterizzate da un alto grado di densità nella loro porzione mediale rispetto alla porzione più laterale, che costituiscono il NRP, che compare come ispessimento dello strato ependimale con cellule piccole e aggregate in posizione ventromediale. Ancora più caudalmente, le cellule di questo nucleo si espandono lateralmente ed assumono disposizione colonnare lungo i diverticoli laterali del recesso posteriore. Sempre a livello dell'HTH posteriore, la porzione dorsale del ventricolo ipotalamico appare rivestita dalle cellule del NSV. NSV presenta cellule intensamente colorate e strettamente aggregate che formano un ispessimento dello strato cellulare ependimale. I lobi bilobari inferiori dell'HTH comprendono NDLI e le sue suddivisioni ovvero la suddivisione laterale di NRL, anteriormente e più caudalmente il nucleo centrale del lobo inferiore (NCLI), ed il nucleo mediale del lobo inferiore (NMLI). La regione encefalica che costituisce il tubercolo posteriore è suddiviso in un'area periventricolare ed in un'area migrata. L'area periventricolare comprende TPp costituito da cellule di piccole e di media grandezza fusiformi o ovoidali, e l'organo paraventricolare (PVO), con cellule molto piccole che formano una banda spessa lungo la superficie ventricolare. Dorsalmente a NSV e ventralmente a TPp, si ritrova il nucleo tuberale posteriore (NPT), costituito da cellule di medie e grandi dimensioni evidenti lungo la linea mediale ove si congiungono gli emisferi diencefalici. L'area migrata è costituita dal complesso nucleare preglomerulare, composto a sua volta da quattro nuclei in senso rostro-caudale: NPGa, a livello della superficie ventrale dell'encefalo; NPGl, all'inizio del ventricolo ipotalamico e centralmente a NPGa; NGT, localizzato tra NPGa e NPGl; NPGm, nella regione mediale e si espande caudalmente assumendo una posizione più mediale. Il nucleo glomeruloso (NG) presenta una parte anteriore (NGa) e una posteriore (NGp): NGa si trova caudalmente alla superficie intermedia del nucleo pretettale e più caudalmente si estende ventralmente fino a fondersi con NGp. Infine, il nucleo caudo-mediale consiste di raggruppamenti cellulari collocati in posizione mediale: il nucleo preglomerulare commisurale (NPGc), dorsalmente, e CM, centralmente a NPGc e situato dorsalmente rispetto al polo caudale della parte inferiore di NLT.

Tra il diencefalo vero e proprio e il mesencefalo si riscontra il sinencefalo con cinque suddivisioni principali quali l'organo subcommissurale (SCO), che sorge caudalmente

rispetto ad NH e ventralmente alle fibre della commissura posteriore; il nucleo pretettale periventricolare dorsale (PPd), in posizione caudale ad NH e latero-ventrale a SCO; il nucleo pretettale periventricolare ventrale (PPv), che origina in corrispondenza delle regioni medioventrali e ventrali del fascicolo retroflesso; il nucleo paracommissurale (NP), in posizione dorsolaterale alla commissura posteriore e ventrale ad OT; il nucleo del fascicolo longitudinale mediale (nMLF), che emerge al polo caudale della commissura posteriore, sulla superficie dorsale del diencefalo.

La porzione più caudale del diencefalo è costituita infine dal pretetto, in cui si riscontrano diversi nuclei cellulari alcuni di origine sinencefalica ed altri di origine mesencefalica. L'area del pretetto origina con il nucleo parvocellulare pretettale superficiale (PSp), il quale origina al polo rostrale di OT. Il nucleo pretettale centrale (NPC) costituito da cellule di piccole o medie dimensioni, nella zona rostrale del pretetto è invece il nucleo più grande di questa area. Il nucleo corticale (NC), che si estende lateralmente a NPC, formando una caratteristica lamina cellulare che si espande dorsolateralmente è invece facilmente distinguibile grazie alla forma arrotondata delle sue cellule di grandi dimensioni incastrate nel polo rostrale del OT. Gli altri nuclei del pretetto comprendono, in fine, il nucleo pretettale superficiale intermedio (PSi), ventromedialmente alla terminazione caudale di PSp; il nucleo pretettale superficiale magnocellulare (PSm), un cospicuo nucleo in posizione ventrale rispetto a NC, laterale a NPC e dorsale a PSp, ed in ultimo il nucleo pretettale accessorio (AP), situato dorsocaudalmente alla terminazione posteriore di PSp.

Regione mesencefalica

Il mesencefalo di *Thalassoma pavo* è costituito dorsalmente dall'OT e ventralmente dal tegmento. L'OT rappresenta un importante centro visivo infatti riceve numerosi input dalla retina e altre informazioni di natura sensoriale da altre regioni encefaliche. Dall'OT le informazioni sono principalmente dirette verso il pretetto, il talamo, ai TLo e al tetto controlaterale.

L'OT situato caudalmente agli emisferi telencefalici ricopre rostralmente il diencefalo e caudalmente il tegmento. Ha forma di conchiglia ed è costituito da due lobi bilaterali. E' organizzato in strati concentrici, che dall'esterno verso l'interno formano SM, SO, SFGS, SGC), la cui metà superiore è rappresentata da Ipl, SAC e lo strato periventricolare (SPV). Si riscontrano cinque tipi cellulari diversi ovvero i neuroni piriformi, piramidali, fusiformi, multipolari ed orizzontali. Il 90% circa dei neuroni sono tuttavia di tipo piriforme e

presentano numerosi dendriti secondari. Le cellule piramidali sono invece piuttosto rare e soprattutto nella zona bianca profonda, mentre i neuroni fusiformi si ritrovano nella zona bianca e grigia superficiale e quelli multipolari occupano invece gli strati più superficiali del tetto. Lo SM è ricco di assoni amielinici, detti fibre marginali, che originano dai neuroni di TLo, una struttura cilindrica pari, che si estende longitudinalmente sotto la commissura intertettale. Raggiunto lo strato marginale, le fibre marginali corrono lateralmente e parallele tra di loro. SM presenta anche l'arborizzazione dei lunghi e sottili processi dei neuroni piriformi dello SGC. SO è diviso invece in tre strati: la parte superficiale, ricca di assoni mielinici, la parte intermedia, formata da neuropili che contengono pochi assoni mielinizzati ed abbondanti neuroni amielinici; le terminazioni del nervo ottico, le terminazioni con vescicole sinaptiche arrotondate, le terminazioni che derivano dagli assoni mielinici, con vescicole ovoidali e la parte profonda.

SFGS è caratterizzato da abbondanti assoni mielinici, la maggior parte dei quali sono afferenze retinotettali, ed è inoltre ricco di corpi cellulari. In SFGS sono presenti altri tre tipi di terminazioni sinaptiche, alcune, più numerose, ricche di vescicole arrotondate e regolari, mentre altre, meno numerose, sono ricche di vescicole a forma irregolare (Cerde-Reverter et al., 2001b). L'elemento cellulare più cospicuo in SFGS sono i neuroni piramidali, il cui corpo cellulare è localizzato nella regione profonda di SFGS ed hanno la tipica forma piriforme o piramidale. SFGS contiene anche piccoli neuroni bipolari insieme a due tipi di cellule orizzontali con un soma sferoidale, distinte in chiare e scure. SGC è costituito invece da una porzione superiore che costituisce Ipl, e una più interna lo strato grigio interno. Lo strato Ipl è costituito da pochi assoni mielinizzati e corpi cellulari e da abbondanti dendriti che presentano un orientamento verticale e che provengono principalmente dalle cellule periventricolari piriformi. Nella parte intermedia di SGC i dendriti formano una banda orizzontale, ed in questo strato risiede inoltre il soma di diversi tipi cellulari: i grandi neuroni fusiformi, i piccoli neuroni piriformi, i piccoli neuroni multipolari ed i neuroni orizzontali. SAC presenta abbondanti fasci di assoni mielinici e pochi fasci amielinici, ed ospita il corpo cellulare dei neuroni multipolari e gangliari e un intricato neuropilo, oltre ai prolungamenti dendritici orizzontali e verticali e cellule endimo-gliali. Alcuni degli assoni originano nella retina controlaterale, altri nel telencefalo ipsilaterale. Infine SPV è un ampio strato di cellule molto compatte, dove il corpo cellulare dei neuroni periventricolari possiede un nucleo arrotondato ricoperto da un sottile strato di citoplasma e sono presenti pseudodesmosomi e giunzioni serrate tra dendriti e dendriti e tra dendriti e soma (Cerde-Reverter et al., 2001b).

I TLo sono una coppia di strutture mediane del mesencefalo dorsale che sporgono nel ventricolo in prossimità di VCe. Questa struttura è delimitata dorsalmente dalle fibre della commissura tettale. Tali strutture giacciono dorsalmente alla VCe scomparendo a livello del nervo trocleare. Le cellule dei TLo sono piccole cellule granulari intensamente colorate maggiormente distribuite nella parte centrale rispetto alle zone laterali e ventrali periventricolari.

Il tegmento mesencefalico è localizzato ventromedialmente rispetto all'OT e dorsalmente ai lobi inferiori dell'HTH. Nel tegmento è possibile riconoscere tre zone principali: mediale, centrale e laterale. Il nucleo più rostrale della zona mediale è il nucleo del nervo oculomotore le cui cellule arrotondate, ovoidali o fusiformi, sono di grandi dimensioni e si colorano intensamente con cresil violetto. La zona centrale del tegmento è occupata invece da diverse masse cellulari tra cui il nucleo ventrale tegmentale (VT) e il nucleo dorsale tegmentale (DT).

La porzione laterale del tegmento presenta invece i TS, situati al polo caudale dell'area pretettale diencefalica. Dal punto di vista citoarchitettonico può essere suddiviso in una parte centrale TSc, costituita da cellule molto piccole organizzate in lamine, in una laterale (TSl) di forma e dimensioni una ventrale (TSv) che forma una piastra di piccole cellule.

Cervelletto

Il cervelletto in *Thalassoma pavo* comprende la VCe e il corpo del cervelletto (CCe) oltre che LV. La VCe va ad occupare la maggior parte del ventricolo tettale estendendosi fino al polo caudale del tegmento mesencefalico. In VCe sembra che sia lo strato granulare che quello molecolare sono facilmente distinguibili. Quello granulare è costituito da cellule molto piccole e scure di forma tondeggianti, quello molecolare, invece, è costituito per lo più da piccole cellule debolmente colorate. Le cellule del Purkinje sembrano essere localizzate in uno strato intermedio tra quello granulare e quello molecolare.

Il CCe più caudalmente va ad occupare la posizione della VCe all'interno del ventricolo tettale, sebbene in sezione trasversale sia già visibile in posizione dorsale all'OT. Come nel caso di VCe anche CCe presenta sia uno strato molecolare che granulare.

Il LV è costituito da una coppia di eminenze granulari e un lobo caudale. L'eminenza granulare in sezione trasversale sembra continuarsi con lo strato granulare del CCe. Tuttavia, più caudalmente è possibile ritrovare una coppia di protrusioni sulla superficie laterale dell'encefalo. LV presenta piccole cellule scure e ben stipate tra loro. Il lobo

caudale presenta popolazioni di cellule granulari denominate masse cellulari granulari periventricolari del lobo caudale.

III.2 Mantenimento degli animali e trattamenti

Per il presente lavoro esemplari di *Carassius carassius* (5-12 g; 5-8 cm), forniti da un'azienda agricola locale, ed esemplari di *Thalassoma pavo* (13-20 g; 8-12 cm), prelevati dal Mar Tirreno, sono stati trasferiti in laboratorio e mantenuti in acquari di vetro dalla capacità di 150 L, precedentemente allestiti, per un periodo di acclimatazione della durata minima di una settimana. Durante tale periodo i pesci sono stati alimentati quotidianamente. Nello specifico è stato fornito cibo commerciale, Friskies multigran (Milano), ai teleostei d'acqua dolce, mentre i teleostei marini sono stati alimentati con trito di gamberetti.

Nel corso della fase di acclimatazione sono stati costantemente monitorati i diversi parametri dell'acqua assicurandoci che rimanessero all'interno di appropriati range; nello specifico la temperatura tra i 20 e i 22°C, pH 7 per il mantenimento dei teleostei d'acqua dolce e 7.8 per quelli marini. L'ossigenazione dell'acqua è stata garantita tramite gorgogliatore di ossigeno. Gli acquari muniti di opportuni sistemi di filtraggio, sono stati sottoposti ad un ricambio quotidiano dell'acqua per mantenere una concentrazione costante di nitriti ed ostacolare l'eventuale sviluppo di infezioni.

Al termine del periodo di acclimatazione gli animali sono stati trattati con CuCl_2 , direttamente disciolto in acqua, composto a base di Cu^{2+} conosciuto per le sue proprietà di fungicida. I trattamenti con CuCl_2 , per entrambi i modelli, sono stati condotti in acquari di vetro muniti di solo ossigenatore e privi di sistemi di filtraggio per evitare eventuali riduzioni della concentrazione di metallo. Anche durante i trattamenti sono stati controllati inoltre i valori di pH e temperatura. Ogni trattamento è stato eseguito secondo la metodica "*Static Renewal toxicity test*" (ASTM, 1997) che prevede il ripristino periodico, nel nostro caso ogni 24 h, della concentrazione del contaminante. Il ricambio del volume totale di acqua, in modo analogo ai trattati è stato effettuato anche per i controlli (ctrl) mantenuti, infatti, nelle stesse condizioni degli animali trattati ad eccezione dell'esposizione al contaminante.

Il mantenimento degli animali e tutte le procedure sperimentali sono stati condotti secondo le Linee-Guida per la Cura e l'Uso degli Animali da Laboratorio, secondo il consiglio

Direttivo della Comunità Europea del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC). La sperimentazione è stata condotta cercando di ridurre al minimo la sofferenza degli animali e il numero dei esemplari utilizzati.

III.2.1 Determinazione della LC₅₀ e scelta delle concentrazioni

Prima di valutare gli effetti del metallo su *Thalassoma pavo* e *Carassius carassius* è stato condotto uno studio preliminare volto alla determinazione della LC₅₀ (*median lethal concentration*) per il CuCl₂, ovvero la concentrazione che causa la morte del 50% degli animali esposti. A tal fine i pesci sono stati esposti a concentrazioni crescenti di metallo per un periodo di 48h al termine del quale è stata registrata la percentuale di letalità degli animali esposti. Per la determinazione della LC₅₀ gli animali sono stati mantenuti a digiuno nelle 48h precedenti ai trattamenti e ogni qualvolta durante l'esposizione si assisteva ad un decesso di un pesce quest'ultimo veniva immediatamente rimosso dall'acquario. L'utilizzo del software *Probit Analysis Program (Version 1.5) dell'EPA (Environmental Protection Agency)* ha consentito in seguito di ottenere la stima della 48h-LC₅₀ per ciascuna specie sottoposta allo *screening* di concentrazioni di CuCl₂. Il valore di LC₅₀ è risultato di 2.717 mg/L nel caso di *Carassius carassius* (Tab. III.1A) e pari a 2.66 mg/L nel caso di *Thalassoma pavo* (Tab. III.1B).

Point		Exposure	95% Confidence Limits	
		Concentration (mg/L)	Lower	Upper
LC	1.00	2.095	1.748	2.278
LC	5.00	2.261	1.976	2.414
LC	10.00	2.355	2.107	2.494
LC	15.00	2.420	2.199	2.549
LC	50.00	2.717	2.585	2.854
LC	85.00	3.050	2.896	3.352
LC	90.00	3.134	2.962	3.497
LC	95.00	3.264	3.059	3.728
LC	99.00	3.522	3.241	4.214

A)

Point		Exposure	95% Confidence Limits	
		Concentration (mg/L)	Lower	Upper
LC	1.00	2.094	1.607	2.285
LC	5.00	2.246	1.860	2.401
LC	10.00	2.331	2.007	2.469
LC	15.00	2.391	2.111	2.520
LC	50.00	2.660	2.525	2.837
LC	85.00	2.958	2.789	3.459
LC	90.00	3.034	2.842	3.642
LC	95.00	3.149	2.920	3.936
LC	99.00	3.378	3.065	4.560

B)

Tab. III.1 Valori stimati di *Lethal Concentrations* (LC) di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) per il CuCl_2 , con relativi limiti di confidenza ottenuti tramite analisi di Probit (Finney, 1989) effettuata tramite il software Probit Analysis Program (Version 1.5; EPA).

L'individuazione di tale valore ha rappresentato il primo passo indispensabile per la successiva scelta delle concentrazioni con le quali verificare gli effetti del contaminante diversi dalla morte. A tal proposito sono state scelte due differenti concentrazioni sub-letali di CuCl_2 per ogni specie in esame, una più alta, assicurandoci attraverso i risultati dell'analisi di *Probit* che fosse al di fuori del *range* di letalità ed una più bassa nel range di 1/10 del valore di LC_{50} . Nel caso di *Carassius carassius* sono state selezionate le concentrazioni di 1.45 mg/L e 0.30 mg/L di CuCl_2 , mentre nel caso di *Thalassoma pavo* sono state testate le concentrazioni di 1.07 mg/L e 0.25 mg/L. In una prima fase gli animali sono stati esposti alle suddette concentrazioni per un periodo di 48h per la valutazione degli effetti a breve termine del contaminante. In una seconda fase è stato verificato

l'effetto di un'esposizione cronica al CuCl_2 sottoponendo ciascun teleosteo a trattamento di 21 giorni (d) con la concentrazione più bassa testata nei trattamenti di 48h.

III.2.2 Trattamenti con ORX-A

Per verificare il ruolo del sistema ORXergico in risposta allo stress indotto dall'esposizione al Cu^{2+} , alcuni esemplari di *Carassius carassius* e *Thalassoma pavo* sono stati sottoposti ad iniezioni i.p. di ORX-A in concomitanza all'esposizione con CuCl_2 .

La dose di ORX-A da iniettare ad entrambi i pesci è stata stabilita sulla base di *screening* preliminari. Infatti, sia gli esemplari esposti per 48h alle alte che alle basse concentrazioni di CuCl_2 sono stati trattati quotidianamente con ORX-A alle dosi di 10, 50, 100 ng/g di peso corporeo (body weight; BW). Il *range* di concentrazione entro il quale selezionare la più efficace dose di ORX-A è stato scelto tenendo conto delle concentrazioni utilizzate in studi precedenti su *Thalassoma pavo* (Facciolo et al., 2009) e su goldfish (Facciolo et al, 2011). Dallo *screening* è stata selezionata la dose di 10 ng/g BW sulla base dell'effetto ottimale sul *feeding* sortito durante il co-trattamento con il Cu^{2+} rispetto alle altre due dosi di neuropeptide (dati non riportati).

Per quanto riguarda la scelta della concentrazione di CuCl_2 a cui valutare gli effetti della ORX-A in *Thalassoma pavo*, si è scelto la concentrazione più bassa del metallo poiché quella maggiore causava, non solo in concomitanza all'ORX-A ma anche con NaCl 0.9%, un'iperventilazione eccessiva ed immobilità dell'animale. Nel caso di *Carassius carassius* è stato possibile invece valutare gli effetti dell'ORX-A sia durante esposizione alla concentrazione più bassa che a quella più alta di CuCl_2 , probabilmente perché in questa specie, molto resistente a stati ipossici e addirittura anossici, l'iniezione non costituiva di per sé una fonte aggiuntiva di stress.

L'ORX-A (10 ng/g BW) è stata somministrata inoltre anche in esemplari di *Thalassoma pavo* e *Carassius carassius* al 21d di trattamento con CuCl_2 per verificare l'influenza dell'ORX-A sullo stress cronico prodotto dall'esposizione prolungata al contaminante.

III.2.3 Test di recupero

Per verificare le capacità di recupero dei teleostei in esame e l'eventuale reversibilità degli effetti tossici mediati dal CuCl_2 , sia a livello comportamentale che neuronale, alcuni animali dopo le 48h di esposizione ad entrambe le concentrazioni di metallo sono stati trasferiti in acquari identici agli originari contenenti acqua priva di contaminante per un periodo di tempo di 48h corrispondente a quello di esposizione (Fig. III.7). In tale periodo,

seguendo la stessa metodica secondo cui venivano condotti i trattamenti, il ricambio dell'acqua è stato effettuato giornalmente. Questa fase sperimentale, definibile di recupero, è utile sia alla comprensione dell'entità delle alterazioni indotte dalle diverse concentrazioni di contaminante sia per verificare i meccanismi riparativi attivati a livello neuronale per garantire il ripristino delle normali funzioni fisiologiche.

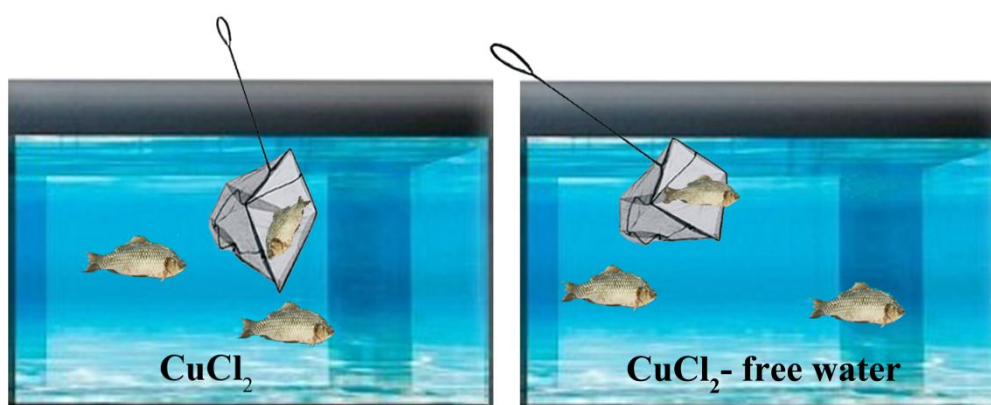


Fig. III.7 Rappresentazione del test di recupero. Dopo 48h di permanenza in acqua contenente CuCl₂ sia alla concentrazione più alta che più bassa alcuni pesci sono stati trasferiti in acqua priva di contaminante per 48h aggiuntive per la valutazione del recupero.

III.3 Analisi Comportamentale

Sia durante la fase di trattamento che durante quella di recupero gli animali che sono stati monitorati per verificare gli effetti del CuCl₂ sul comportamento. In particolare, sono state condotte due osservazioni giornaliere della durata di un'ora ciascuna distribuite lungo l'arco della giornata mediante l'utilizzo di una telecamera (SONY DSC-W310). Le immagini sono state successivamente digitalizzate ed elaborate con l'ausilio di uno specifico software di analisi comportamentale, *Etholog 2.2.5* che già in precedenti studi tossicologici (Giusi et al., 2008; Zizza et al., 2012) si era rivelato un valido supporto per l'indagine degli effetti di inquinanti sul comportamento animale. Tale software ha permesso di calcolare il tempo trascorso dagli animali in ciascuna delle seguenti categorie comportamentali:

- **Feeding activities**, l'animale nuota verso la superficie in cerca di cibo o sul fondo dell'acquario manifestando un atteggiamento tipico della ricerca (*incomplete feeding act*) e/o della cattura e ingestione del cibo (*complete feeding act*).
- **Swimming activities**, l'animale si presenta attivo, nuotando e mostrando un atteggiamento esplorativo dello spazio a sua disposizione nell'acquario.
- **Resting state**, uno stato simil-sonno nei pesci (Facciolo et al., 2010) nel quale l'animale è quasi completamente immobile, salvo qualche momentaneo spostamento corporeo e tende ad adagiarsi sul fondo o sulle pareti laterali dell'acquario.
- **Swimming towards surface**, l'animale nuota verso la superficie dell'acqua o addirittura ivi rimane per lunghi periodi di tempo, boccheggiando.
- **Abnormal motor behaviors**, ovvero atteggiamenti motori insoliti caratterizzati da nuoto scoordinato e perdita di equilibrio, scatti molto repentini ed improvvisi, come rapidi cambi di direzione nonché manovre motorie ripetitive. Sono stati inoltre inseriti in questa categoria anche gli urti violenti dell'animale contro le pareti dell'acquario e/o contro gli altri pesci quasi a testimoniare aggressività.

I risultati delle analisi comportamentali così condotte sugli animali sottoposti a ciascun trattamento sono stati confrontati con quelli derivanti dall'analisi comportamentale degli animali ctrl anch'essi monitorati giornalmente.

III.4 Analisi citoarchitettonica: colorazione di Nissl

L'analisi istologica citoarchitettonica degli encefali di *Thalassoma pavo* e *Carassius carassius*, ha consentito di verificare la distribuzione dei principali nuclei encefalici dei suddetti modelli (riportata nella sezione Modelli sperimentali). A tal fine gli encefali, precedentemente congelati a -20 °C, sono stati tagliati al criostato, in sezioni da 14 µm di spessore e poi sottoposte a colorazione di Nissl il cui protocollo si articola nelle seguenti fasi sperimentali:

- **Fase di idratazione**, 15 min in Etanolo 100%
 - 2 min in Etanolo 95%
 - 2 min in Etanolo 80%
 - 2 min in Etanolo 70%
 - 2 min in Etanolo 60%
 - 2 min in Etanolo 30%
- **Colorazione**, 25 min in cresil violetto 0.4%
- **Lavaggio post-colorazione**, in H₂O sterile (2 passaggi)
- **Disidratazione**, 30 sec in Etanolo 95%
- **Differenziazione**, 1.5 min in Etanolo 95% con acido acetico glaciale
- **Disidratazione**, 30 sec in Etanolo 95%
 - 30 sec in Etanolo 100% (4 volte)
- **Chiarificazione**, 30 sec in xilene (4 volte)
- **Montaggio**

Al termine della colorazione le sezioni encefaliche di *Carassius carassius* e *Thalassoma pavo* sono state analizzate con il microscopio ottico Dialux EB 20 LEICA, per valutare l'organizzazione di alcuni tra i più importanti nuclei dell'encefalo di questi teleostei.

III.5 Analisi neurodegenerativa

L'analisi neurodegenerativa tramite ACS è stata condotta con l'intento di valutare la tossicità dei diversi trattamenti con CuCl₂ a livello del sistema nervoso dei due teleostei in esame e stabilire eventualmente una correlazione con gli effetti comportamentali e molecolari indotti dal metallo. L'ACS è una tecnica istologica che consente di valutare la morte neuronale senza distinzione tra processi necrotici ed apoptotici. Questo tipo di colorazione si basa sulla capacità dei sali d'argento di reagire e marcare in maniera specifica i neuroni degenerati. I sali d'argento si depositano, infatti, sui neuroni andati incontro a morte neuronale, e riducendosi ad argento metallico sviluppano una colorazione scura a livello dell'area degenerata.

Il protocollo sperimentale dell'ACS è basato sulla metodica messa a punto sull'encefalo dei Mammiferi da de Olmos et al. (1994) e adattato all'encefalo dei pesci con le opportune

modifiche. Al termine di ciascun trattamento gli encefali di *Carassius carassius* e *Thalassoma pavo*, sono stati prelevati e immediatamente congelati a -20°C per poi essere sezionati al criostato al fine di ottenere sezioni dello spessore di $30\ \mu\text{m}$. I vetrini sono stati poi mantenuti a 4°C per un periodo da 1 a 3 mesi prima di essere sottoposti agli step previsti dal protocollo di seguito riportato:

- **Pre-impregnazione**, le sezioni sono state trattate con la soluzione P (nitrato d'argento, acqua distillata, dl-alanina, nitrato di rame 0.5%, nitrato di cadmio 0.5%, nitrato di lantanio 0.5%, rosso neutro 0.5%, piridina, trietanolamina, isopropanolo) e poste ad incubare a 50°C per 50 min e successivamente raffreddate a temperatura ambiente per 2-3 h.
- **Impregnazione**, le sezioni sono state risciacquate in acetone per 30 sec ed immerse nella soluzione I (nitrato d'argento, acqua distillata, etanolo 100%, acetone, idrossido di litio 0.4%, idrossido d'ammonio) per 45 min.
- **Riduzione**, le sezioni sono state trasferite in 200 ml di soluzione R (formalina 10%, acido citrico monoidrato 1%, etanolo 100%, acqua distillata) e incubate a 32°C per 25 min; agitate per i primi 2 min e trascorsi 5 min sono stati aggiunti ad intervalli di 5 min per 4 volte 0.3 ml per volta di soluzione I. Le sezioni sono state poi trasferite in acqua distillata per 1.5 min e poi in acido acetico 0.5% per 1.5 min, sciacquate in acqua per 1 h con 2 passaggi di cui il primo di 15 min e conservate in acqua distillata *overnight*.
- **Chiarificazione**, le sezioni sono state ricoperte con la soluzione C1 (ferrocianuro di potassio 6%, clorato di potassio 4%, acido lattico) per 90 sec a temperatura ambiente, sciacquate in acqua distillata; successivamente ricoperte per altri 90 sec in soluzione C2 (permanganato di potassio 0.06%, acido solforico 6%) e trasferite in acqua distillata (2 sciacqui) per 3 min a temperatura ambiente.
- **Stabilizzazione**, le sezioni sono state trasferite in soluzione acquosa di tiosolfato di sodio 2%, agitate per 2 min e risciacquate in acqua distillata per 3 min; successivamente sono state immerse in *Rapid Fixer* (Kodak) per 4 min e sciacquate in acqua distillata e poi in rosso neutro 0.5% (*Thermo Electron Corporation, Milan, Italy*) per 20 min; sciacquate 2 volte in acqua distillata, passate per 20 sec in alcool

50%, 70%, 95%, 100%, ed in fine differenziate in alcool-xylene (1:1) e 2 volte in xylene puro.

III.6 Studi d'espressione genica: ibridazione *in situ*

L'ISH è una tecnica biomolecolare basata sul legame di una specifica sonda di acido nucleico a sequenza nota (*probe*) con un mRNA *target* presente nel tessuto encefalico dell'animale in esame, e codificante per la proteina d'interesse. Il legame *probe*-mRNA prevede la formazione di nuovi legami idrogeno tra basi le complementari.

In questo lavoro sperimentale è stata valutata la risposta trascrizionale dell'HSP90 a livello di diverse aree encefaliche degli animali sottoposti ai diversi trattamenti con CuCl₂ rispetto agli animali ctrl. Primo passo è stato quello di disegnare un *probe* specifico per ciascuna specie in esame, che assicurasse il legame esclusivo e stabile all'mRNA d'interesse. A tal fine si è reso necessario individuare nella sequenza dell'HSP90 una regione oligonucleotidica con un contenuto di GC non inferiore al 45-60%. I *partial cds* dell'HSP90 di questi teleostei, già disponibili in banca dati e di seguito riportati:

> *partial cds HSP90 Carassius carassius (JN006056.1)*

```
AAAGAGATCTTCCTCAGGGAGCTCATCTCCAACGCCTCCGATGCTCTTGACAAAATCCGATATGAA
AGCTTGACGGATCCCACCAAACCTGGACAGCGGCAAGGACCTGAAGATCGACATCATCCCCAACGTT
CACGAA CGCACGCTGACCCTCATCGACACCGGAATTGGGATG ACCAAAGCCGATCTCATCAACAAC
TTGGGAACCATCGCCAAATCTGGGACGAAGGCCTTCATGGAGGCTCTGCAGGCTGGTGCAGATATC
TCCATGATCGGTTCAGTTTGGTGTGGGCTTCTACTCCGCCTACCTGGTGGCTGAAAAGGTCACGGTC
ATCACCAAACACAACGATGACGAGCAGTACGCCTGGGAGTTCGTCCGCTGGCGGCTCTTTCACAGTC
AAAGTGGATCATGGTGAGCCATCGGCCGTGGAACCAGAGTCATTCTTCACCTGAAAAGAAGACCAG
ATGGAGTACATCGAGGAGAAGAGAGTGAAGGAAGTGGTCAAGAAACACTCCCAGTTCATCGGATAC
CCGATCACTCTCTTCGTGGAGAAGGAACGTGACAAGGAGATCAGCGACGACGAGGCCGAGGAGGAG
GAGAAGCCCAGAAAAGAGGAAGAGGAGAAGGAGGAAGGCGAAGACAAACCCAAGATCGAGGACGTC
GGCTCGGACGACGACGAGGACTCCAAAGACAAGGACAAGAAGAAAAGAAGAAGATCAAGGAGAAG
TACATCGACCAGGAGGAGCTGAACA
```

> *partial cds HSP90 Thalassoma pavo (EF392848.1)*

```
CTGCAGGCTGGAGCTGATATTTCTATGATCGGTTCAGTTTGGTGTGGGTTTCTACTCTGCCTACCTG
GTGGCTGAGAAAAGTGGCGGTCATTACCAAACACAATGATGACGAGCAGTACGCCTGGGAATCCTCT
GCTGGAGGCTCCTTCACAGTCAAAGTAGACAGTGTGAACCTATGGGGCGCGGAACAAAGGTGATC
TTGCATATGAAAGAGGACCAGATCGAATACATCGAGGAGAAAAGAGTGAAGAAATTTGTGAA AAAG
CACTCTCAGTTCATCGGATACCCATCACCTCTTTGTG GAGAAAGAGCGTGATAAGGAGGTGAGT
GACGACGAGGCGGAGGAGGAAGAGGCTGAGAAGGAGGAGACGAGGATGAGGAGGACGACGAAAAG
ATTGCCGATATTGAGGATGTGGGGGAGGACGACTCCAACGACAACGACCACAACCACAACCACAAC
ATCGGGGACAAGTACATCAACAAGAAAAGATGAACAAGACCTACCTCATCTGGAACAAGAACCCA
GATGACATCACAAATCGAGGACTACGGCGAATTCTACATCACCTGACCAACGACTGGGAGGATCAC
CTGGCTGTGAAGCACTTCTCTGTTGAGGGTCAGCTGGAGTTCGGTGTCTGCTCTTCATCCCTCGC
CGTGCACCTTTGACCTCTTTGAGAACAAGAAAAGAAGAATAAC
```

Una volta individuato tale tratto la sequenza è stata allineata con la funzione **BLASTN** disponibile sul sito <http://workbench.sdsc.edu> per verificare che non fosse in grado di riconoscere altri geni assicurando così il legame univoco e altamente specifico alla sequenza bersaglio. Inoltre, grazie all'applicazione **NetPrimer** disponibile sul sito <http://www.premierbiosoft.com> ci siamo accertati che la sequenza selezionata non fosse capace di formare strutture a forcina che potrebbero essere originate da un'eventuale presenza di regioni nucleotidiche di autocomplementarietà.

Le sequenze di 36 nucleotidi per *Carassius carassius* e di 43 nucleotidi per *Thalassoma pavo* (evidenziate nei rispettivi *partial cds*) hanno soddisfatto tutti i requisiti richiesti.

Le sequenze oligonucleotidiche sono state acquistate presso BMR genomics (Padova) e sottoposte a reazioni di marcatura con digossigenina (DIG), un aptene derivante da un alcaloide vegetale legato mediante un braccio spaziatore di 11 atomi di carbonio alla posizione C-5 del nucleotide uridina. La marcatura prevede, grazie all'enzima terminal deossinucleotidil transferasi (TdT), il trasferimento della DIG all'estremità 3'-OH libera del filamento oligonucleotidico. Per mezzo di un anticorpo anti-DIG coniugato alla fosfatasi alcalina, precedentemente diluito (1:100), è possibile rilevare l'avvenuto legame tra il *probe* e la sequenza bersaglio. La fosfatasi alcalina coniugata all'anticorpo anti-DIG, in presenza di uno specifico substrato colorimetrico, reso disponibile in seguito all'aggiunta dei cromofori 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, 4-toluidina (BCIP) e Nitroblu tetrazolo cloruro (NBT), porta alla formazione di un precipitato colorato che si deposita nel sito di localizzazione dell'enzima.

Il protocollo sperimentale dell'ISH prevede i seguenti passaggi svolti in condizioni RNAsi-free garantite dalla sterilità di tutti i materiali da laboratorio e delle soluzioni impiegate:

- **Preparazione del tessuto**, l'encefalo prelevato è stato conservato a -20°C; in seguito è stato sezionato al criostato (Micron-H505 E, Zeiss, Germany) e le sezioni trasversali dello spessore di 14 µm sono state raccolte su vetrini polilisinati in modo da garantire una migliore adesione delle sezioni sul vetrino. Successivamente, i vetrini sono stati conservati a -20°C.

- **Reazione di marcatura della sonda e Dot Blot**, per tale reazione ad 1 µl di oligonucleotide 100 pmol, sono stati aggiunti 4 µl di buffer TdT (potassio cacodilato 1 M, Tris-HCl 125 mM pH 6.6), 4 µl di CoCl₂, 2 µl di DIG, 1µl di TdT

ed acqua distillata, per un volume finale di 20 μ l. L'oligonucleotide è stato così incubato a 37°C per 30 min al termine dei quali la reazione è stata bloccata grazie all'aggiunta di 2 μ l di EDTA 0.2 M a pH 8.0. Per accertarci dell'avvenuta reazione di marcatura della sonda è stato effettuato un Dot Blot mediante l'utilizzo di una membrana Hybond N+ (Amersham International). Tale membrana è stata imbibita in una capsula Petri con il buffer 1 (Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.15 M) per 15 min agitando gentilmente e poi incubata con l'anticorpo anti-DIG per 30 min a 37°C e sottoposta a 2 lavaggi nel buffer 1 per 5 min. In seguito la membrana è stata trasferita in buffer 3 (Tris-HCl 0.1 M pH 9.5; NaCl 0.1 M; MgCl₂ 0.05 M) per 2 min in una nuova capsula Petri nella quale sono stati posti i reagenti utili per la rilevazione colorimetrica (BCIP e NBT). La piastra è stata poi lasciata al buio per 2 h per il pieno sviluppo della colorazione (rosa-violetto).

- **Pre-ibridazione**, i vetrini sono stati portati a temperatura ambiente e lavati in SSC2X per 30 min e fissati in paraformaldeide 4% per 10 min al fine di preservare l'integrità del tessuto; gli stessi sono stati di seguito sottoposti a tre lavaggi in PBS 1X (contenente NaCl 1.3 M, NaH₂PO₄ 70 mM, NaH₂PO₄ H₂O 30 mM), quindi immersi in una soluzione di acetilazione con trietanolamina 0.1 M (pH 8) ed anidride acetica 0.25% per 10 min e disidratati con passaggi di 30 sec in concentrazioni crescenti di etanolo (30,60,70,80,95 e 100%). Dopo la disidratazione le sezioni sono state ricoperte con 300 μ l di buffer di preibridazione (formammide deionizzata, SSC5X, destrano solfato e DTT 50 mM in un rapporto 1:50) per 2 h a 50°C.
- **Ibridazione**, le sezioni sono state incubate con il buffer di ibridazione (100 μ l) in camera umida *overnight* a 50°C, diluendo il *probe* nel buffer di pre-ibridazione (2.5 μ l di oligo/50 μ l di buffer).
- **Post-ibridazione**, trascorso il periodo di incubazione *overnight* è stato effettuato un primo lavaggio in SSC2X per 1 h a 50°C in continua agitazione e poi 2 passaggi in NTE1X (contenente Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 5 mM pH 8.0, NaCl 2.5 M) per 5 min a 37°C, seguiti dalla fase di bloccaggio ovvero l'immersione dei vetrini per 50 min in una soluzione di Blocking Reagent 0.5% sciolto in Tris-HCl 100 mM pH 7.5 e NaCl 50 mM, per prevenire un elevato effetto di *background*.

- **Rilevazione immunologica**, dopo 2 lavaggi in buffer 1 per 2 min a temperatura ambiente, i vetrini sono stati ricoperti con 200 μ l di buffer 1 in cui sono stati diluiti BSA 1% + 0.3% Triton X100. Successivamente i vetrini sono stati incubati per 2 h con l'anticorpo anti-DIG coniugato alla fosfatasi alcalina (1:100) diluiti nello stesso buffer e quindi sottoposti a 3 lavaggi di 15 min in buffer 1 ed un lavaggio di 2 min in buffer 3 (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM). Le sezioni vengono a questo punto incubate per un massimo di 72 h al buio con una soluzione contenente un substrato specifico per la fosfatasi alcalina, vale a dire il colorante BCIP/NBT (1:1.3) diluito in buffer 3. Al termine di tale periodo di incubazione, la reazione è stata bloccata immergendo i vetrini in una soluzione di buffer 4 (Tris-HCl 100 mM pH 8.5; EDTA 1 mM) per 15 min per poi procedere a disidratazione in etanolo. A questo punto, è stato possibile osservare la reazione immunologica al microscopio Dialux EB 20 (Leitz) con obiettivo a contrasto di fase 16X.

Per valutare l'esistenza di variazioni significative nell'espressione genica dei trattati rispetto ai ctrl, è stata condotta un'analisi quantitativa dei valori di densità ottica (optical density, O.D.) mediante l'uso di un analizzatore d'immagine noto come Scion-Image 2.0.

III.7 Analisi statistica

Per l'analisi comportamentale sono stati usati gruppi sperimentali di 6 esemplari rispettivamente di *Thalassoma pavo* e *Carassius carassius* per trattamento (n=6) ed ogni esperimento è stato effettuato in duplicato. Per le analisi molecolari sono stati utilizzati gli encefali di almeno 3 animali e le letture di O.D. eseguite in doppio all'analizzatore d'immagine e ripetute almeno 5 volte su ogni nucleo o area encefalica presa in esame. I dati derivanti dalle diverse analisi sono stati elaborati e sottoposti a specifici test statistici quali l'analisi della varianza (ANOVA) e *post-hoc* test (Newman-Keul's test) al fine di verificare la significatività delle differenze osservate nelle diverse categorie sperimentali.

Capitolo IV

RISULTATI

IV.1 Effetti del CuCl_2 a breve termine

IV.1.1 Effetti sul comportamento

In una prima fase è stato necessario determinare un etogramma rappresentativo delle principali attività giornaliere dei due teleostei non esposti ad alcun trattamento e quindi definiti ctrl. I dati risultanti dall'osservazione degli esemplari di *Carassius carassius* mostrano che, in condizioni standard di laboratorio, essi trascorrono la maggior parte del tempo nello *swimming* (68%), mostrando cioè un nuoto esplorativo dell'ambiente a disposizione nell'acquario (Fig. IV.1A). Il tempo restante viene trascorso principalmente nell'attività di *feeding* (28%) durante la quale eseguono tipiche manovre di ricerca del cibo, dirette sia verso la superficie che verso il fondo dell'acquario fino al termine dell'ingestione del cibo loro fornito. Queste attività risultano interrotte da brevi stati di *resting* (3%) in cui l'animale rimane pressoché immobile, eccetto qualche piccolo movimento, mostrando un atteggiamento sonno-simile tipico dei pesci. Irrilevante sembra, invece, il tempo trascorso in movimenti verso la superficie e in altre attività.

Nel caso di *Thalassoma pavo* è stato riscontrato un pattern comportamentale differente in quanto questa specie trascorre una gran quantità di tempo nello *swimming* (70%) seguito dal *resting* (25%) mentre solo una piccola parte è riservata all'attività di *feeding* (circa il 4%; Fig. IV.1B).

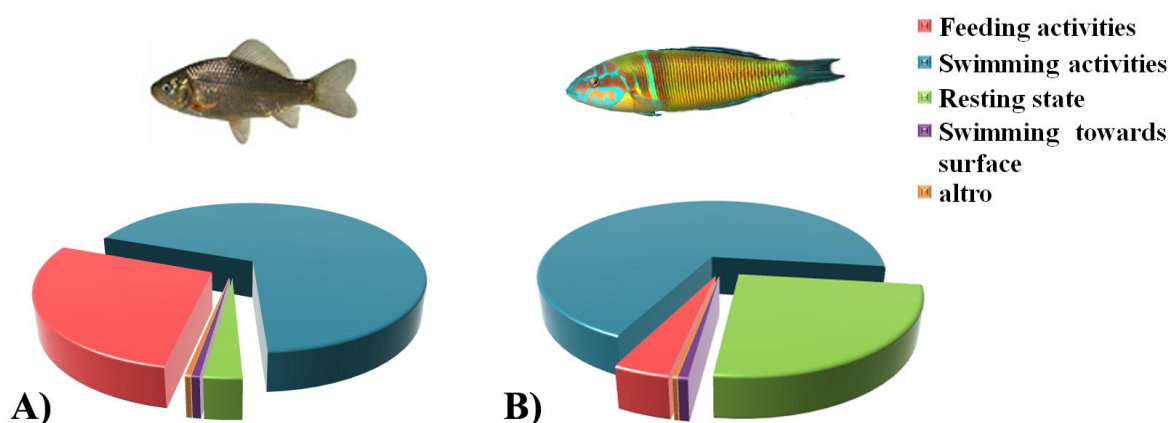
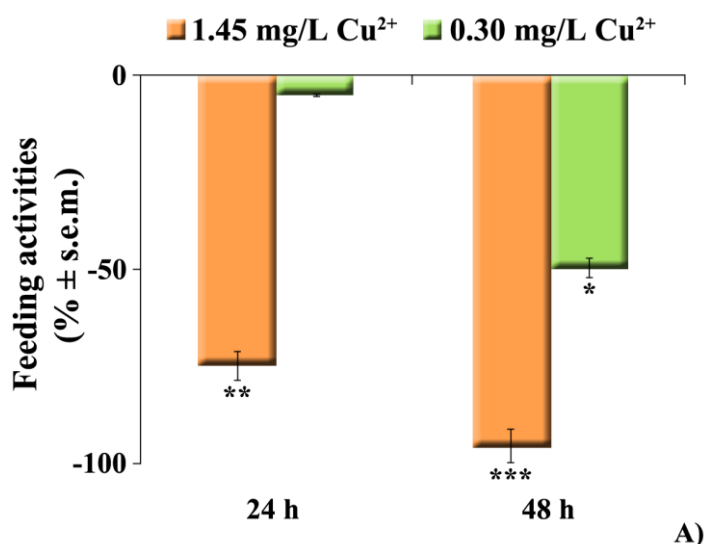


Fig. IV.1 Etogramma rappresentativo delle principali attività comportamentali di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) monitorate in esemplari ctrl. Le misure, in doppio, sono state ripetute almeno 3 volte al giorno per tre giorni consecutivi. I dati sono riportati come valori medi del tempo relativo (%) trascorso dall'animale in una specifica attività comportamentale rispetto al totale del tempo monitorato (60 min).

Successivamente, con l'obiettivo di investigare gli effetti a breve termine del contaminante, esemplari di *Carassius carassius* e *Thalassoma pavo* sono stati sottoposti a trattamenti della durata di 48h con due diverse concentrazioni di CuCl_2 , una più alta e una più bassa, ovvero 1.45 mg/L e 0.30 mg/L nel caso del teleosteo d'acqua dolce e 1.07 mg/L e 0.25 mg/L nel caso del teleosteo marino. Le concentrazioni impiegate sono state selezionate sulla base di *screening* preliminari, secondo quanto riportato nella sezione Materiali e Metodi.

L'analisi comportamentale ha evidenziato che in *Carassius carassius* l'alta concentrazione testata (1.45 mg/L) faceva registrare un'elevata ($p < 0.01$) riduzione del *feeding* a 24h che diveniva addirittura molto significativa ($p < 0.001$) a 48h di trattamento (Fig. IV.2A). Al contrario, nel caso dell'esposizione alla concentrazione più bassa di metallo, è stato osservato che nelle prime 24h tale concentrazione non era in grado di indurre alcuna variazione significativa del *feeding*. A 48h di trattamento, invece, questa attività subiva una moderata ($p < 0.05$) riduzione rispetto ai ctrl.

In *Thalassoma pavo* l'esposizione alla più alta concentrazione di metallo determinava un'elevata riduzione del *feeding* rispetto ai ctrl fin dalle prime 24h, riduzione che rimaneva tale fino al termine del trattamento (Fig. IV.2B). I pesci trattati con la concentrazione di 0.25 mg/L riportavano, invece, solo una moderata diminuzione del *feeding* sia a 24h che a 48h di esposizione.



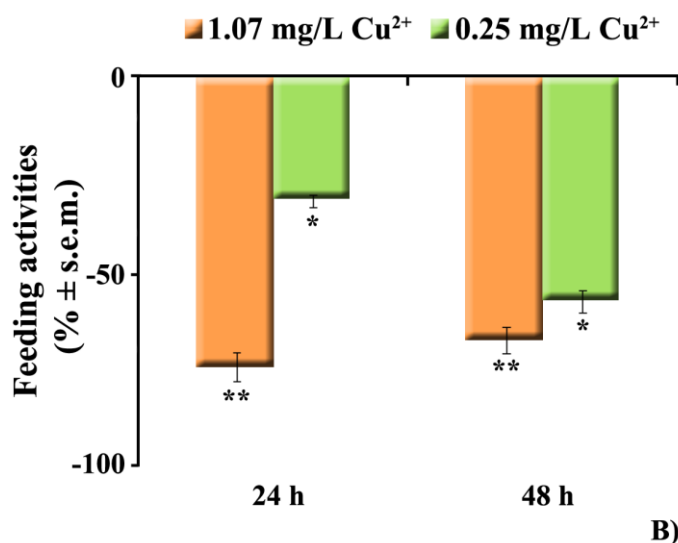


Fig. IV.2 Effetti del trattamento con CuCl₂ sul *feeding*. I dati sono riportati come variazione percentuale (%) del *feeding* in esemplari di *Carassius carassius* (A) esposti alle concentrazioni 1.45 mg/L e 0.30 mg/L di CuCl₂ e di *Thalassoma pavo* (B) esposti alle concentrazioni 1.07 mg/L e 0.25 mg/L di CuCl₂ rispetto ai ctrl (*) a 24h e a 48h di esposizione. L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali con una telecamera e le immagini acquisite sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Per quanto concerne l'attività di *swimming* in *Carassius carassius*, solo la più alta concentrazione dopo 48h risultava responsabile di una moderata riduzione, rispetto ai ctrl, del tempo trascorso dagli animali nello *swimming* ma solo a 48 h di esposizione (Fig. IV.3A). La concentrazione di 0.30 mg/L di Cu²⁺ non determinava variazioni significative della normale *swimming performance* né a 24h né a 48h di trattamento.

Nel caso dei teleostei marini, invece, sia la alta che la bassa concentrazione di contaminante dopo 24h di esposizione causavano una moderata riduzione di tale comportamento rispetto ai ctrl, mentre solo la concentrazione più alta di 1.07 mg/L riduceva ulteriormente il *feeding* a 48h (Fig. IV.3B).

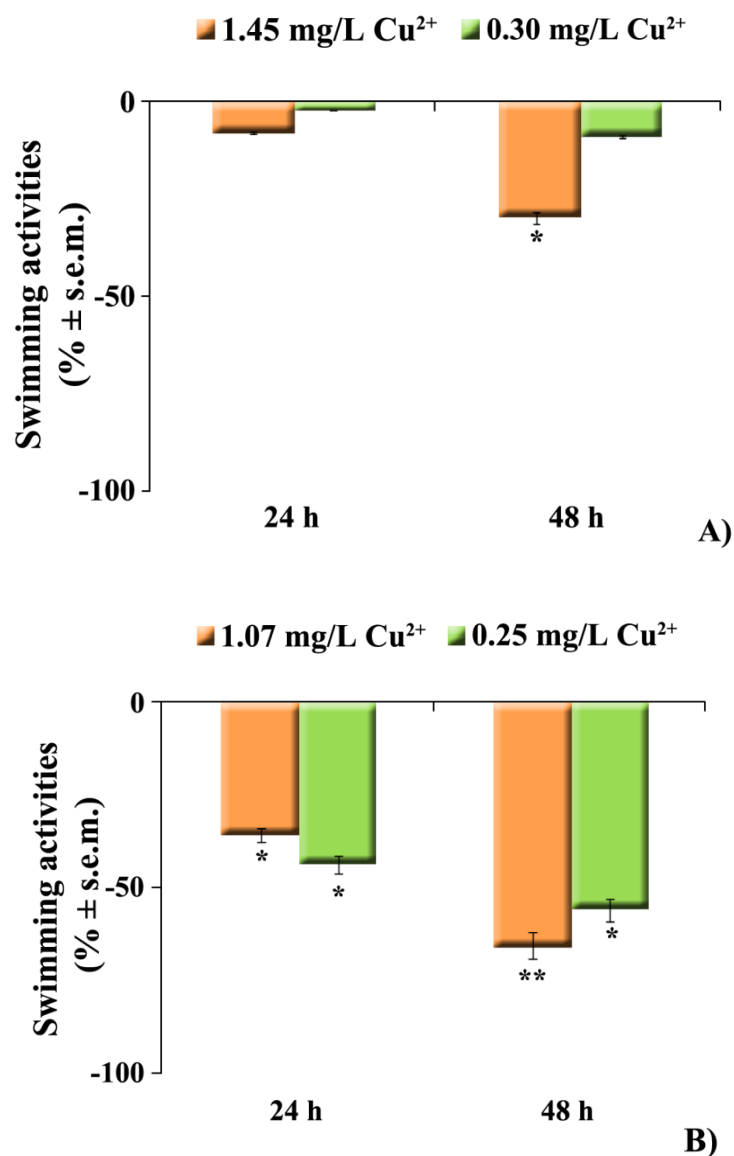


Fig. IV.3 Effetti del trattamento con CuCl_2 sullo *swimming*. I dati sono riportati come variazione percentuale (%) dello *swimming* in esemplari di *Carassius carassius* (A) esposti alle concentrazioni 1.45 mg/L e 0.30 mg/L di CuCl_2 e di *Thalassoma pavo* (B) esposti alle concentrazioni 1.07 mg/L e 0.25 mg/L di CuCl_2 rispetto ai ctrl (*) a 24h e a 48h di esposizione. L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali con una telecamera e le immagini acquisite sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In *Carassius carassius*, il *resting state*, condizione in cui i pesci mostrano una quasi completa immobilità, subiva un incremento molto elevato rispetto ai ctrl durante le prime 24h di trattamento con la alta concentrazione testata, incremento che stranamente risultava meno elevato alle 48h (Fig. IV.4A). La concentrazione di 0.30 mg/L di Cu^{2+} ha fatto registrare, al contrario, un moderato innalzamento di tale attività ma solo alle 24h. Tale

andamento, sia nel caso dell'alta che della bassa concentrazione, trova una spiegazione nel fatto che a 48h è stato registrato un incremento dello *swimming towards surface* rispetto ai ctrl molto elevato nel caso dei pesci trattati con 1.45 mg/L ed elevato in quelli trattati con 0.30 mg/L di CuCl₂ (Fig. IV.4B). In questo stesso teleosteo, ma esclusivamente nel caso dell'esposizione all'alta concentrazione di metallo, sono stati riscontrati atteggiamenti motori insoliti, raggruppati nella categoria *abnormal motor behaviors*, nei quali l'animale mostrava perdita di equilibrio durante il nuoto, movimenti improvvisi e rapidi che disturbavano la normale *swimming performance* (Fig. IV.4C). Tali atteggiamenti si sono però manifestati solo in modo moderato a 48h di trattamento.

In *Thalassoma pavo* il *resting state* ha subito un notevole incremento solo negli esemplari esposti alla più bassa concentrazione di Cu²⁺ (Fig. IV.4A'). La alta concentrazione, contrariamente a quanto ci si attendeva, considerata la riduzione dello *swimming* da essa causata, non ha promosso significative alterazioni dello stato di *rest* rispetto ai ctrl. La spiegazione della mancanza di un effetto significativo sul *rest*, nonostante la riduzione del tempo trascorso dai teleostei nello *swimming*, va rintracciata negli *abnormal motor behaviors*, durante i quali l'animale faceva scatti improvvisi e repentini che interrompevano di frequente lo stato di *rest* (Fig. IV.4C'). Tali atteggiamenti anomali insorgevano solo in maniera moderata e solo a 48h di esposizione nei pesci esposti alla più bassa concentrazione di metallo. Contemporaneamente all'insorgenza di *abnormal motor behaviors*, gli esemplari di *Thalassoma pavo* esposti alla concentrazione più alta di CuCl₂ mostravano movimenti frequenti verso la superficie dell'acqua o addirittura lunghi periodi di permanenza in superficie dove erano sorpresi a boccheggiare (Fig. IV.4B'). Si è registrato, pertanto, un incremento molto pronunciato del tempo trascorso da questo teleosteo nello *swimming towards surface* rispetto ai ctrl, i quali nuotavano invece verso la superficie solo in cerca di cibo. Anche nei pesci trattati con la concentrazione di 0.25 mg/L è stato riportato un incremento molto evidente di tale comportamento ed anche in questo caso sin dalle prime 24h di esposizione.

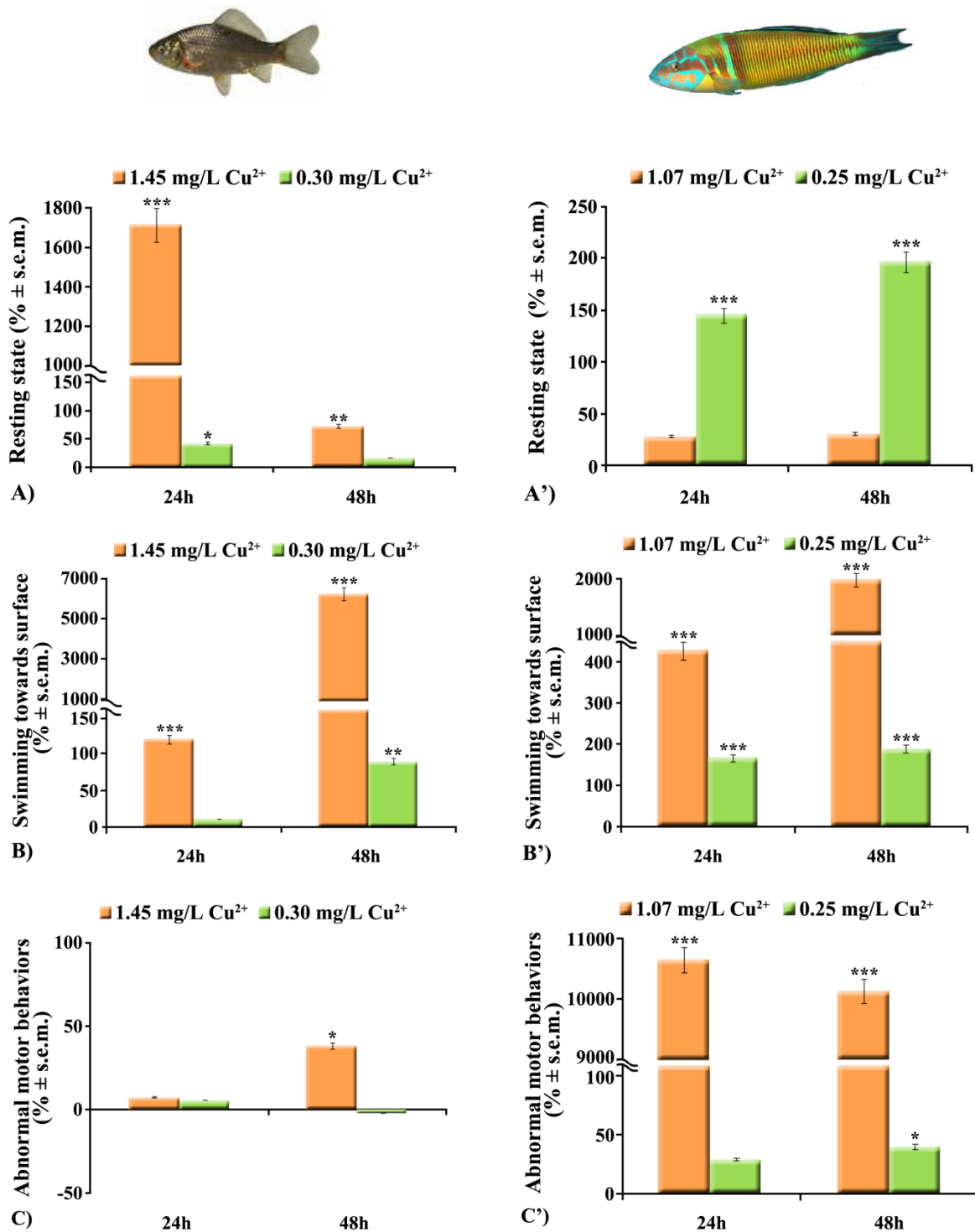


Fig. IV.4 Effetti del trattamento con CuCl₂ su alcune categorie comportamentali. I dati sono riportati come variazione percentuale (%) di *resting state* (A, A') *swimming towards surface* (B, B') e *abnormal motor behaviors* (C, C') in esemplari di *Carassius carassius* (A, B, C) esposti alle concentrazioni 1.45 mg/L e 0.30 mg/L di CuCl₂ e di *Thalassoma pavo* (A', B', C') esposti alle concentrazioni 1.07 mg/L e 0.25 mg/L di CuCl₂ rispetto ai ctrl (*) a 24h e a 48h di esposizione. L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali con una telecamera e le immagini acquisite sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando p<0.05. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

IV.1.2 Effetti neurodegenerativi

Una volta valutati gli effetti sul comportamento dei due teleostei dei diversi trattamenti con CuCl_2 si è voluto verificare l'induzione di eventuali processi neurodegenerativi che avrebbero potuto interessare aree encefaliche preposte al controllo di importanti funzioni comportamentali. A questo scopo, è stata effettuata un'analisi neurodegenerativa su sezioni encefaliche di esemplari di *Carassius carassius* e *Thalassoma pavo* esposti per 48h al metallo. Le sezioni sono state sottoposte ad ACS, tecnica istologica che consente di individuare i siti di neurodegenerazione, grazie alle proprietà argirofiliche dei neuroni andati incontro a morte cellulare.

Per quanto riguarda i risultati di tale analisi in *Carassius carassius*, l'ACS ha mostrato che entrambe le concentrazioni di contaminante sono state responsabili dell'attivazione di eventi neurodegenerativi, anche se di differente entità. A livello telencefalico, e nello specifico nel nucleo laterale del telencefalo dorsale (DI), nel caso del trattamento con la più alta concentrazione, la neurodegenerazione è apparsa molto più pronunciata (Fig. IV.5A) che non quella indotta dal trattamento con la più bassa concentrazione (Fig. IV.5B) o nei ctrl (Fig. IV.5C). Anche nell'OT un'evidente reazione argirofilica è stata rinvenuta negli animali esposti a 1.45 mg/L di Cu^{2+} (Fig. IV.5A'), mentre solo pochi e rari elementi degenerati sono stati riscontrati nel caso dei pesci esposti alla concentrazione più bassa (Fig. IV.5B'), contrariamente ai ctrl che non mostravano alcun segno apprezzabile di morte neuronale (Fig. IV.5C').

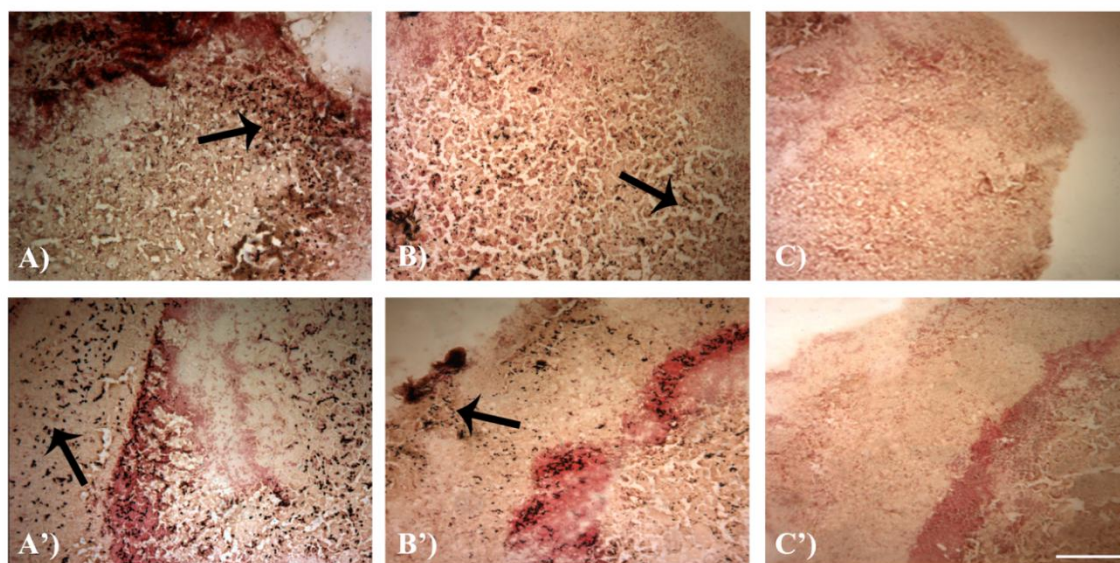


Fig. IV.5 Sezioni encefaliche rappresentative delle aree DI (A, B, C) e OT (A', B', C') osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS in esemplari di *Carassius carassius* trattati con le concentrazioni 1.45 mg/L (A, A') e 0.30 mg/L (B, B') di CuCl_2 rispetto ai ctrl (C, C'). Scale bar: 100 μm .

In *Thalassoma pavo*, i risultati di tali analisi hanno mostrato eventi degenerativi limitati a pochi siti encefalici. In particolare, gli animali esposti alla più alta concentrazione di CuCl_2 mostravano un'evidente neurodegenerazione a livello del sito telencefalico DI (Fig. IV.6A), neurodegenerazione che appariva meno pronunciata nel caso del trattamento con la più bassa concentrazione (Fig. IV.6B), mentre i ctrl non mostravano alcun segno di danno neuronale (Fig. IV.6C). Una modesta neurodegenerazione è stata rinvenuta anche in OT e anche in questo caso è apparsa più evidente a seguito del trattamento con l'alta concentrazione (Fig. IV.6A') se paragonata al trattamento con quella più bassa (Fig. IV.6B') e ai ctrl (Fig. IV.6C').

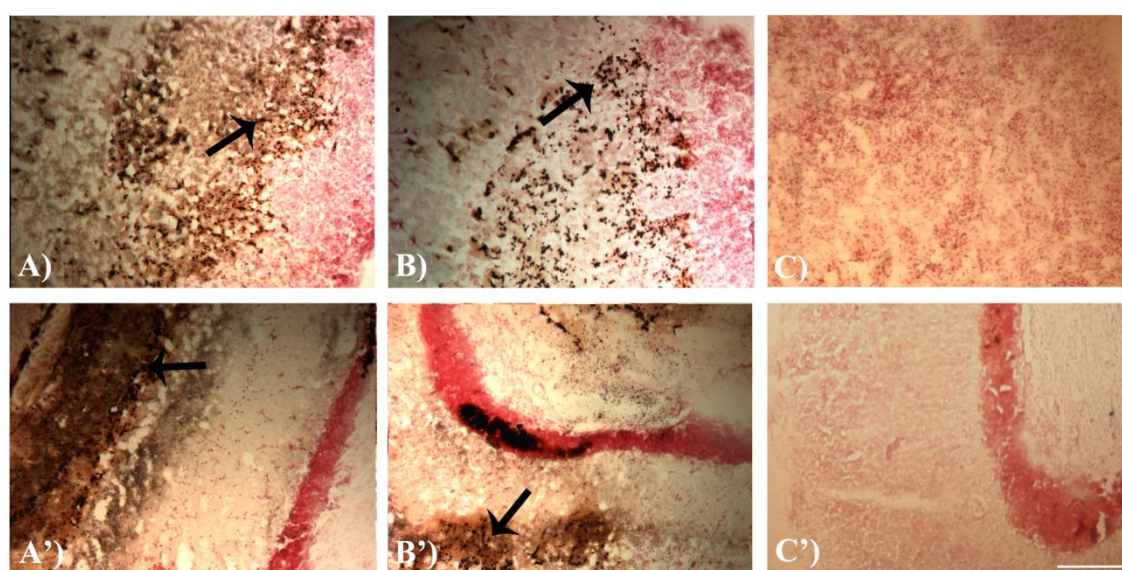


Fig. IV.6 Sezioni encefaliche rappresentative delle aree DI (A, B, C) e OT (A', B', C') osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS in esemplari di *Thalassoma pavo* trattati con le concentrazioni 1.07 mg/L (A, A') e 0.25 mg/L (B, B') di CuCl_2 rispetto ai ctrl (C, C'). Scale bar: 80 μm .

IV.1.3 Effetti sull'espressione dell'HSP90

Gli studi d'espressione genica tramite ISH sono stati condotti sull'encefalo di *Carassius carassius* e *Thalassoma pavo* con l'intento di valutare le risposte trascrizionali dell'HSP90, innescate dall'esposizione al metallo ed eventualmente correlabili con le alterazioni comportamentali e con gli effetti neurodegenerativi osservati. A tal fine, ci siamo avvalsi di *probes* oligonucleotidici opportunamente disegnati sulla base dei *partial cds* dell'HSP90 disponibili in banca dati per ciascun teleosteo, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Prima, però, di valutare gli effetti trascrizionali indotti dal CuCl_2 è stata innanzitutto analizzata, tramite ISH, la distribuzione del trascritto per l'HSP90 nelle

diverse aree encefaliche degli esemplari di *Carassius carassius* e *Thalassoma pavo* non sottoposti a trattamento (ctrl). I risultati di tale analisi hanno evidenziato un'espressione eterogenea dell'mRNA per l'HSP90 come è possibile osservare dalle sezioni rappresentative dell'encefalo medio-posteriore di *Carassius carassius* ibridate con la sonda *antisense* (Fig. IV.7A) rispetto al suo *sense* (Fig. IV.7B). Nell'encefalo di questo teleosteo sono stati infatti rinvenuti livelli elevati (≥ 0.5 O.D.) di trascritto in NPGl e nel TLo (Fig. IV.7C). Livelli intermedi di espressione ($\leq 0.50 \geq 0.25$ O.D.) caratterizzavano le aree telencefaliche Dm, Dl, Vv, Vl, Vd. Mentre bassi livelli sono stati rilevati in Dd (≤ 0.25 O.D.). Livelli trascrizionali intermedi sono stati inoltre riscontrati in NPGm ed in aree diencefaliche, come NRL, oltre che in OT e nel CCe e VCe.

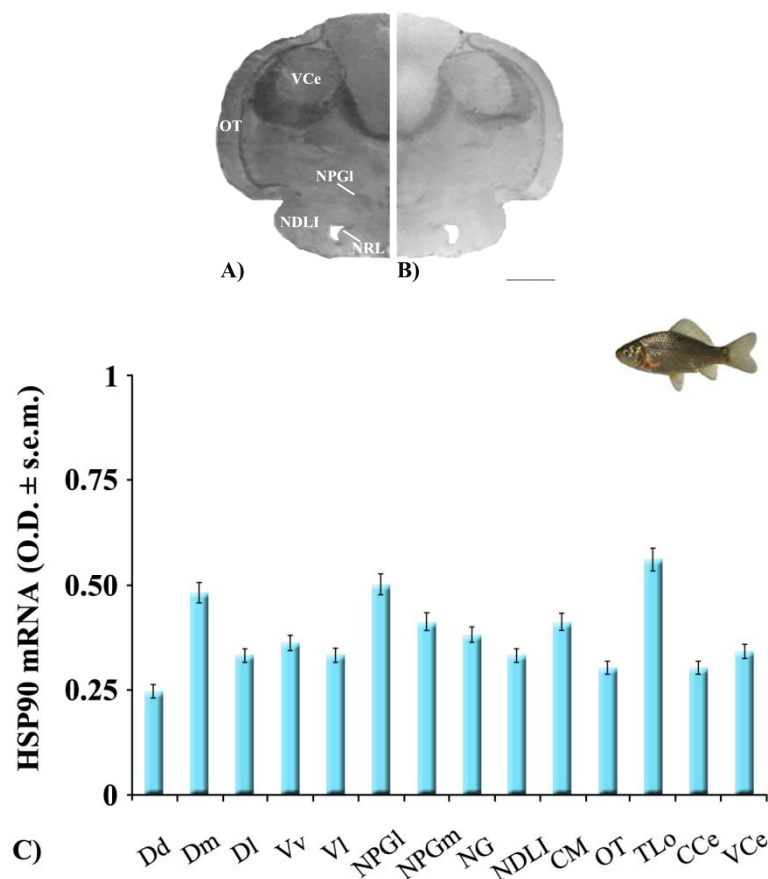


Fig. IV.7 Distribuzione del trascritto dell'HSP90 in alcune aree encefaliche di *Carassius carassius*. Le sezioni trasversali rappresentative dell'encefalo medio-posteriore sono state sottoposte ad ISH con sonda antisense (A) e sense (B). Scale bar: 0.68 mm. I livelli di trascritto (C) sono stati riportati come valori medi di densità ottica (O.D. ± s.e.m.) nelle diverse aree encefaliche dei pesci ctrl di 5 esperimenti indipendenti. Abbreviazioni: CCe= corpo del cervelletto; CM= corpo mammillare; Dd= nucleo dorsale del telencefalo dorsale; Dl= nucleo laterale del telencefalo; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; dorsale; mediale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NG= nucleo glomeruloso; NPGl= nucleo preglomeruloso laterale; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT= tetto ottico; TLo= tori longitudinali; VCe= valvola del cervelletto; Vl= nucleo laterale del telencefalo ventrale; Vv= nucleo ventrale del telencefalo ventrale.

Una distribuzione eterogenea del trascritto è stata rinvenuta anche nell'encefalo di *Thalassoma pavo* (Fig. IV.8). Più precisamente, livelli intermedi di espressione caratterizzavano diversi nuclei come NG, mentre bassi livelli trascrizionali sono stati riportati in Dl.

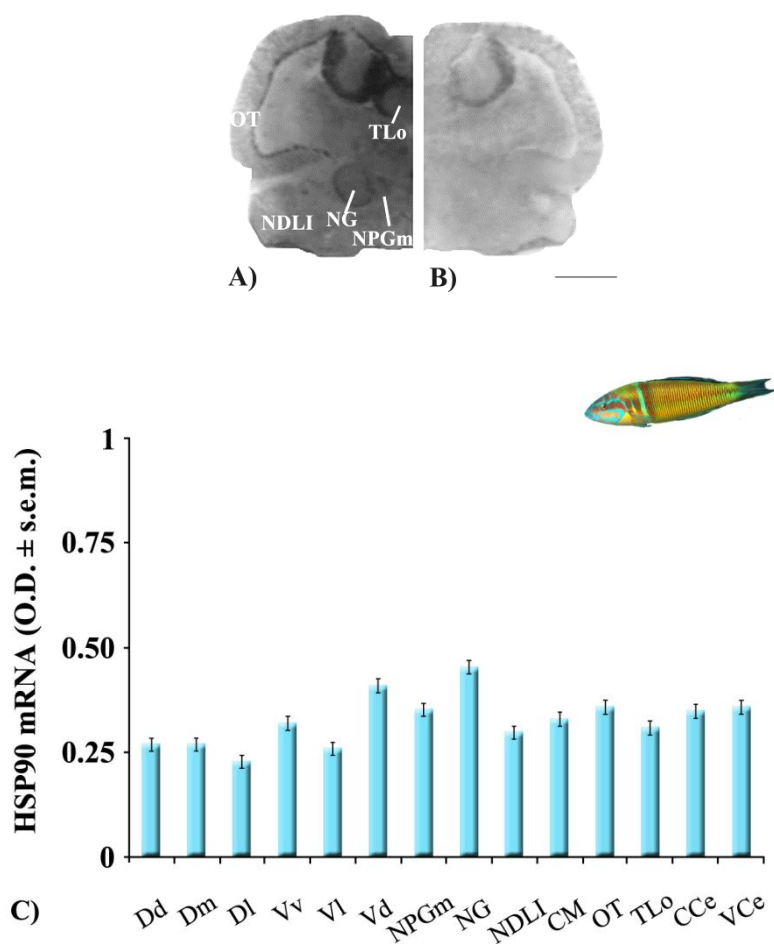


Fig. IV.8 Distribuzione del trascritto dell'HSP90 nei principali nuclei encefalici di *Thalassoma pavo*. Le sezioni trasversali rappresentative dell'encefalo medio-posteriore sono state sottoposte ad ISH con sonda antisense (A) e sense (B). Scale bar: 0.77 mm. I livelli di trascritto (C) sono stati riportati come valori medi di densità ottica (O.D. ± s.e.m.) nelle diverse aree encefaliche dei pesci ctrl di 5 esperimenti indipendenti. Abbreviazioni: CCe= corpo del cervelletto; CM= corpo mammillare; Dd= nucleo dorsale del telencefalo dorsale; Dl= nucleo laterale del telencefalo; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale;dorsale; mediale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NG= nucleo glomeruloso; NPGl= nucleo preglomeruloso laterale; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT= tetto ottico; TLo= tori longitudinali; VCe= valvola del cervelletto; VI= nucleo laterale del telencefalo ventrale; Vv= nucleo ventrale del telencefalo ventrale.

Una volta stabilita la distribuzione eterogenea del trascritto nell'encefalo dei due teleostei, lo studio degli effetti del metallo è proseguito valutando eventuali variazioni nel *pattern* trascrizionale dell'HSP90, al termine di 48h di trattamento con le due diverse

concentrazioni di CuCl_2 . In *Carassius carassius* la più alta concentrazione di CuCl_2 , ovvero 1.45 mg/L, è stata responsabile solo di una moderata *up-regulation* dell'HSP90 in VCe (+31%), mentre moderate riduzioni dell'espressione si sono osservate a livello di alcune aree telencefaliche considerate quali Dm (-52%), DI (-34%) e VI (-41%) (Fig. IV.9). Differentemente, la più bassa concentrazione di CuCl_2 , ovvero 0.30 mg/L, ha promosso un moderato incremento dei livelli di trascritto, a livello del solo nucleo diencefalico NPGm (+34%). Nel resto dei nuclei presi in esame, non sono state apprezzate variazioni trascrizionali significative rispetto ai pesci ctrl.

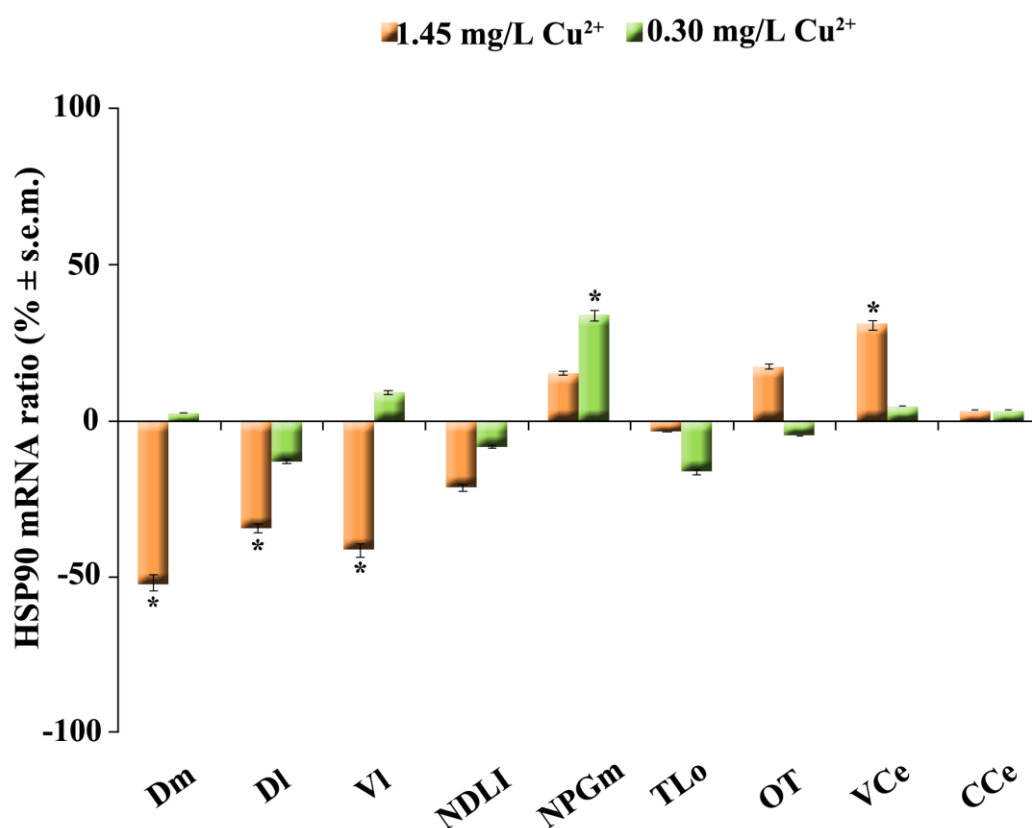


Fig. IV.9 Espressione dell'HSP90 nelle diverse aree encefaliche di *Carassius carassius* in seguito a 48h di trattamento con CuCl_2 . I dati sono riportati come variazione (%) dei livelli di espressione dell'HSP90 dei pesci esposti alle concentrazioni 1.45 mg/L e 0.30 mg/L di metallo, rispetto ai ctrl (*). Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$. Abbreviazioni: CCe: corpo del cervelletto; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; DI= nucleo laterale del telencefalo dorsale; VI= nucleo laterale del telencefalo ventrale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT= tetto ottico; TLo: tori longitudinali; VCe= valvola del cervelletto.

Nel caso di *Thalassoma pavo* è stato possibile, invece, dimostrare che la più alta concentrazione di CuCl_2 , ovvero 1.07 mg/L, promuoveva un'*up-regulation* del trascritto a

livello di diversi siti encefalici ed in particolare in DI (+87%) dove è stato registrato un elevato incremento dei livelli di mRNA dell'HSP90 (Fig. IV.10). A seguito del trattamento con questa concentrazione di contaminante, si è potuto osservare inoltre una moderata *up-regulation* in un'altra area telencefalica quale Dm (+56%), a livello mesencefalico in TLo (+32%) e a livello cerebellare in VCe (+30%) e CCe (+57%). Al contrario, nell'OT (-30%) è stata riportata una moderata riduzione dei livelli di trascritto rispetto ai ctrl.

A livello telencefalico la più bassa concentrazione di CuCl_2 ha causato un'*up-regulation* dell'HSP90, che era elevata in Dm (+68%) e moderata in DI (+35%), mentre a livello diencefalico ha fatto registrare un moderato incremento trascrizionale in NPGm (+30%). Molto interessante risulta l'effetto in TLo (+72%), più pronunciato rispetto a quello rinvenuto con il trattamento con la più alta concentrazione di Cu^{2+} , durante il quale è stato osservato un elevato incremento della quantità di mRNA rispetto ai ctrl.

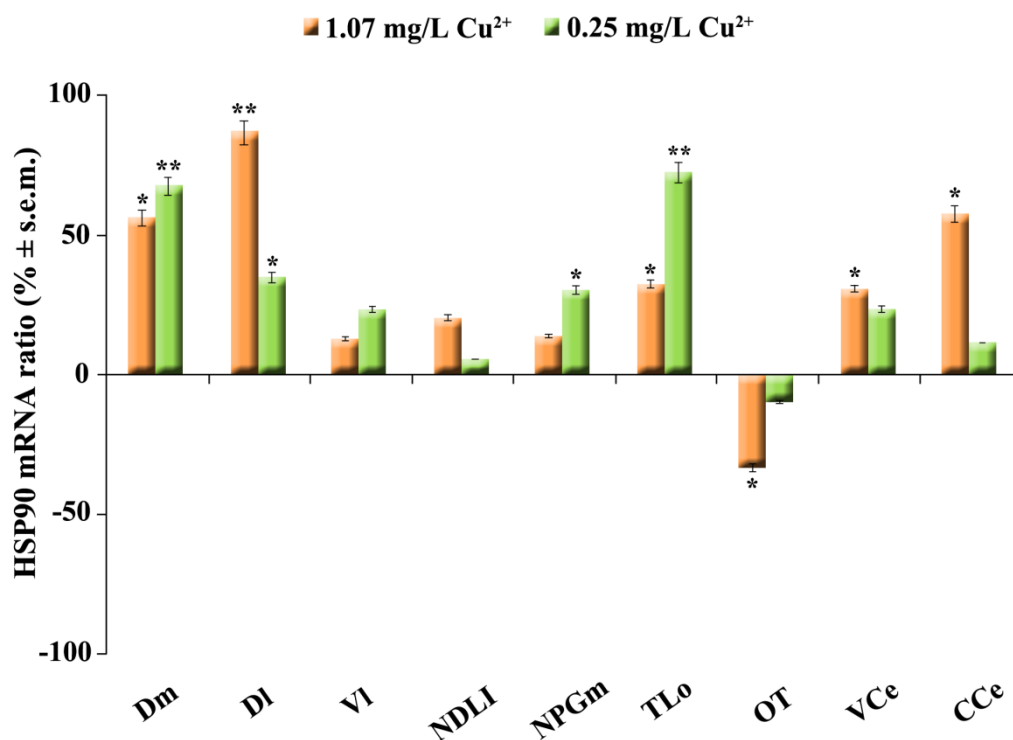


Fig. IV.10 Espressione dell'HSP90 nelle diverse aree encefaliche di *Thalassoma pavo* in seguito a 48h di trattamento con CuCl_2 . I dati sono riportati come variazione (%) dei livelli di espressione dell'HSP90 dei pesci esposti alle concentrazioni 1.07 mg/L e 0.25 mg/L di metallo, rispetto ai ctrl (*). Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Abbreviazioni: CCe: corpo del cervelletto; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; DI= nucleo laterale del telencefalo dorsale; VI= nucleo laterale del telencefalo ventrale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT= tetto ottico; TLo: tori longitudinali; VCe= valvola del cervelletto.

IV.2 Effetti dell'ORX-A sulle alterazioni Cu^{2+} -indotte

Dopo aver valutato gli effetti dei trattamenti a breve termine, si è voluto verificare l'effetto della somministrazione dell'ORX-A durante le 48h di esposizione al contaminante.

Come già riportato nella sezione Materiali e Metodi l'effetto dell'ORX-A sulle alterazioni indotte dal CuCl_2 è stato valutato in *Thalassoma pavo* solo nel caso della più bassa concentrazione di CuCl_2 testata. Nel caso di quella più alta, invece, i teleostei non si sono dimostrati in grado di tollerare l'iniezione durante il periodo di trattamento.

Al contrario, in *Carassius carassius* è stato possibile valutare l'effetto dell'ORX-A durante l'esposizione ad entrambe le concentrazioni di CuCl_2 .

IV.2.1 Effetti dell'ORX-A sul comportamento

L'analisi comportamentale dei teleostei trattati quotidianamente con ORX-A, in concomitanza all'esposizione con il CuCl_2 , è stata condotta per verificare eventuali variazioni degli effetti causati dal metallo sul comportamento. I risultati derivanti da tale analisi riportati sia a 24h, corrispondente alla prima somministrazione di ORX-A che a 48h, corrispondente alla seconda somministrazione, sono stati confrontati con quelli ottenuti durante esposizione al solo Cu^{2+} e con i ctrl.

Come già detto, l'ORX-A è stata somministrata in *Carassius carassius* anche durante l'esposizione alla più alta concentrazione di metallo (1.45 mg/L). Durante le prime 24h di esposizione, il neuropeptide non è risultato capace di indurre variazioni significative del *feeding* rispetto ai trattati con il solo Cu^{2+} (Fig. IV.11A). Un moderato incremento (56%) di tale attività è stato apprezzato invece a 48h rispetto ai trattati con il solo metallo, che tuttavia non riportava i valori del *feeding* ai livelli dei ctrl. Nel caso dello *swimming*, l'effetto inibitorio indotto dal solo Cu^{2+} a 48h di esposizione non risultava significativo in presenza di ORX-A, rispetto ai ctrl (Fig. IV.11B). Contemporaneamente l'ORX-A sembrava promuovere a 48h un incremento molto elevato del *resting state*, sia rispetto ai ctrl che rispetto ai trattati con il solo metallo (Fig. IV.11C). Un simile effetto trova spiegazione nel fatto che la somministrazione di ORX-A causava una straordinaria riduzione dello *swimming towards surface* che negli animali esposti al solo Cu^{2+} risultava invece aumentato in maniera molto pronunciata (Fig. IV.11D). In aggiunta, il trattamento con ORX-A ha ostacolato anche l'insorgenza degli *abnormal motor behaviors* che venivano riscontrati invece dopo 48h di esposizione al metallo da solo (Fig. IV.11E).

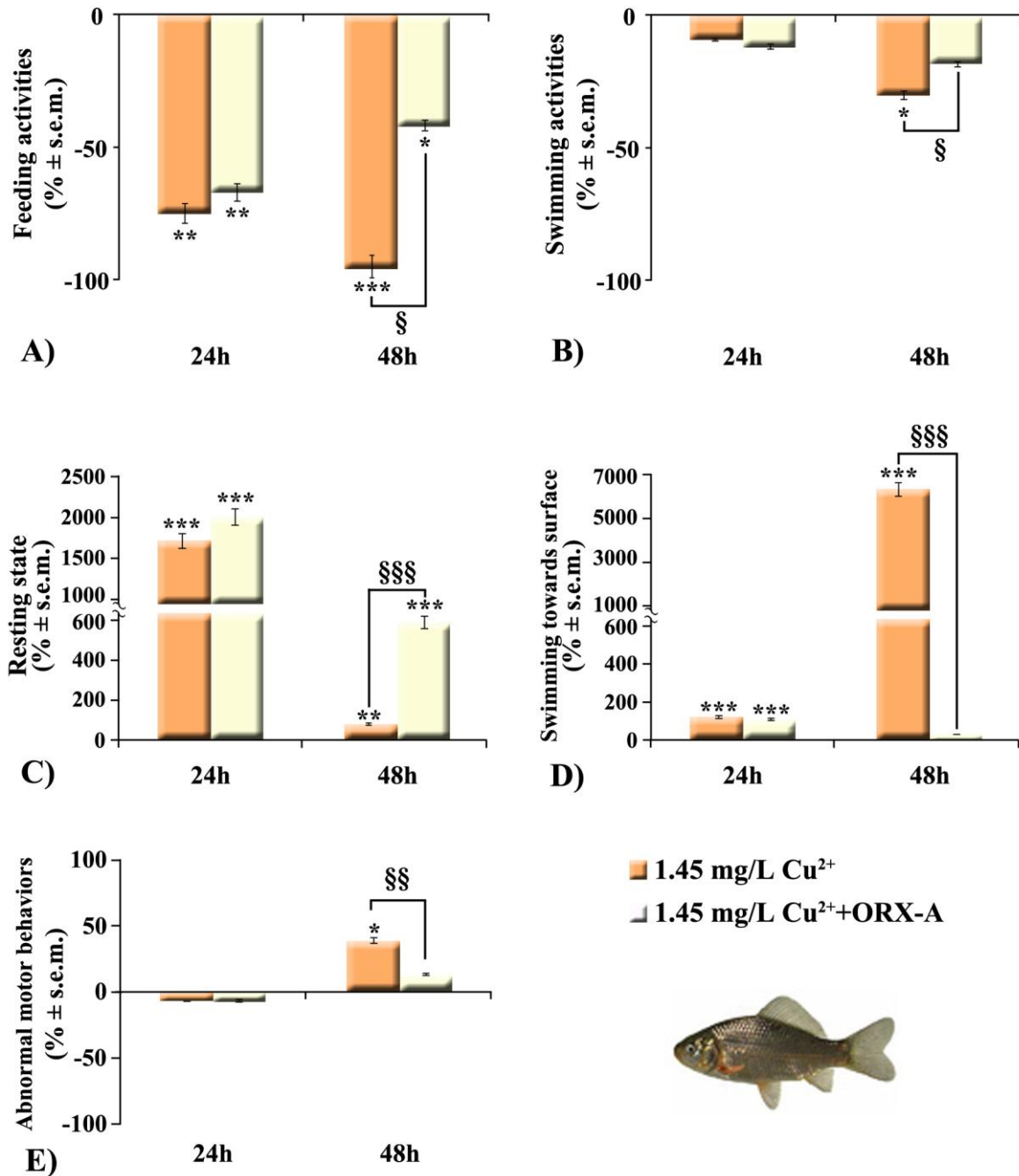


Fig. IV.11 Effetti dell'ORX-A sulle alterazioni comportamentali indotte dalla più alta concentrazione di CuCl₂. I dati sono riportati come variazione percentuale (%) di *feeding* (A), *swimming* (B), *resting state* (C), *swimming towards surface* (D) e *abnormal motor behaviors* (E) in esemplari di *Carassius carassius* trattati con 1.45 mg/L di metallo +/- ORX-A (10 ng/g BW) rispetto ai ctrl (NaCl 0.9%; *) a 24h e a 48h di esposizione. I dati relativi al trattamento con ORX-A sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al trattamento con il solo metallo (§). L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali con una telecamera e le immagini acquisite sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$.

In questa stessa specie, la somministrazione di ORX-A in concomitanza all'esposizione con la più bassa concentrazione di CuCl_2 , ovvero 0.30 mg/L, ha determinato a 48h di trattamento un moderato aumento del *feeding* rispetto agli esemplari esposti al solo metallo (Fig. IV.12A). Tale incremento significativo promosso dal neuropeptide non ha comunque favorito un ritorno di questa attività a valori normali, in quanto era possibile registrare ancora una moderata riduzione del *feeding* (-35%) rispetto ai ctrl. Nel caso della *swimming performance* la somministrazione di ORX-A non ha indotto alcuna modifica significativa di tale attività, rispetto agli animali ctrl, in modo analogo a quanto precedentemente osservato durante l'esposizione al solo Cu^{2+} (Fig. IV.12B). Molto interessanti sono risultati gli effetti del trattamento con l'ORX-A sul *resting state* visto che già durante le prime 24h di esposizione, corrispondenti alla prima iniezione del neuropeptide, sono stati rinvenuti aumenti molto pronunciati di questo comportamento, non solo rispetto ai trattati con il solo metallo ma anche rispetto ai ctrl (Fig. IV.12C). Altrettanto interessanti sono risultati gli effetti dell'ORX-A nel caso della categoria *swimming towards surface* in quanto la sua somministrazione, rispetto ai ctrl, si è dimostrata in grado di prevenire l'aumento elevato di tale comportamento, rinvenuto invece nei pesci esposti al solo contaminante (Fig. IV.12D). Infatti, alle 48h del co-trattamento Cu^{2+} + ORX-A è stata riscontrata una riduzione pari al 91% del tempo trascorso in questa attività rispetto agli animali esposti al metallo non sottoposti ad iniezione con ORX-A. Per quanto riguarda gli *abnormal motor behaviors*, il co-trattamento con il neuropeptide non ha avuto effetti significativi (Fig. IV.12E). Va comunque considerato che durante la sola esposizione a questa concentrazione di CuCl_2 tali atteggiamenti anomali non si sono manifestati né a 24h né a 48h.

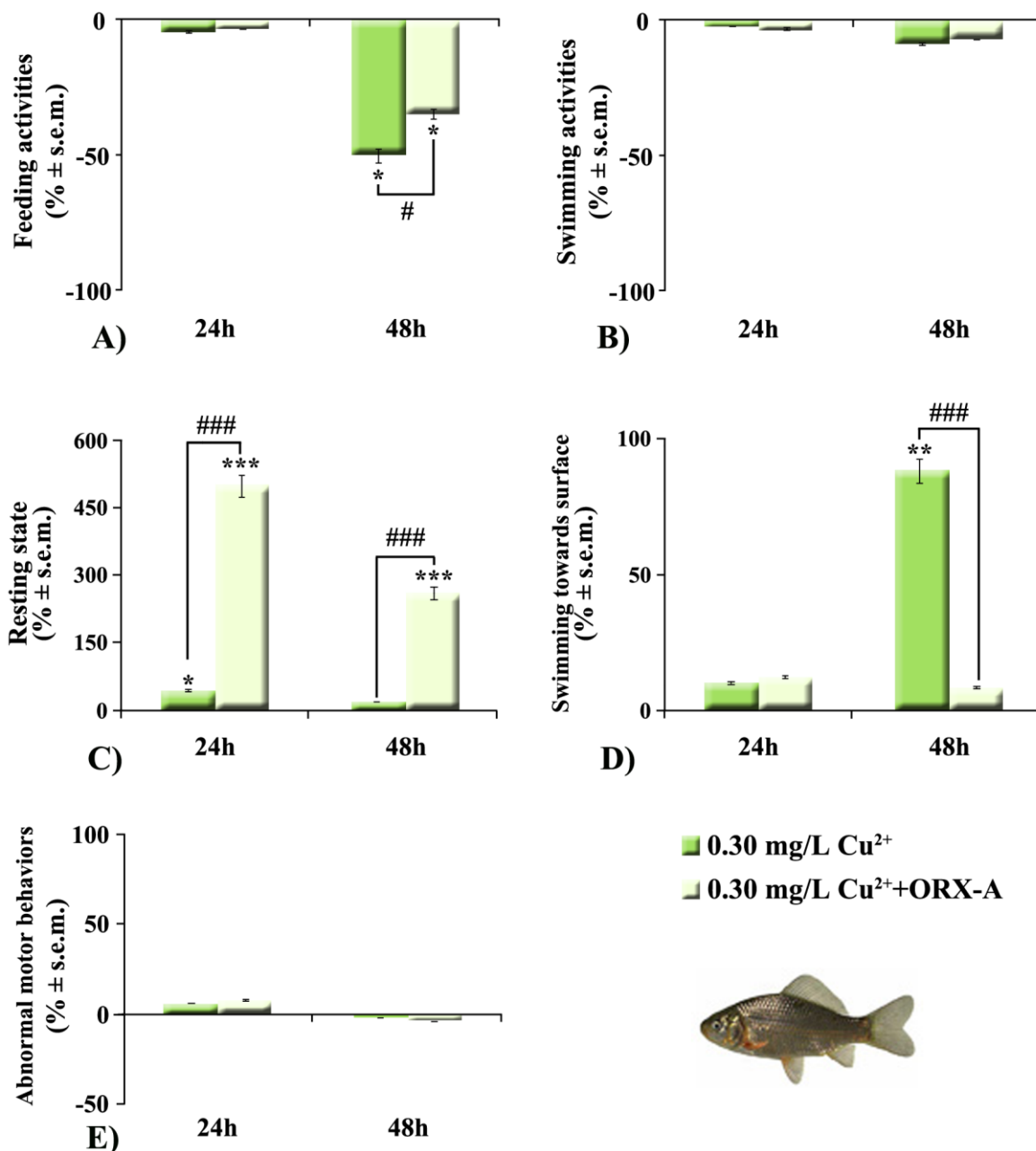
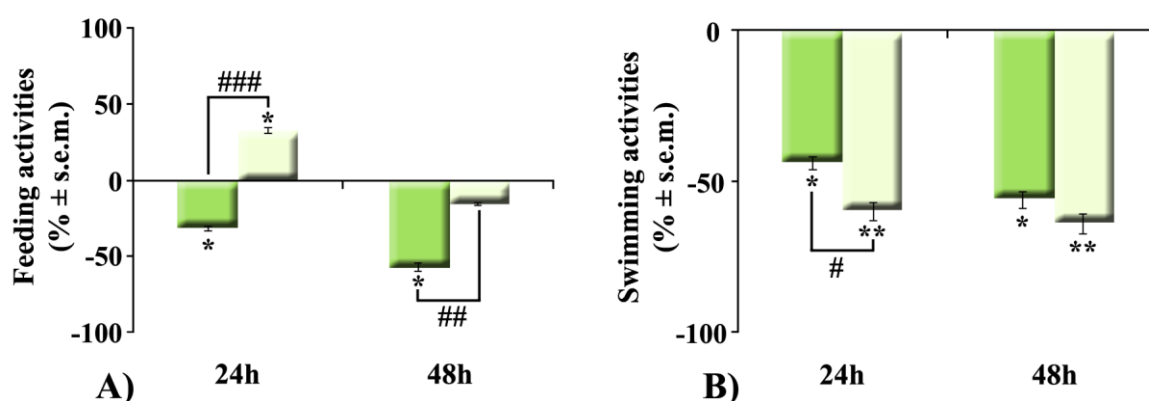


Fig. IV.12 Effetti dell'ORX-A sulle alterazioni comportamentali indotte dalla più bassa concentrazione di CuCl₂ in *Carassius carassius*. I dati sono riportati come variazione percentuale (%) di *feeding* (A), *swimming* (B), *resting state* (C), *swimming towards surface* (D) e *abnormal motor behaviors* (E) in esemplari di *Carassius carassius* trattati con 0.30 mg/L di metallo +/- ORX-A (10 ng/g BW) rispetto ai ctrl (NaCl 0.9%; *) a 24h e a 48h di esposizione. I dati relativi al trattamento con ORX-A sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al trattamento con il solo metallo (#). L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali con una telecamera e le immagini acquisite sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

Nel caso di *Thalassoma pavo* l'ORX-A somministrata contemporaneamente all'esposizione alla più bassa concentrazione di CuCl_2 , ha provocato durante le prime 24h di trattamento un moderato incremento del *feeding* rispetto ai ctrl (+33%) invertendo completamente l'effetto del contaminante che aveva determinato una moderata riduzione di tale attività comportamentale (Fig. IV.13A). A 48h di trattamento l'effetto dell'ORX-A sull'alterazione Cu^{2+} -indotta è apparso invece meno evidente. Infatti, sebbene la somministrazione del neuropeptide abbia evitato la significativa riduzione del *feeding* indotta dal metallo, essa non è stata in grado di determinarne un incremento rispetto ai ctrl. Per ciò che concerne lo *swimming* a 24h di trattamento l'ORX-A sembrava addirittura potenziare la riduzione causata dal Cu^{2+} rispetto ai ctrl (Fig. IV.13B). A 48h non è stato invece registrato alcun effetto significativo dell'ORX-A rispetto ai pesci esposti al solo contaminante. Analogamente, negli esemplari di *Thalassoma pavo* sottoposti al trattamento con Cu^{2+} +ORX-A non sono stati riportati effetti significativi sul *resting state* rispetto ai trattati con il solo metallo. Difatti, quest'attività, nonostante l'iniezione di ORX-A, è risultata incrementata in maniera molto elevata rispetto ai ctrl sia a 24h che a 48h, senza però riportare variazioni significative rispetto al solo metallo (Fig. IV.13C). Differente da quello osservato nel teleosteo d'acqua dolce risulta anche l'effetto sortito dal neuropeptide sullo *swimming towards surface*, la cui alterazione è risultata ulteriormente rafforzata dalla somministrazione di ORX-A, sia a 24h che a 48h di trattamento (Fig. IV.13D). Gli *abnormal motor behaviors* insorti a 48h nei trattati con il solo metallo rimangono invece invariati durante il co-trattamento Cu^{2+} +ORX-A (Fig. IV.13E).



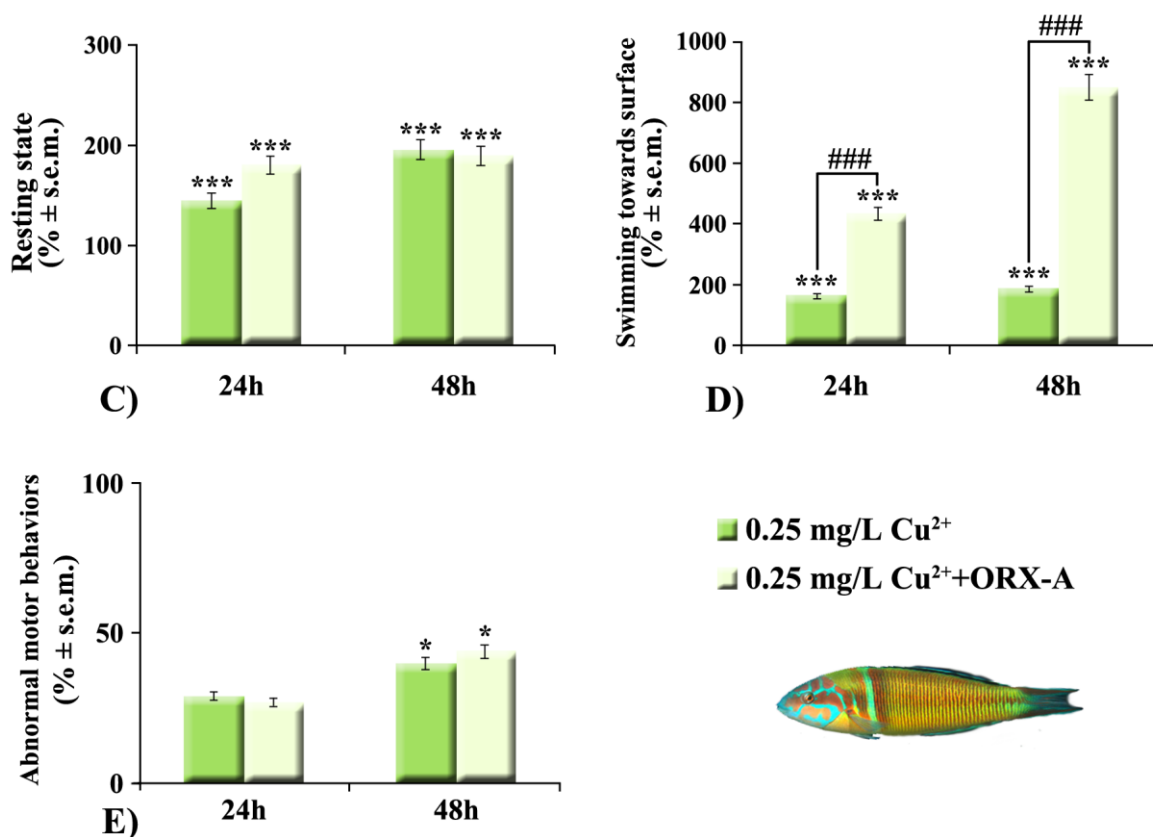


Fig. IV.13 Effetti dell'ORX-A sulle alterazioni comportamentali indotte dalla più bassa concentrazione di CuCl_2 in *Thalassoma pavo*. I dati sono riportati come variazione percentuale (%) di *feeding* (A), *swimming* (B), *resting state* (C), *swimming towards surface* (D) e *abnormal motor behaviors* (E) in esemplari di *Thalassoma pavo* trattati con 0.25 mg/L di metallo +/- ORX-A (10 ng/g BW) rispetto ai ctrl (NaCl 0.9%; *) a 24h e a 48h di esposizione. I dati relativi al trattamento con ORX-A sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al trattamento con il solo metallo (#). L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali con una telecamera e le immagini acquisite sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

IV.2.2 Effetti dell'ORX-A sui fenomeni neurodegenerativi

Oltre all'influenza del co-trattamento sul comportamento dei teleostei, si è voluto anche valutare se la somministrazione del neuropeptide causasse qualche effetto sui processi neurodegenerativi Cu^{2+} -dipendenti prima descritti.

Nel caso degli esemplari di *Carassius carassius*, trattati con l'alta concentrazione di metallo (1.45 mg/L) in concomitanza al trattamento con l'ORX-A, è stato possibile verificare a livello di DI (Fig. IV.14A) la presenza di un cospicuo numero di cellule degenerate. Tuttavia, la degenerazione qui osservata sembrava più lieve rispetto a quella

riportata nel precedente paragrafo per gli esposti al solo Cu^{2+} . Al contrario in OT il danno neuronale appariva paragonabile a quello del precedente trattamento (Fig. IV.14B).

Negli esemplari di *Carassius carassius*, trattati con ORX-A durante esposizione alla più bassa concentrazione di CuCl_2 (0.30 mg/L), è stato possibile apprezzare in DI solo pochi elementi cellulari andati incontro a morte cellulare (Fig. IV.14A'). La reazione argirofilica riscontrata in OT a seguito del co-trattamento sembrava invece simile a quella determinata dall'esposizione al solo metallo. Infatti, anche in questo caso solo poche cellule degenerate sono state osservate in tale sito mesencefalico (Fig. IV.14B').

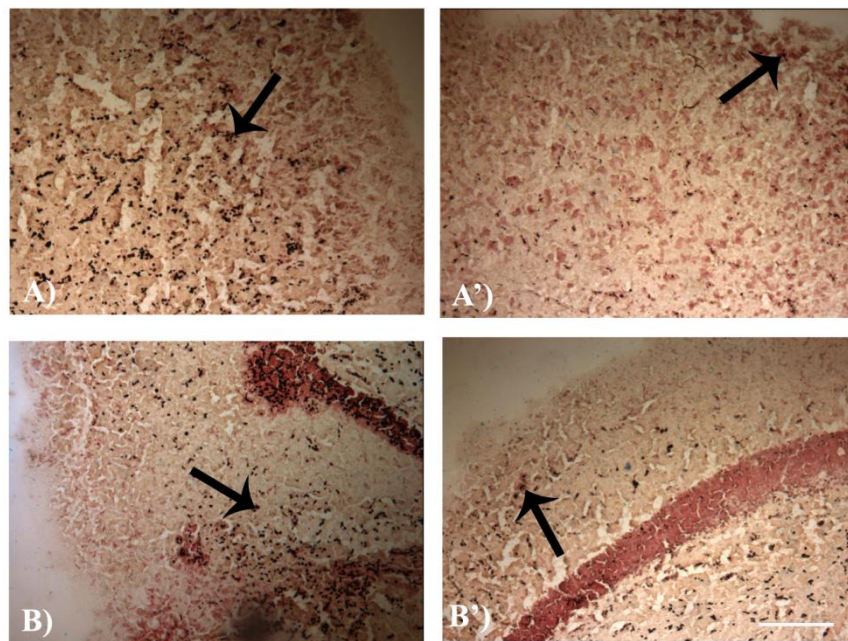


Fig. IV.14 Sezioni encefaliche rappresentative delle aree encefaliche DI (A, A') e OT (B, B') osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS in esemplari di *Carassius carassius* esposti per 48h alle concentrazioni 1.45 mg/L (A, B) e 0.30 mg/L (A', B') di CuCl_2 e sottoposti giornalmente ad iniezione i.p. con ORX-A (10 ng/g BW). Scale bar: 100 μm .

Per quanto riguarda il teleosteo marino *Thalassoma pavo*, a livello telencefalico e nello specifico in DI, è stata riportata una pronunciata neurodegenerazione negli esemplari co-trattati con ORX-A e 0.25 mg/L di CuCl_2 (Fig. IV.15A). In questo caso la reazione argirofilica è sembrata paragonabile a quella mostrata precedentemente negli esemplari esposti al solo Cu^{2+} . Una lieve riduzione è stata riscontrata invece nell'OT dove sono state rilevate solo poche cellule degenerate (Fig. IV.15B).

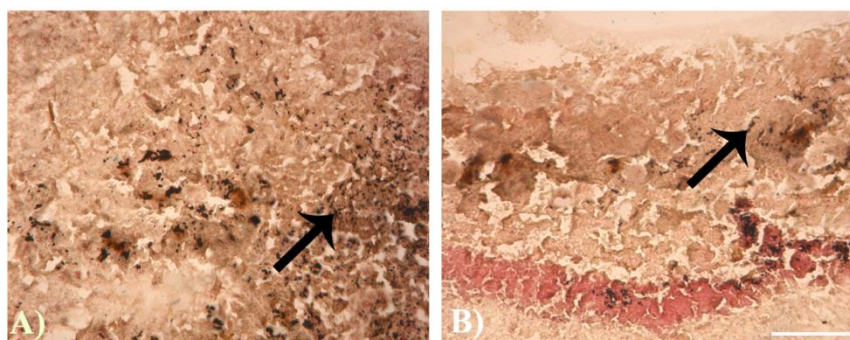


Fig. IV.15 Sezioni encefaliche rappresentative delle aree encefaliche DI (A) e OT (B) osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS in esemplari di *Thalassoma pavo* esposti per 48h alla concentrazione 0.25 mg/L di CuCl_2 e sottoposti giornalmente ad iniezione i.p. con ORX-A (10 ng/g BW). Scale bar: 100 μm .

IV.2.3 Effetti dell'ORX-A sulla trascrizione dell'HSP90

Accanto ai risultati dell'analisi comportamentale e neurodegenerativa è stato importante investigare gli effetti del neuropeptide ORX-A sulla trascrizione neuronale dell'HSP90 durante esposizione al CuCl_2 . Anche in questo caso tale valutazione è stata effettuata al termine dell'intero periodo d'esposizione (48h).

In *Carassius carassius* trattato con ORX-A durante esposizione alla più alta concentrazione di metallo, è stato osservato nel nucleo telencefalico DI un moderato incremento dei livelli di trascritto (34%) rispetto ai pesci esposti al solo Cu^{2+} , facendo registrare un ritorno dei valori di O.D. a valori più prossimi a quelli dei ctrl (Fig. IV.16). Negli altri nuclei telencefalici l'ORX-A non ha provocato, invece, modifiche significative rispetto al trattamento con il solo metallo. E' stato interessante notare come in TLo (+31%), area in cui dopo esposizione al CuCl_2 non si era registrato alcun effetto sull'espressione dello *chaperon*, la concomitante somministrazione di ORX-A abbia indotto una moderata *up-regulation* rispetto ai ctrl. In VCe la moderata *up-regulation* già causata dal Cu^{2+} veniva ulteriormente potenziata (+94%) dal trattamento con ORX-A.

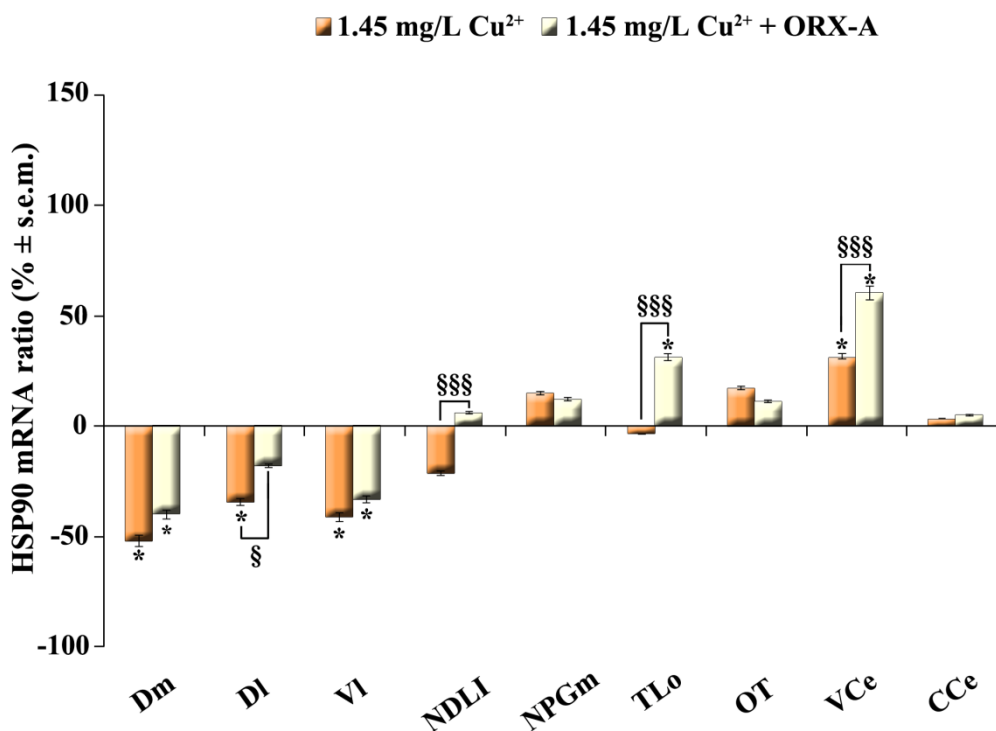


Fig. IV.16 Effetti dell'ORX-A sulle variazioni trascrizionali indotte dalla più alta concentrazione di CuCl_2 in *Carassius carassius*. Le variazioni di espressione dell'mRNA per l'HSP90 nelle diverse aree encefaliche sono state riportate come variazione percentuale (%) in esemplari trattati con l'alta concentrazione (1.45 mg/L) di metallo +/- ORX-A (10 ng/g BW) rispetto ai ctrl (NaCl 0.9%; *). I dati relativi al trattamento con ORX-A sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al trattamento con il solo metallo (§). Analisi statistica: Two way ANOVA seguito dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$. Abbreviazioni: CCe= corpo del cervelletto; Dl= nucleo laterale del telencefalo dorsale; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT: tetto ottico; TLo= tori longitudinali; VCe: valvola del cervelletto; Vl= nucleo laterale del telencefalo ventrale.

Negli esemplari di *Carassius carassius* trattati con ORX-A durante l'esposizione alla più bassa concentrazione di CuCl_2 (0.30 mg/L), l'unico effetto significativo riscontrato rispetto ai ctrl è stato osservato in VCe (+30%) che ha mostrato una moderata *up-regulation* dei livelli di mRNA dell'HSP90 (Fig. IV.17). Mentre in NPGm, in cui l'esposizione al solo metallo aveva causato un moderato incremento del trascritto, non è stata registrata alcuna variazione significativa rispetto ai ctrl dopo co-trattamento con ORX-A. Un simile trend è stato osservato anche nei restanti nuclei encefalici.

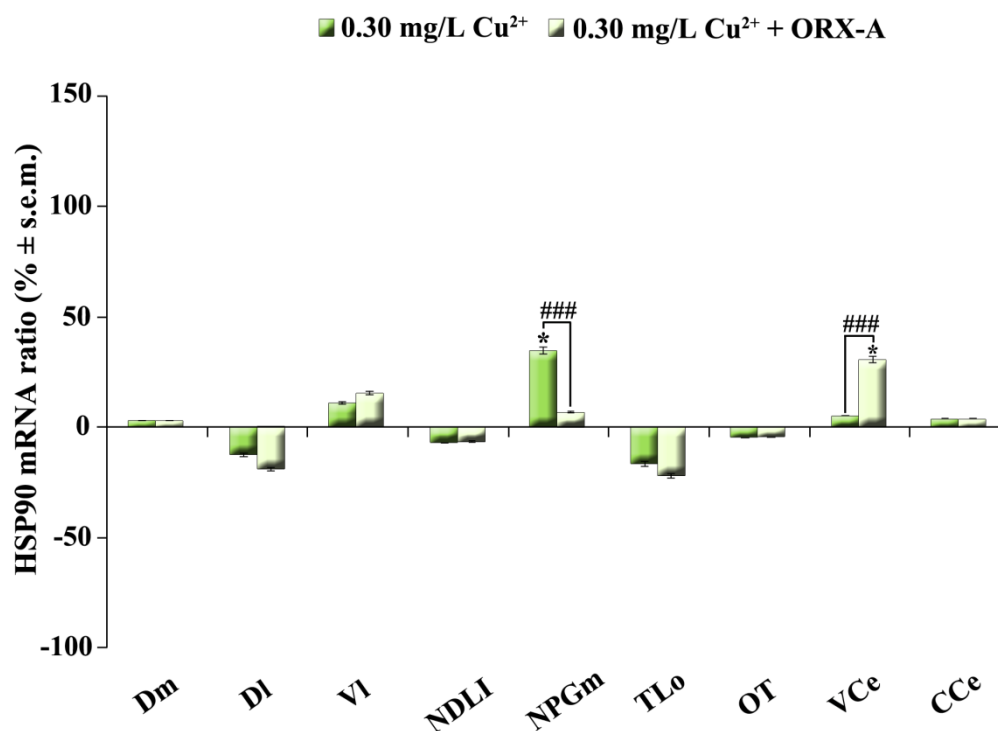


Fig. IV.17 Effetti dell'ORX-A sulle variazioni trascrizionali indotte dalla più bassa concentrazione di CuCl_2 in *Carassius carassius*. Le variazioni di espressione dell'mRNA per l'HSP90 nelle diverse aree encefaliche sono state riportate come variazione percentuale (%) in esemplari trattati con la più bassa concentrazione di metallo (0.30 mg/L) +/- ORX-A (10 ng/g BW) rispetto ai ctrl (NaCl 0.9%; *). I dati relativi al trattamento con ORX-A sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al trattamento con il solo metallo (#). Analisi statistica: Two way ANOVA seguito dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. Abbreviazioni: CCe= corpo del cervelletto; DI= nucleo laterale del telencefalo dorsale; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT: tetto ottico; TLo= tori longitudinali; VCe: valvola del cervelletto; VI= nucleo laterale del telencefalo ventrale.

La somministrazione di ORX-A durante esposizione alla più bassa concentrazione di Cu^{2+} ha causato una generale *up-regulation* dell'HSP90 nell'encefalo di *Thalassoma pavo*. Difatti, anche in quei nuclei in cui il Cu^{2+} da solo non aveva indotto alcuna modifica trascrizionale, hanno mostrato un innalzamento dei loro livelli trascrizionali. In particolare, nel telencefalo (VI; +92%) il neuropeptide ha promosso, rispetto ai ctrl, un'*up-regulation* molto elevata dell'HSP90 che è risultata tale anche rispetto ai trattati con il solo metallo (Fig. IV.18). In modo simile, anche in VCe (+56%) e CCe (+30%), che non avevano subito modifiche significative dovute al metallo, è stata notata una moderata *up-regulation* rispetto ai ctrl.

Nel caso di DI (+70%), che aveva già riportato un moderato incremento dei livelli di mRNA a seguito dell'esposizione al solo Cu^{2+} , dopo trattamento con ORX-A si è verificata

un'elevata *up-regulation*. Anche in altri nuclei, il neuropeptide sembrava potenziare l'effetto trascrizionale del metallo. E' questo il caso di NPGm (+190%) e TLo (+65%) in cui il co-trattamento Cu^{2+} +ORX-A ha promosso un'elevata (+87%) *up-regulation*, nel primo caso, mentre nel secondo l'*up-regulation* è divenuta molto elevata (+119%) rispetto ai ctrl.

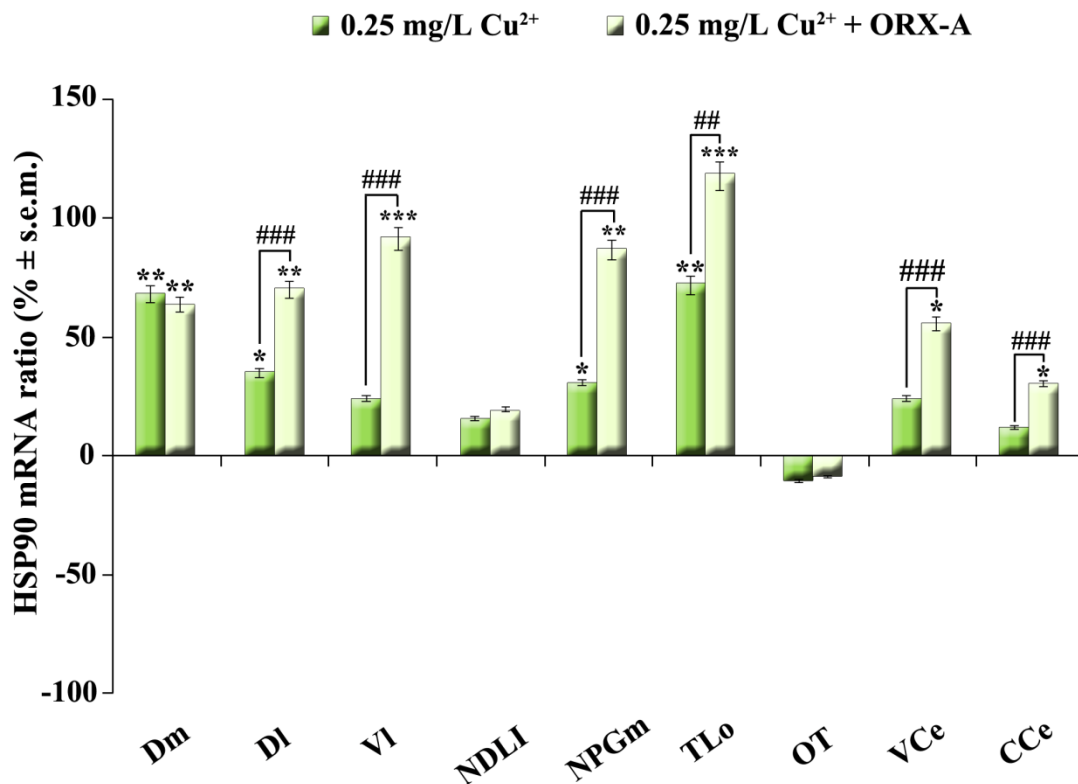


Fig. IV.18 Effetti dell'ORX-A sulle variazioni trascrizionali indotte dalla più bassa concentrazione di CuCl_2 in *Thalassoma pavo*. Le variazioni di espressione dell'mRNA per l'HSP90 nelle diverse aree encefaliche sono state riportate come variazione percentuale (%) in esemplari trattati con la più bassa concentrazione di metallo (0.25 mg/L) +/- ORX-A (10 ng/g BW) rispetto ai ctrl (NaCl 0.9%; *). I dati relativi al trattamento con ORX-A sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al trattamento con il solo metallo (#). Analisi statistica: Two way ANOVA seguito dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. Abbreviazioni: CCe= corpo del cervelletto; Dl= nucleo laterale del telencefalo dorsale; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT: tetto ottico; TLo= tori longitudinali; VCe: valvola del cervelletto; VI= nucleo laterale del telencefalo ventrale.

IV.3 Valutazione del recupero

Una volta stabiliti gli effetti neuro-comportamentali causati dalle due differenti concentrazioni di CuCl_2 in *Thalassoma pavo* e *Carassius carassius*, ci si è chiesti se le alterazioni osservate potessero essere recuperate e in che misura. A tal fine gli animali precedentemente esposti per 48h al metallo sono stati trasferiti in acqua priva di contaminante per un periodo corrispondente a quello di trattamento. Il test di recupero ha dato la possibilità non solo di indagare la reversibilità dei danni indotti ma anche di investigare le risposte innescate a livello neuronale per la ripresa delle funzioni perturbate.

IV.3.1 Recupero delle alterazioni comportamentali

Il recupero delle alterazioni comportamentali riportate nei due teleostei, a seguito delle 48h di trattamento con CuCl_2 , è stato valutato sia a 24h che a 48h di permanenza in acqua pulita. Nel caso di *Carassius carassius* la più alta concentrazione di Cu^{2+} aveva provocato una diminuzione molto pronunciata del comportamento alimentare. Tale alterazione è stata moderatamente ridotta durante il test di recupero rispetto al precedente trattamento sia dopo 24h che dopo 48h in acqua senza contaminante (Fig. IV.19A). Il recupero è risultato tuttavia solo parziale e il *feeding* di questo teleosteo restava infatti ridotto in modo elevato rispetto ai ctrl. Per quanto riguarda gli esemplari di *Carassius carassius*, prima esposti alla più bassa concentrazione di metallo, la moderata riduzione del *feeding*, riportata al termine del periodo di trattamento, rimaneva pressoché tale anche nelle prime 24h successive al trasferimento in acqua priva di metallo. Dopo 48h si è registrato, invece, un ristabilimento del normale comportamento alimentare con ritorno verso i valori di *feeding* tipici dei ctrl.

Per quanto riguarda il *feeding* di *Thalassoma pavo*, già dalle prime 24h della fase di recupero, gli animali derivanti da esposizione alla più alta concentrazione di metallo mostravano un moderato incremento di tale attività, rispetto al precedente periodo di trattamento, che aveva fatto registrare un'elevata riduzione della ricerca di cibo (Fig. IV.19B). Tale miglioramento non è risultato tuttavia sufficiente per ristabilire un normale comportamento alimentare; difatti, al termine del test di recupero, il *feeding* rimaneva al termine del test di recupero moderatamente ridotto rispetto ai ctrl. Nel caso dei teleostei marini esposti alla più bassa concentrazione di Cu^{2+} , a partire dalle prime 24h in acqua priva di metallo è stato rinvenuto un graduale recupero dell'effetto inibitorio sul *feeding* indotto dal metallo. Infatti, mentre a 24h il recupero era risultato solo parziale, nelle 48h

successive si registrava un recupero totale del *feeding*, con un ritorno a livelli paragonabili a quelli dei ctrl.

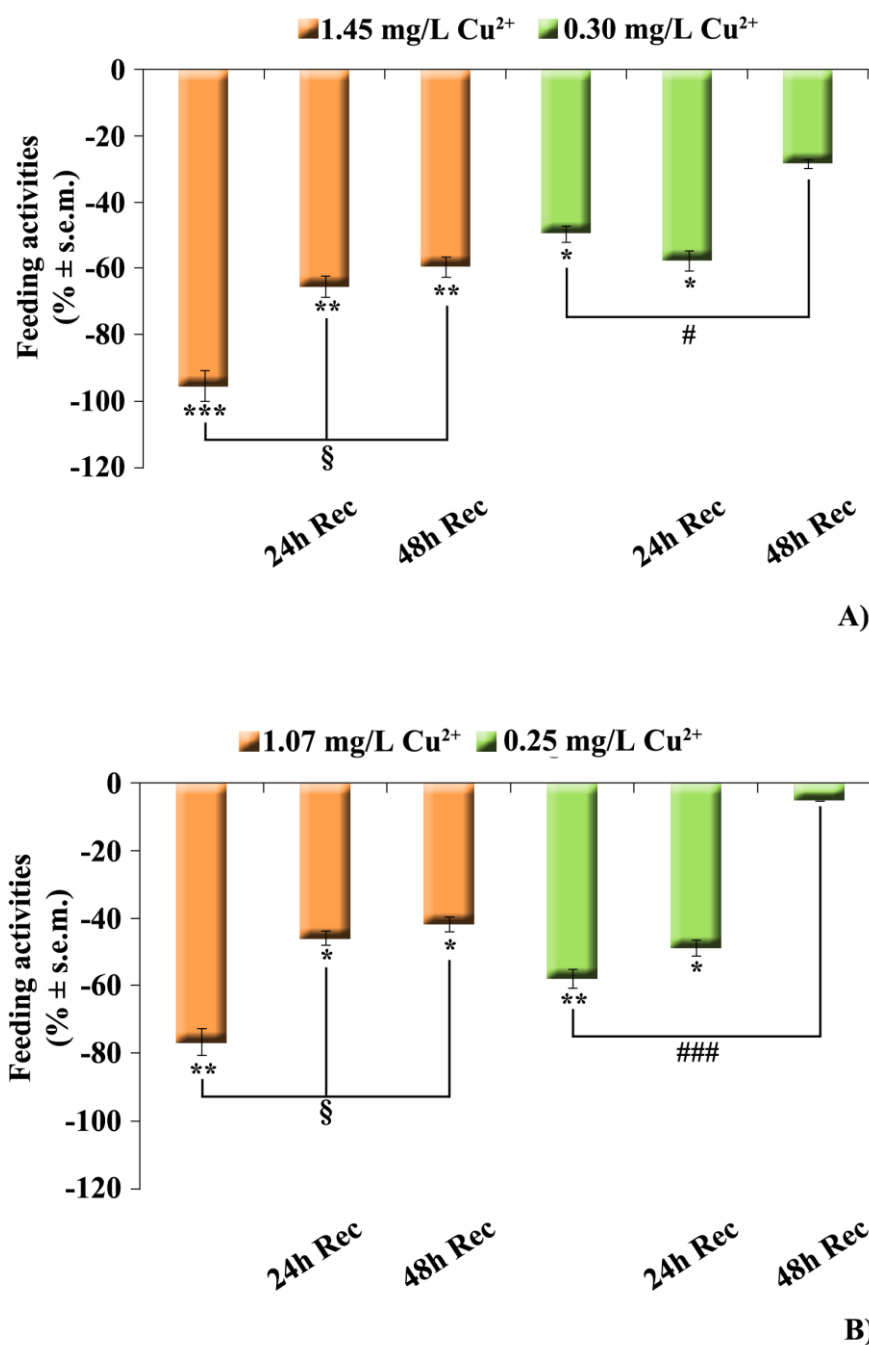
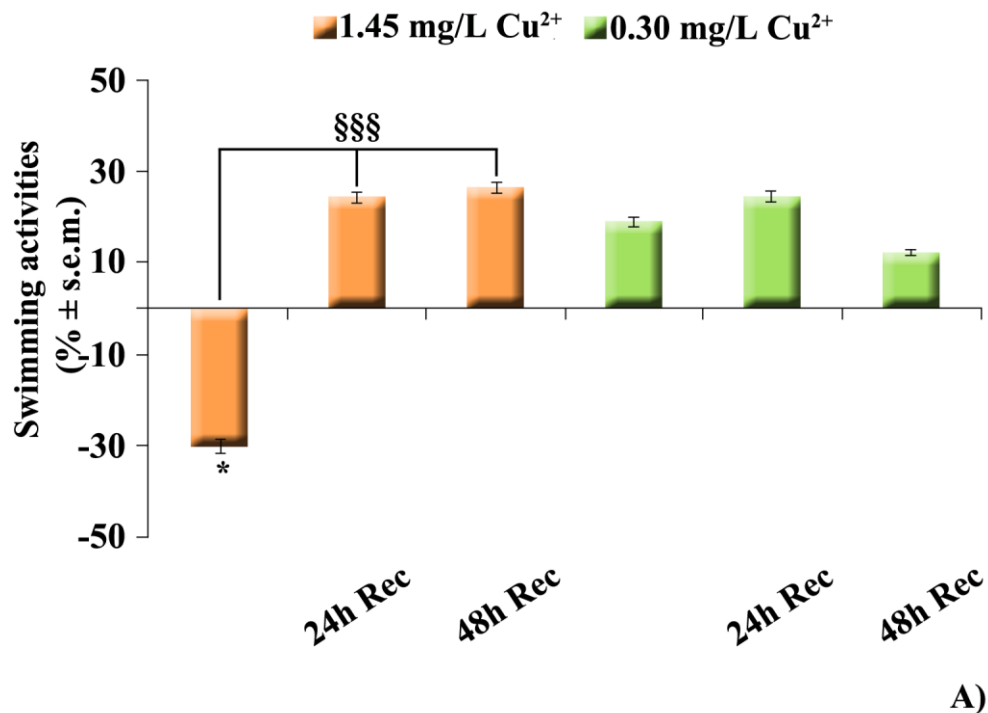


Fig. IV.19 Valutazione del recupero delle alterazioni comportamentali indotte dal CuCl₂. I dati sono riportati come variazione percentuale (%) rispetto ai ctrl (*) del *feeding* di esemplari di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) trasferiti in acqua priva di contaminante per un periodo massimo di 48h. I dati relativi alla fase di recupero sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al solo trattamento di 48h con alta (§;1.45 mg/L e 1.07 mg/L) e bassa (#;0.30 mg/L e 0.25 mg/L) concentrazione di metallo. L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali attraverso una telecamera e le immagini sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: two-way ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; § $p < 0.05$; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$.

Nel teleosteo d'acqua dolce, la concentrazione più alta aveva fatto registrare una moderata riduzione del tempo trascorso dall'animale nel normale *swimming* esplorativo. Questo lieve effetto inibitorio è stato completamente abolito durante il successivo periodo di permanenza in acqua senza Cu^{2+} , già dalle prime 24h all'esposizione (Fig. IV.20A). Nel caso dello *swimming* di *Thalassoma pavo*, la concentrazione alta di contaminante aveva determinato un'elevata riduzione di quest'attività. Durante il periodo successivo in acqua priva di Cu^{2+} non è stato osservato alcun miglioramento di tale effetto inibitorio (Fig. IV.20B). Al contrario, un completo recupero della normale *swimming performance* è stato riportato nei teleostei marini prima esposti alla concentrazione più bassa di CuCl_2 , in cui si era osservata una moderata riduzione rispetto ai ctrl.



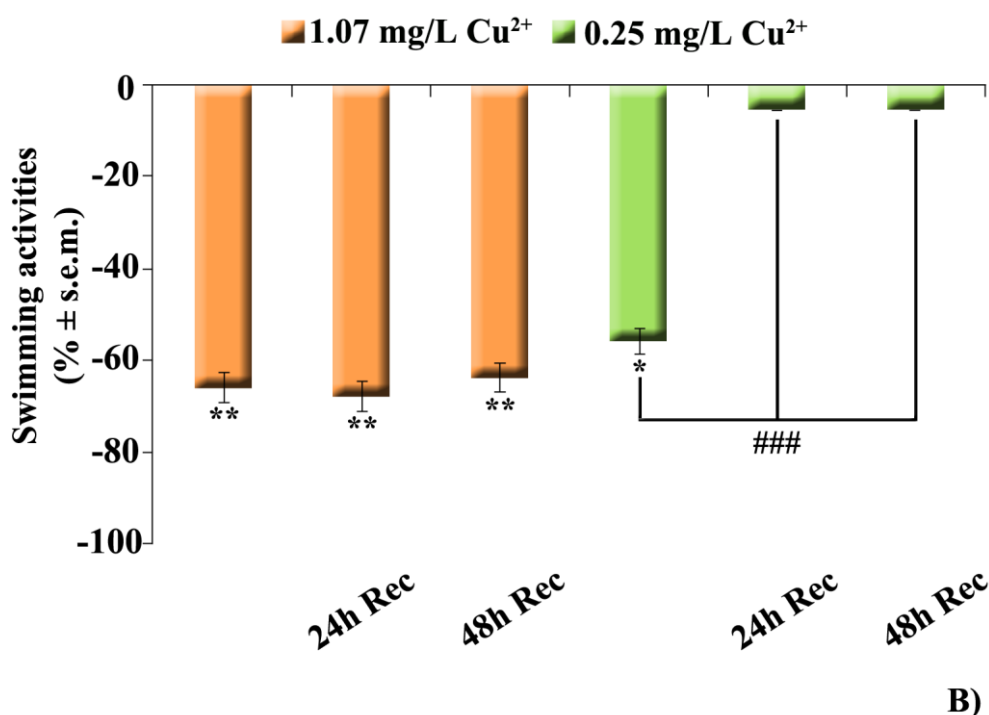


Fig. IV.20 Valutazione del recupero delle alterazioni comportamentali indotte dal CuCl₂. I dati sono riportati come variazione percentuale (%) rispetto ai ctrl (*) dello *swimming* di esemplari di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) trasferiti, dopo 48h di trattamento, in acqua priva di contaminante per un periodo massimo di 48h. I dati relativi alla fase di recupero sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al solo trattamento di 48h con alta (§;1.45 mg/L e 1.07 mg/L) e bassa (#;0.30 mg/L e 0.25 mg/L) concentrazione di metallo. L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali attraverso una telecamera e le immagini sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: two-way ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; §§ $p < 0.001$; ### $p < 0.001$.

Negli esemplari di *Carassius carassius*, a seguito del trasferimento in acqua senza Cu²⁺, è stato completamente abolito, già durante le prime 24h del test di recupero, l'elevato incremento del *resting state* indotto dalla alta concentrazione di Cu²⁺ (Fig. IV.21A). Nel caso degli animali esposti alla concentrazione più bassa, in cui già non si erano registrate variazioni significative, non sono state rinvenute ulteriori variazioni di questo comportamento durante il periodo in acqua pulita, rispetto ai ctrl.

Per quanto riguarda il *resting state* di *Thalassoma pavo*, questa categoria comportamentale non aveva mostrato alcuna alterazione significativa durante il trattamento con l'alta dose di CuCl₂ rispetto ai ctrl. Stranamente, durante il periodo di recupero successivo, si osserva invece un innalzamento molto pronunciato del tempo trascorso dagli animali in tale attività (Fig. IV.21B). Al contrario, nei teleostei prima esposti alla concentrazione più bassa di CuCl₂, che avevano riportato un aumento molto significativo del *resting state*, è stata osservata un'elevata riduzione dell'alterazione che tuttavia non

promuoveva un recupero completo. Difatti, sia a 24h che a 48h di permanenza in acqua priva di metallo gli animali mostravano ancora un moderato incremento dell'attività di *resting* rispetto ai ctrl.

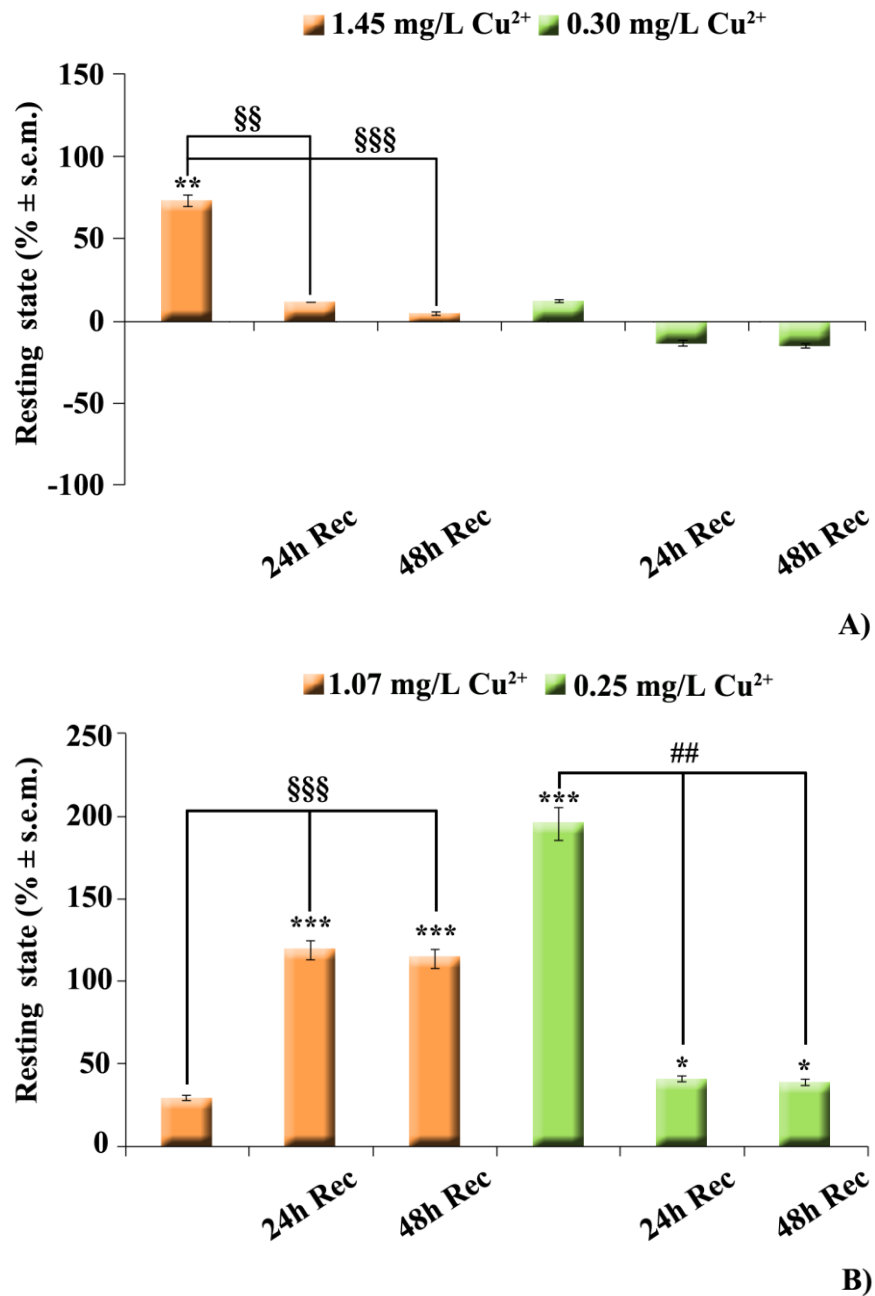
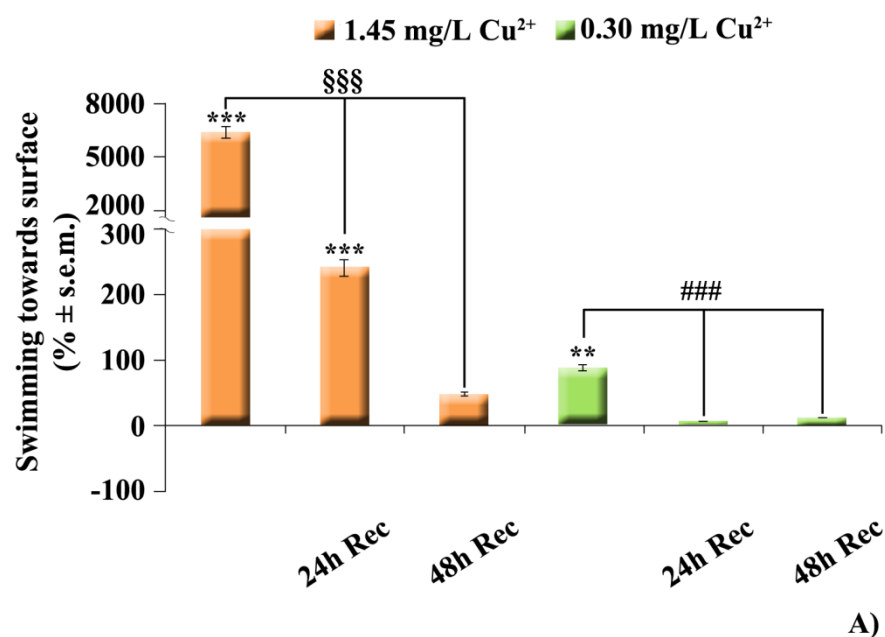


Fig. IV.21 Valutazione del recupero delle alterazioni comportamentali indotte dal CuCl₂. I dati sono riportati come variazione percentuale (%) rispetto ai ctrl (*) del *resting state* in esemplari di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) trasferiti, dopo 48h di trattamento, in acqua priva di contaminante per un periodo massimo di 48h. I dati relativi alla fase di recupero sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al solo trattamento di 48h con alta (§; 1.45 mg/L e 1.07 mg/L) e bassa (#; 0.30 mg/L e 0.25 mg/L) concentrazione di metallo. L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali attraverso una telecamera e le immagini sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: two-way ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

In questa fase, l'analisi comportamentale è proseguita valutando anche l'eventuale recupero nel caso di una categoria comportamentale quale lo *swimming towards surface* che durante i trattamenti era risultata pesantemente alterata in entrambi i teleostei. In *Carassius carassius* si è assistito ad un graduale ripristino dei livelli normali di *swimming towards surface*, anche negli esemplari derivanti da trattamento con l'alta concentrazione di Cu^{2+} . Difatti, questi animali mostravano sin dalle prime 24h della fase di recupero una riduzione molto pronunciata di tale atteggiamento rispetto ai trattati (Fig. IV.22A). Alle 48h è stato osservato invece un ritorno del tempo trascorso in questa attività verso valori prossimi a quelli dei ctrl. Un recupero completo è stato ottenuto, invece, già nelle prime 24h in acqua priva di metallo, nel caso dei teleostei prima esposti alla più bassa concentrazione.

Gli esemplari di *Thalassoma pavo*, esposti alla concentrazione di 1.07 mg/L, non mostravano nel periodo successivo in acqua senza Cu^{2+} alcuna modifica significativa della categoria *swimming towards surface*, rispetto all'effetto rinvenuto durante il trattamento (Fig. IV.22B) poichè durante l'intero test di recupero lo *swimming towards surface* rimaneva incrementato in modo molto elevato rispetto ai ctrl. Al contrario, i teleostei marini esposti alla più bassa concentrazione di metallo hanno mostrato, nella fase di recupero, un'elevata riduzione di tale atteggiamento rispetto all'effetto riportato nel periodo di esposizione. In questo caso il recupero risultava, tuttavia, solo parziale in quanto il tempo trascorso nello *swimming towards surface* restava comunque aumentato in maniera significativa rispetto agli esemplari ctrl.



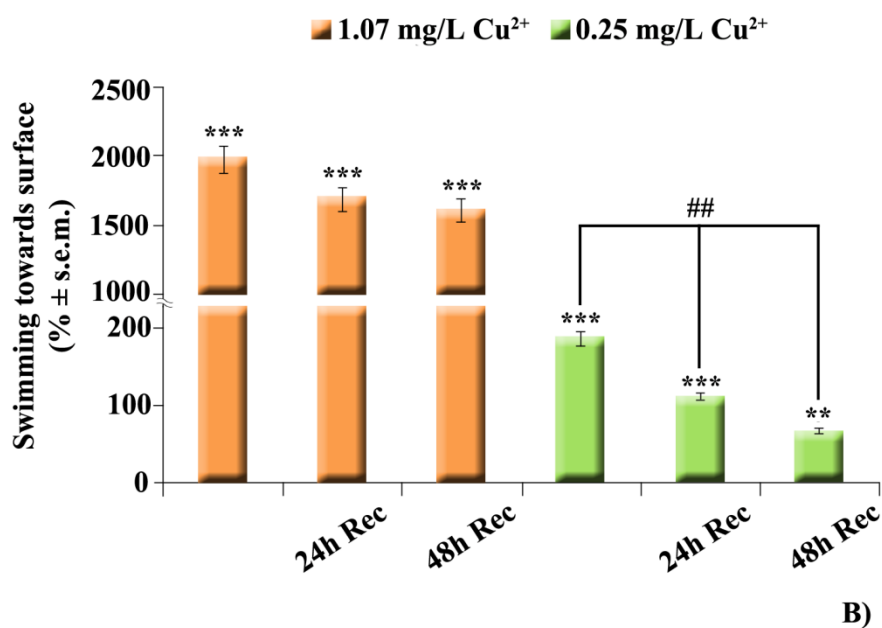


Fig. IV.22 Valutazione del recupero delle alterazioni comportamentali indotte dal CuCl₂. I dati sono riportati come variazione percentuale (%) rispetto ai ctrl (*) dello *swimming towards surface* in esemplari di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) trasferiti, dopo 48h di trattamento, in acqua priva di contaminante per un periodo massimo di 48h. I dati relativi alla fase di recupero sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al solo trattamento di 48h con alta (§;1.45 mg/L e 1.07 mg/L) e bassa (#;0.30 mg/L e 0.25 mg/L) concentrazione di metallo. L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali attraverso una telecamera e le immagini sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: two-way ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; §§§ $p < 0.001$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

Per quanto riguarda gli *abnormal motor behaviors*, che in *Carassius carassius* erano stati riscontrati solo durante l'esposizione alla alta concentrazione di CuCl₂, questi atteggiamenti sembravano aumentare ulteriormente durante il primo giorno in acqua priva di contaminante (Fig. IV.23A). Tuttavia, entro le 48h un simile effetto veniva completamente annullato.

In questa fase, soprattutto in *Thalassoma pavo*, è stato interessante verificare se gli *abnormal motor behaviors* che avevano caratterizzato il periodo di trattamento con la più alta concentrazione di contaminante potessero essere aboliti, o per lo meno attenuati, durante il periodo in acqua priva di Cu²⁺. Infatti, durante il recupero sin dalle prime 24h è stata registrata una moderata riduzione di tali atteggiamenti rispetto al trattamento precedente (Fig. IV.23B). Questa riduzione sembra però solo attenuare l'induzione di *abnormal motor behaviors* che risultavano ancora incrementati al termine di questa fase in modo molto elevato rispetto ai ctrl. Un graduale e completo recupero di questi atteggiamenti è stato rinvenuto nel caso dei pesci esposti alla più bassa dose di metallo.

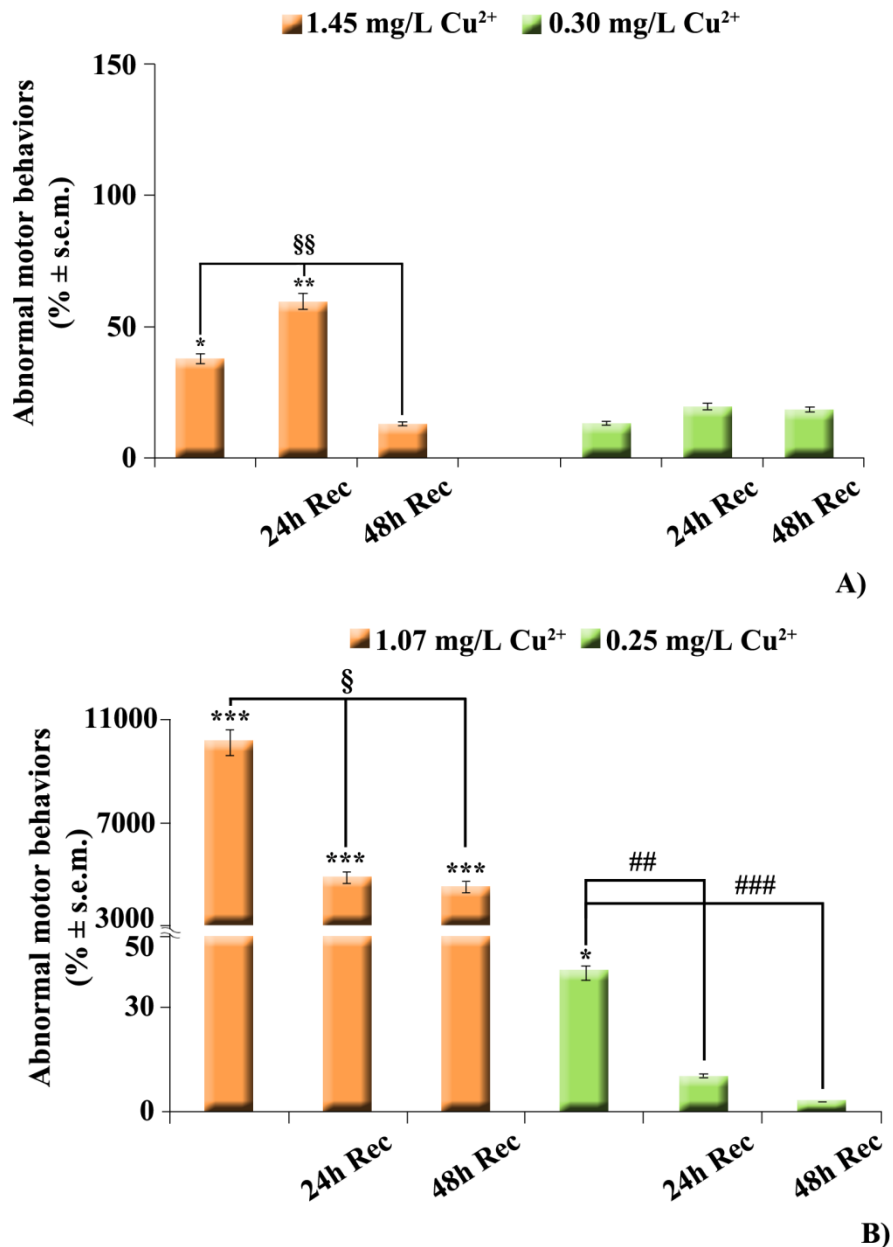


Fig. IV.23 Valutazione del recupero delle alterazioni comportamentali indotte dal CuCl₂. I dati sono riportati come variazione percentuale (%) rispetto ai ctrl (*) degli *abnormal motor behaviors* in esemplari di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) trasferiti, dopo 48h di trattamento, in acqua priva di contaminante per un periodo massimo di 48h. I dati relativi alla fase di recupero sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al solo trattamento di 48h con alta (§; 1.45 mg/L e 1.07 mg/L) e bassa (#; 0.30 mg/L e 0.25 mg/L) concentrazione di metallo. L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali attraverso una telecamera e le immagini sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: two-way ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; §§§ $p < 0.001$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

IV.3.2 Valutazione del recupero dai danni neuronali

L'analisi neurodegenerativa, tramite ACS, è stata svolta anche dopo il periodo di permanenza in acqua priva di CuCl_2 , successivo all'esposizione al metallo. La valutazione del recupero dei danni provocati in specifici distretti neuronali ha consentito di comprenderne meglio l'entità oltre che capire fino a che punto l'alterazione fosse recuperabile in un breve lasso di tempo (48h) esattamente corrispondente al periodo di trattamento. Pertanto, sia i teleostei marini che quelli d'acqua dolce, ciascuno esposto a due differenti concentrazioni di metallo, sono stati sottoposti a test di recupero e sacrificati allo scadere delle 48h di mantenimento in acqua priva di contaminante. I risultati dell'ACS, ottenuti dopo tale test, sono stati confrontati con quelli ottenuti dopo il trattamento.

In entrambi i teleostei le più evidenti variazioni, rispetto ai trattati, sono state riscontrate a livello telencefalico che tra l'altro rappresenta l'area più colpita da eventi degenerativi durante trattamento di 48h con CuCl_2 . Nello specifico, in *Carassius carassius*, i segni più pronunciati di processi neurodegenerativi erano stati osservati in DL, a seguito del trattamento con la più alta concentrazione di metallo (Fig. IV.24A), se paragonati a quelli provocati dalla concentrazione più bassa (Fig. IV.24B). Il periodo di recupero dall'alta concentrazione non ha fatto osservare riduzioni sostanziali nella presenza di neuroni degenerati (Fig. IV.24A'). Al contrario, solo rare cellule morte sono state visualizzate dopo le 48h di mantenimento in acqua senza Cu^{2+} successivo all'esposizione alla bassa concentrazione (Fig. IV.24B') garantendo così un recupero pressoché completo del danno neuronale.

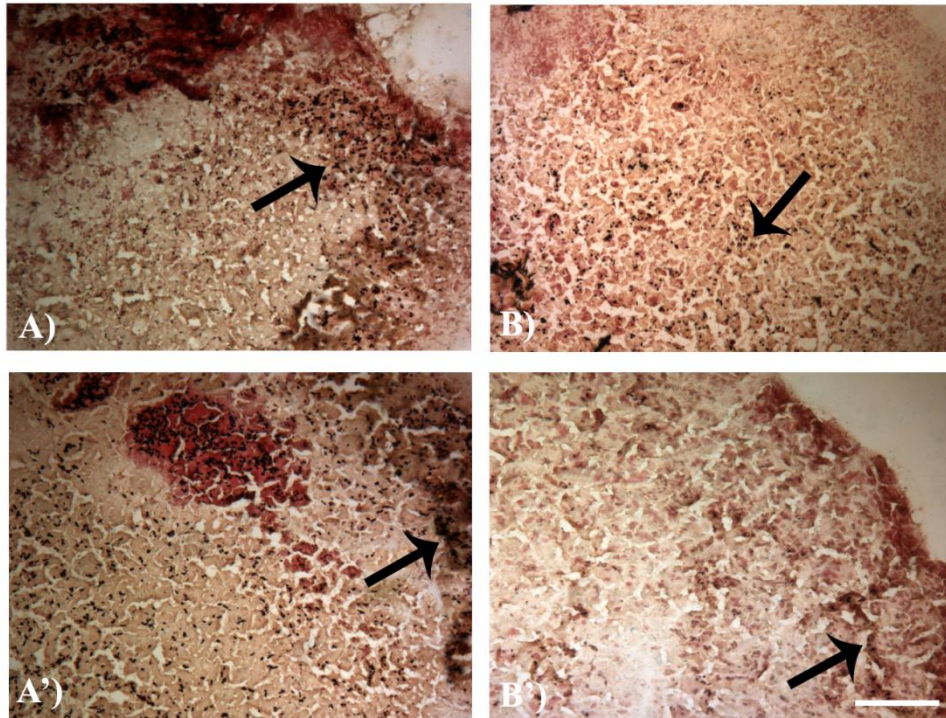


Fig. IV.24 Sezioni encefaliche rappresentative di DI osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS in esemplari di *Carassius carassius* trattati con le concentrazioni 1.45 mg/L (A) e 0.30 mg/L (B) di CuCl_2 e sottoposti a 48 h di recupero rispettivamente (A') e (B'). Scale bar: 80 μm .

In *Thalassoma pavo*, in modo analogo al teleosteo d'acqua dolce, il nucleo DI aveva riportato chiari segni di neurodegenerazione, più evidenti dopo esposizione alla più alta concentrazione di metallo (Fig. IV.25A) che non alla più bassa concentrazione testata (Fig. IV.25B). Dopo la fase di recupero i pesci, prima trattati con l'alta concentrazione, non hanno riportato in questa stessa area cambiamenti evidenti nella reazione argirofilica, rispetto a quella ottenuta dopo il solo trattamento (Fig. IV.25A'). Nel caso dei pesci precedentemente esposti alla più bassa concentrazione di CuCl_2 si è potuto osservare, rispetto alla neurodegenerazione riportata dopo le 48h di esposizione (Fig. IV.25B), una chiara e marcata riduzione del danno, seppure un modesto numero di elementi neuronali degenerati sia rimasto ancora visibile (Fig. IV.25B').

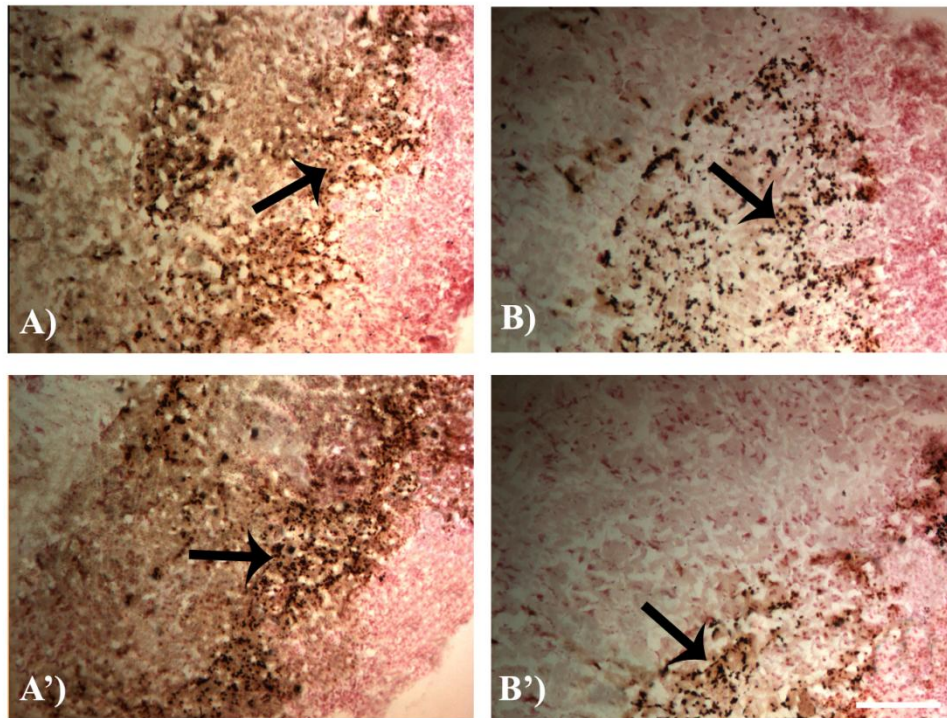


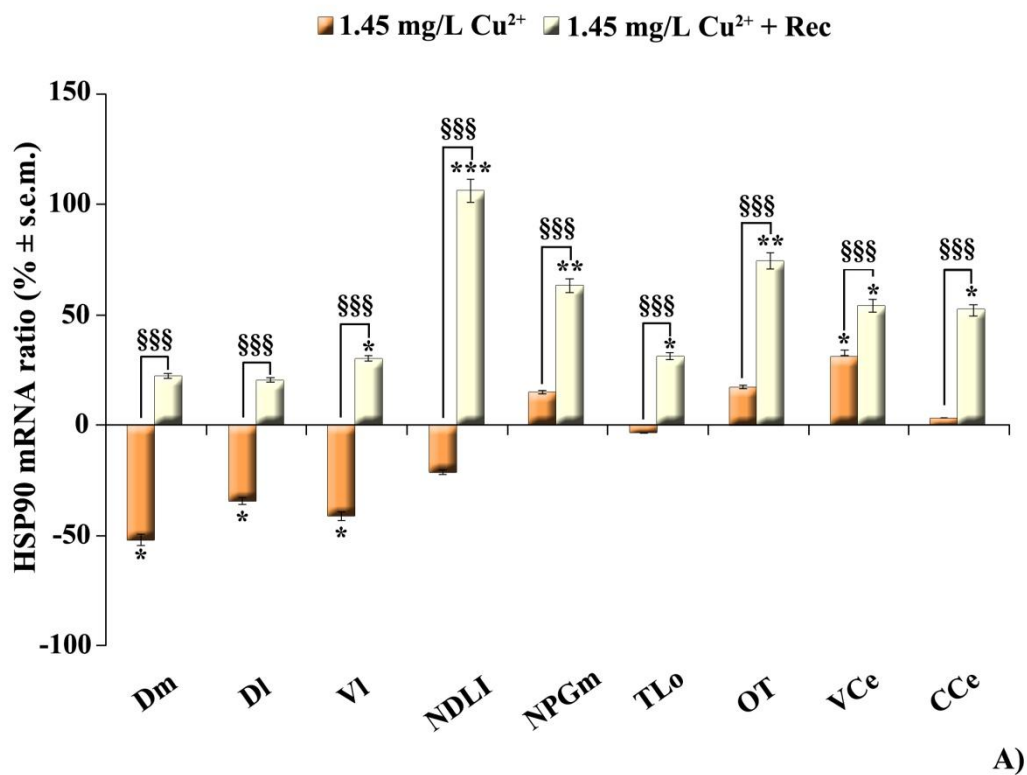
Fig. IV.25 Sezioni encefaliche rappresentative di DI osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS in esemplari di *Thalassoma pavo* trattati con le concentrazioni 1.07 mg/L (A) e 0.25 mg/L (B) di CuCl_2 e sottoposti a 48h di recupero rispettivamente (A') e (B'). Scale bar: 80 μm .

IV.3.3 Risposta trascrizionale in seguito a recupero

La valutazione dell'espressione dell'HSP90, a seguito del test di recupero, è risultata molto utile alla comprensione dell'implicazione di questo *chaperon* nei processi di riparazione dei danni indotti dal metallo e nella riattivazione di quelle funzioni, controllate a livello centrale, inibite o comunque alterate durante il periodo di esposizione. Pertanto, al termine dell'intero periodo di recupero (48h), successivo sia al trattamento con la concentrazione più alta che più bassa di CuCl_2 , è stata analizzata l'espressione dell'HSP90 tramite ISH confrontando i livelli trascrizionali rilevati, sia rispetto ai ctrl che rispetto al precedente periodo di trattamento.

In *Carassius carassius* dopo il periodo di permanenza in acqua senza metallo, successivo all'esposizione a 1.45 mg/L di CuCl_2 , è stata osservata un'*up-regulation* generalizzata del trascritto per l'HSP90. La moderata diminuzione riscontrata nelle aree telencefaliche Dm, DI e VI, dopo le 48h di esposizione al contaminante, viene completamente invertita dal trasferimento in acqua senza Cu^{2+} facendo registrare addirittura un incremento dell'espressione, rispetto ai ctrl, in VI (+30%) (Fig. IV.26A).

Degna di nota è l'*up-regulation* molto elevata rinvenuta in NDLI (+106%) ed elevata in NPGm (+63%) e in OT (+74%). Incrementi moderati della trascrizione dell'HSP90 rispetto ai ctrl caratterizzavano, invece, TLo (+31%), VCe (+54%) e CCe (+50%). Al contrario, i teleostei d'acqua dolce, esposti alla più bassa concentrazione di metallo, dopo recupero non hanno mostrato variazioni significative dei livelli trascrizionali rispetto ai ctrl e, nel caso di NPGm, che era stato l'unico sito encefalico in cui al termine dell'esposizione avevamo registrato una moderata *up-regulation*, si è verificato un ritorno dei livelli di trascritto verso valori normali (Fig. IV.26B).



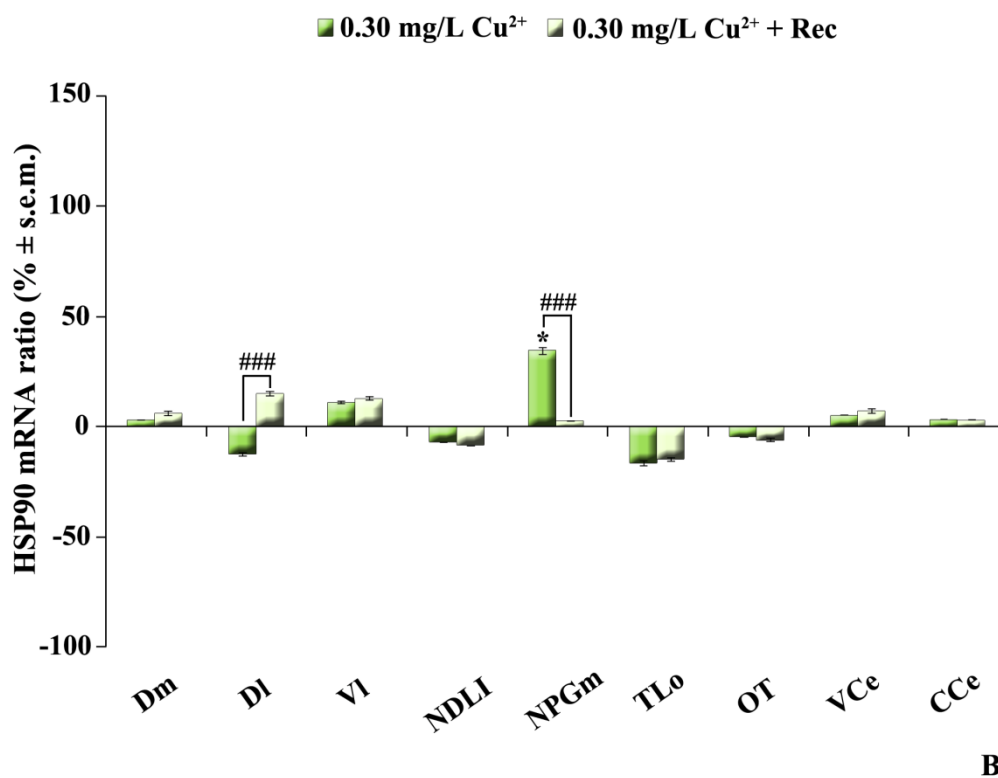
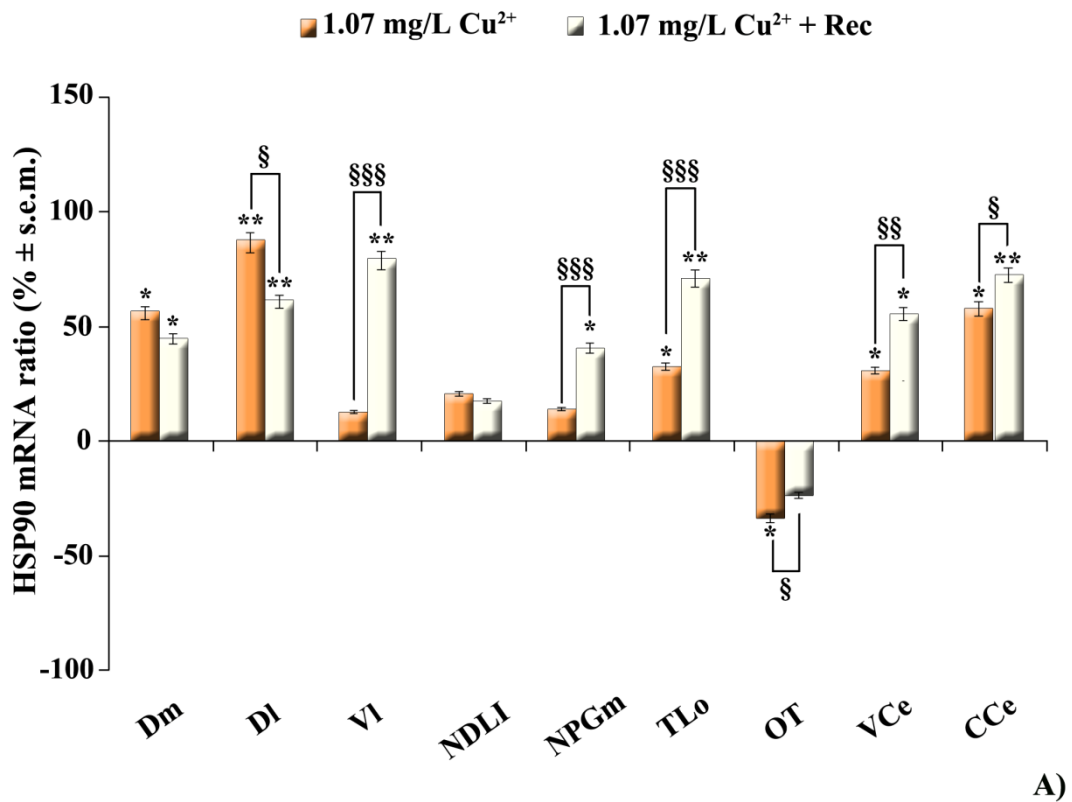


Fig. IV.26 Risposta trascrizionale nell'encefalo di esemplari di *Carassius carassius*, sottoposti a recupero dopo trattamento con la concentrazione 1.45 mg/L (A) e 0.30 mg/L (B) di CuCl₂. Le variazioni di espressione dell'mRNA per l'HSP90 sono state riportate come percentuale (%), dopo il solo trattamento o dopo 48h in acqua priva di metallo, rispetto ai ctrl (*) o rispetto ai trattati con 1.45 mg/L (§) o 0.30 mg/L (#) di CuCl₂. Analisi statistica: two way ANOVA seguito dal Newman-Keul's test quando p<0.05; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; §p<0.05, §§ p<0.01, §§§ p<0.001; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001. Abbreviazioni: CCe= corpo del cervelletto; DI= nucleo laterale del telencefalo dorsale; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NPGm= nucleo pregglomeruloso mediale; OT: tetto ottico; TLo= tori longitudinali; VCe: valvola del cervelletto; VI= nucleo laterale del telencefalo ventrale.

Negli esemplari di *Thalassoma pavo*, prima esposti alla concentrazione di 1.07 mg/L di CuCl₂, anche quei nuclei encefalici che non avevano mostrato alcuna alterazione significativa dei livelli di trascritto, dopo il trattamento al termine del periodo in acqua priva di metallo rispondevano con l'*up-regulation* dell'HSP90, come nel caso di VI (+79%) e NPGm (+40%), per i quali è stato registrato, rispettivamente, un elevato e moderato incremento del trascritto rispetto ai ctrl (Fig. IV.27A). In altri siti encefalici l'incremento trascrizionale, causato dal trattamento, risultava addirittura potenziato dopo la fase di recupero. E' questo il caso di TLo (+119%) e delle aree cerebellari VCe (+83%) e CCe (+30%) nelle quali sono stati riscontrati aumenti della quantità di mRNA rispettivamente molto elevati, elevati e moderati se confrontati al precedente periodo di esposizione. La moderata *down-regulation*, osservata in OT dopo l'esposizione al Cu²⁺, viene invece moderatamente ridotta fino a non risultare più significativa rispetto ai ctrl.

Per quanto riguarda i pesci esposti alla più bassa concentrazione di metallo il periodo di recupero ha fatto osservare, una sostanziale attenuazione dell'effetto trascrizionale precedentemente osservato, che nel caso di Dm e DI ha causato un ritorno dei livelli di espressione verso valori prossimi a quelli dei ctrl (Fig. IV.27B). Solo a livello di CCe (+52%), è stata riportata in questi stessi teleostei una moderata *up-regulation* del trascritto per l'HSP90.



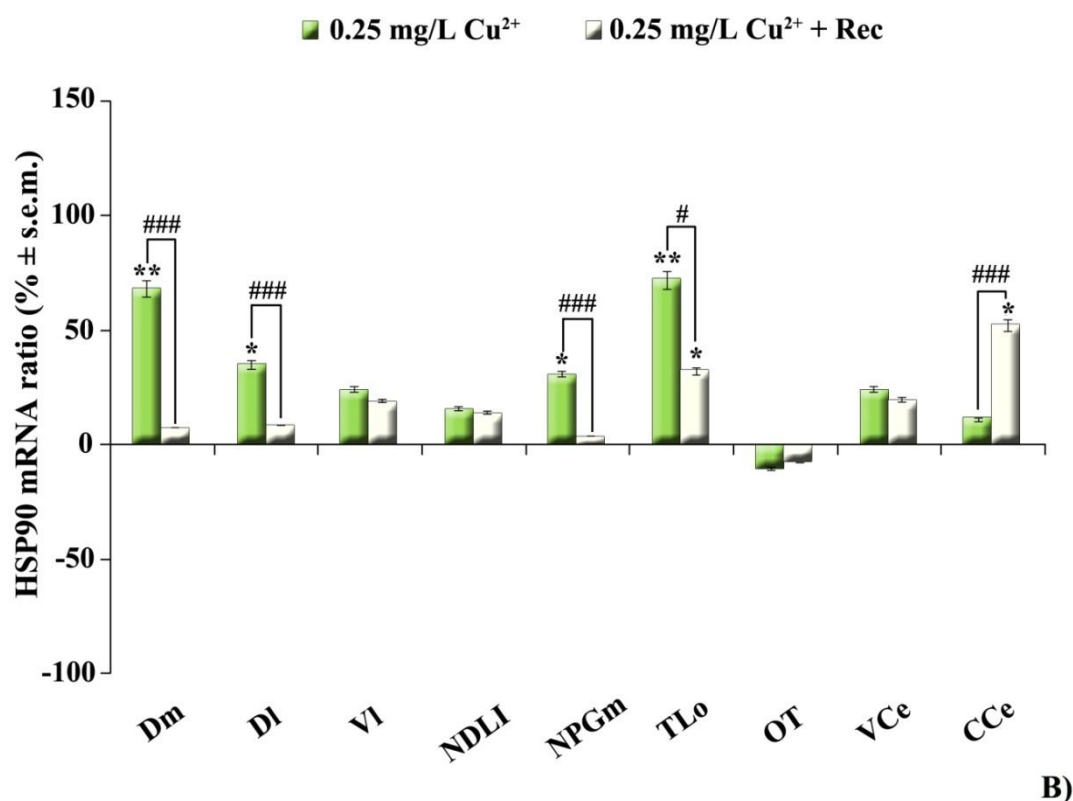


Fig. IV.27 Risposta trascrizionale nell'encefalo di esemplari di *Thalassoma pavo* sottoposti a recupero dopo trattamento con la concentrazione 1.07 mg/L (A) e 0.25 mg/L (B) di CuCl₂. Le variazioni di espressione dell'mRNA per l'HSP90 sono state riportate come percentuale (%) dopo il solo trattamento o dopo 48h in acqua priva di metallo, rispetto ai ctrl (*) o rispetto ai trattati con 1.07 mg/L (§) o 0.25 mg/L (#) di CuCl₂. Analisi statistica: two way ANOVA seguito dal Newman-Keul's test quando p<0.05; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; §p<0.05, §§ p<0.01, §§§ p<0.001; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001. Abbreviazioni: CCe= corpo del cervelletto; Dl= nucleo laterale del telencefalo dorsale; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT: tetto ottico; TLo= tori longitudinali; VCe: valvola del cervelletto; VI= nucleo laterale del telencefalo ventrale.

IV.4 Esposizione cronica al CuCl₂

Dopo aver stabilito gli effetti a breve termine del Cu²⁺, lo studio è proseguito con la valutazione delle alterazioni comportamentali e neuronali indotte da un'esposizione cronica al suddetto contaminante. In particolare, entrambi i teleostei sono stati esposti per 21d alla concentrazione più bassa di CuCl₂ utilizzata nei trattamenti di 48h.

IV.4.1 Alterazioni comportamentali

I risultati relativi all'analisi comportamentale condotta durante l'esposizione cronica al metallo sono stati riportati ad 1d, 7d, 14d e 21d di trattamento.

Nel pesce d'acqua dolce il *feeding* subiva una drastica diminuzione (-76%), rispetto ai ctrl, a partire dal 7d, diminuzione che permaneva pressoché invariata fino al termine del trattamento (Fig. IV.28A). In *Thalassoma pavo* fino al 7d di esposizione è stata osservata solo una moderata riduzione del *feeding* che risultava elevata, se paragonata ai ctrl, a partire dal 14d divenendo molto elevata al 21d (Fig. IV.28B).

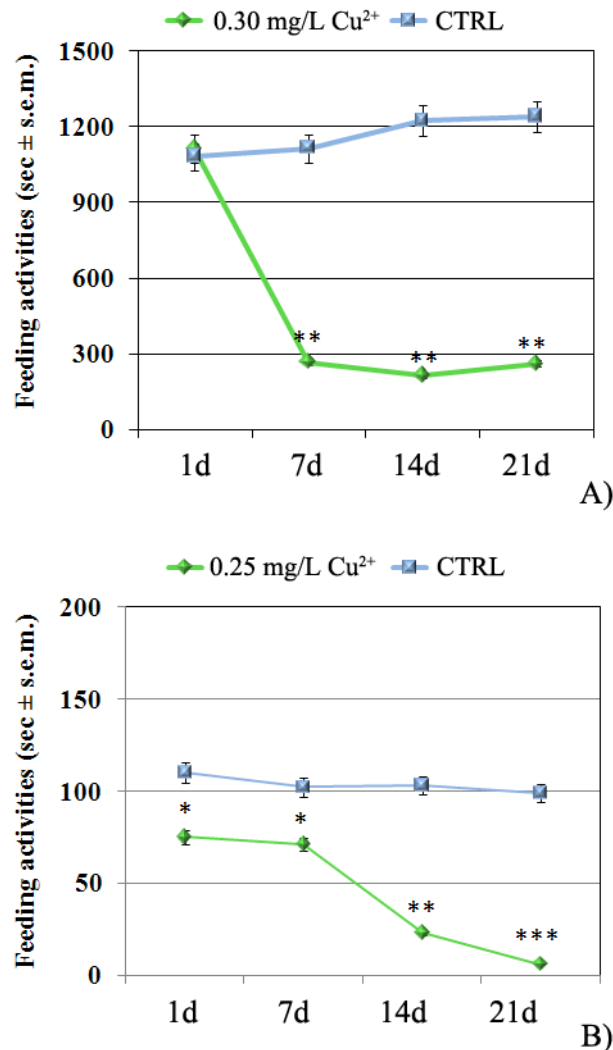


Fig. IV.28 Effetti del trattamento cronico con CuCl_2 sul *feeding*. I dati sono riportati come tempo (sec ± s.e.m.) trascorso nel *feeding* da esemplari di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) a 1d, 7d, 14d e 21d di trattamento con le relative concentrazioni di CuCl_2 (0.30 mg/L e 0.25 mg/L) rispetto ai ctrl (*). L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali con una telecamera e le immagini acquisite sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Per ciò che concerne l'attività di *swimming*, un moderato incremento del tempo trascorso in questa attività è stato riportato, rispetto ai ctrl, in *Carassius carassius* sin dal

7d di trattamento (Fig. IV.29A). Situazione opposta è stata osservata, invece, in *Thalassoma pavo*, in cui la moderata diminuzione registrata al 1d di esposizione veniva ulteriormente accentuata al 7d divenendo elevata e rimanendo tale fino al 21d (Fig. IV.29B).

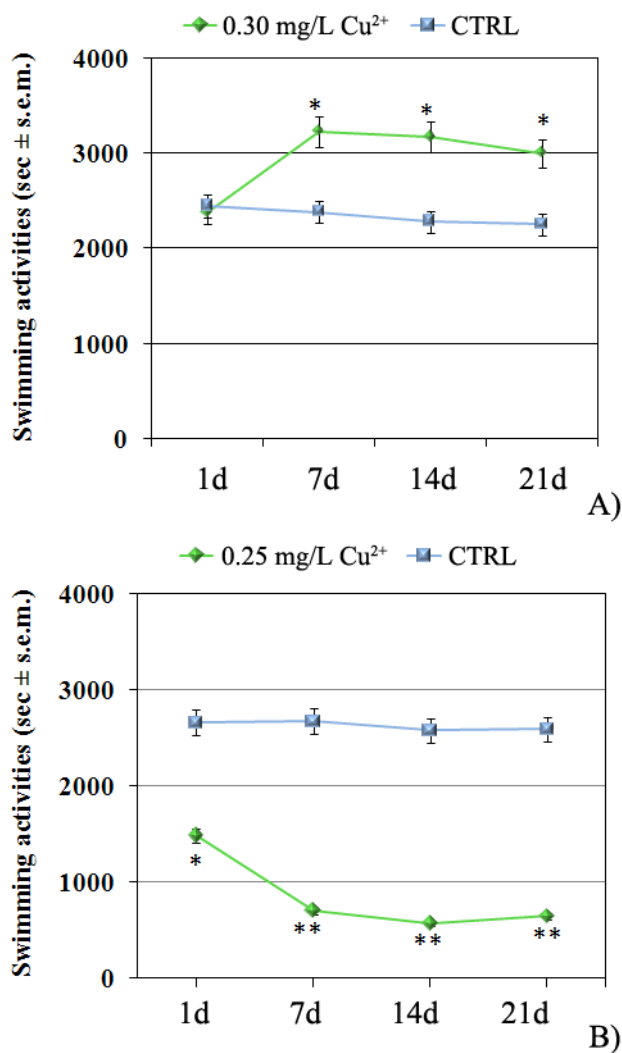


Fig. IV.29 Effetti del trattamento cronico con CuCl_2 sullo *swimming*. I dati sono riportati come tempo (sec \pm s.e.m.) trascorso nello *swimming* da esemplari di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) a 1d, 7d, 14d e 21d di trattamento con le relative concentrazioni di CuCl_2 (0.30 mg/L e 0.25 mg/L) rispetto ai ctrl (*). L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali con una telecamera e le immagini acquisite sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Nel teleosteo d'acqua dolce, il *resting state*, che risultava moderatamente incrementato rispetto ai ctrl al 1d d'esposizione, tendeva invece a ridursi in maniera significativa al 7d e al 14d, per poi tornare a valori paragonabili ai ctrl al 21d di trattamento (Fig. IV.30A).

In *Thalassoma pavo*, parallelamente allo *swimming*, anche lo stato di *rest* risultava alterato rispetto ai ctrl. Tuttavia, è stato notato che l'incremento di questa attività comportamentale già rinvenuto al 1d di esposizione non andava incontro a sostanziali modifiche fino al termine del trattamento, rimanendo molto elevato rispetto ai ctrl anche al 21d (Fig. IV.30B).

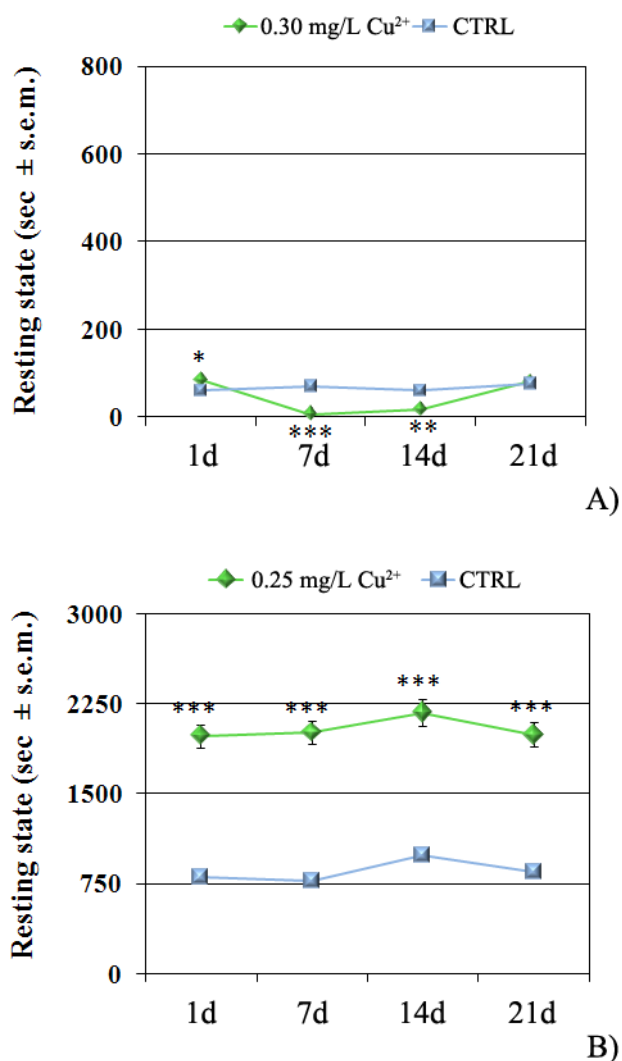


Fig. IV.30 Effetti del trattamento cronico con CuCl₂ sul *resting state*. I dati sono riportati come tempo (sec ± s.e.m.) trascorso nel *resting state* da esemplari di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) a 1d, 7d, 14d e 21d di trattamento con le relative concentrazioni di CuCl₂ (0.30 mg/L e 0.25 mg/L) rispetto ai ctrl (*). L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali con una telecamera e le immagini acquisite sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando p<0.05. *p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001.

In *Carassius carassius* la categoria *swimming towards surface* non ha mostrato alcuna variazione significativa al 1d di esposizione, mentre un aumento molto elevato, rispetto ai

ctrl, è stato osservato al 7d, mantenendosi tale fino al termine del trattamento (Fig.IV.31A). In realtà, come mostrato in precedenza, già durante i trattamenti a breve termine, questa stessa concentrazione aveva fatto registrare al 2d (48h) di esposizione un drastico incremento del tempo trascorso dai pesci in movimenti verso la superficie dell'acqua.

In *Thalassoma pavo* durante l'esposizione cronica lo *swimming towards surface* ha subito un graduale incremento (Fig. IV.31B). Infatti questa attività, che risultava incrementata in maniera molto significativa rispetto ai ctrl già al 1d di esposizione, ha fatto registrare un incremento ulteriore al 7d, a partire dal quale questo comportamento sembra mostrare addirittura la tendenza ad un progressivo aumento.

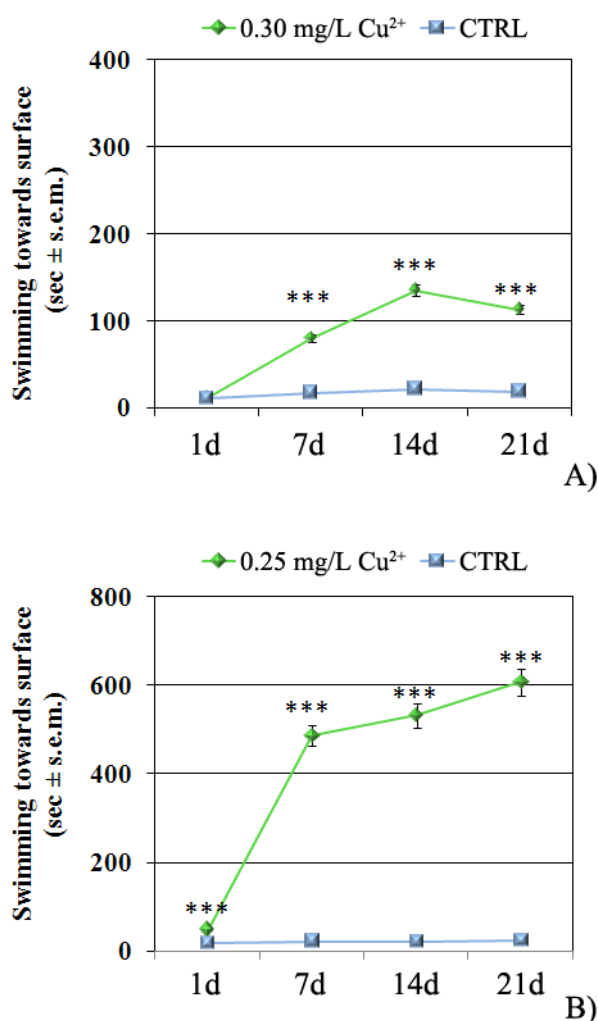


Fig. IV.31 Effetti del trattamento cronico con CuCl_2 sullo *swimming towards surface*. I dati sono riportati come tempo (sec \pm s.e.m.) trascorso nello *swimming towards surface* da esemplari di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) a 1d, 7d, 14d e 21d di trattamento con le relative concentrazioni di CuCl_2 (0.30 mg/L e 0.25 mg/L) rispetto ai ctrl (*). L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali con una telecamera e le immagini acquisite sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Gli *abnormal motor behaviors* nel caso di *Carassius carassius* compaiono esclusivamente a partire dal 14d di trattamento, durante il quale risultavano incrementati in modo elevato rispetto ai ctrl. Dopo il 14d un simile effetto sembrava accentuarsi ulteriormente fino al 21d quando l'alterazione diveniva molto elevata se paragonata ai ctrl (Fig. IV.32A). Nel caso di *Thalassoma pavo* l'insorgenza di simili atteggiamenti si verificava solo dopo il 1d d'esposizione (Fig. IV.32B). Difatti, durante i trattamenti di 48h era stato già dimostrato come con tale concentrazione questi atteggiamenti si registravano solo alle 48h, quando era possibile rinvenire un incremento moderatamente significativo rispetto ai ctrl. Durante l'esposizione cronica i comportamenti anomali si sono tuttavia manifestati in modo più evidente. Difatti, a partire dal 7d è stato rilevato un aumento molto significativo rispetto ai ctrl che si è mantenuto tale fino al 21d.

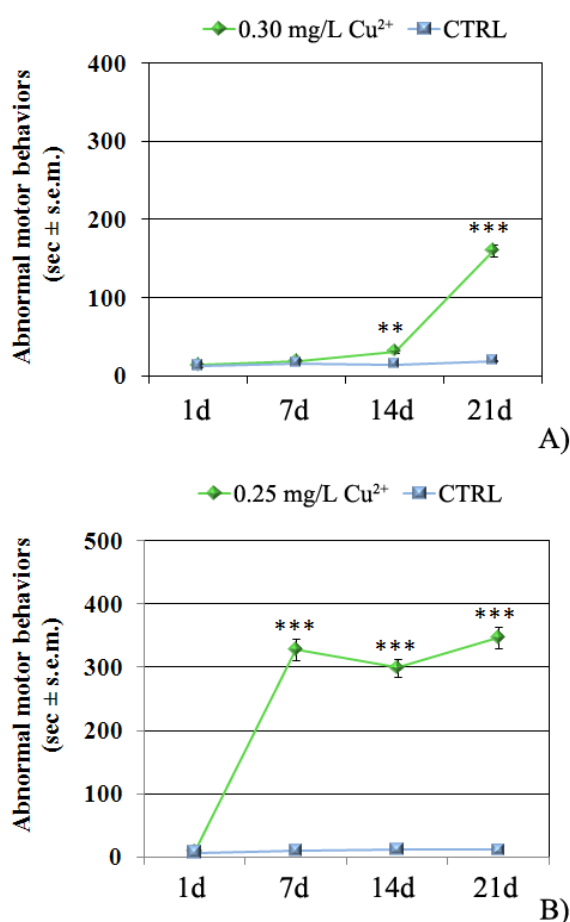


Fig. IV.32 Effetti del trattamento cronico con CuCl₂ sugli *abnormal motor behaviors*. I dati sono riportati come tempo (sec ± s.e.m.) trascorso negli *abnormal motor behaviors* da esemplari di *Carassius carassius* (A) e *Thalassoma pavo* (B) a 1d, 7d, 14d e 21d di trattamento con le relative concentrazioni di CuCl₂ (0.30 mg/L e 0.25 mg/L) rispetto ai ctrl (*). L'analisi comportamentale è stata effettuata monitorando gli animali con una telecamera e le immagini acquisite sono state elaborate con Etholog 2.2.5. Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando p < 0.05. *p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001.

IV.4.2 Effetti neurodegenerativi del trattamento cronico

Accanto all'analisi comportamentale, è stato interessante verificare l'entità dei danni neuronali indotti dal CuCl_2 dopo 21d di esposizione alla più bassa concentrazione, già utilizzata per stabilire gli effetti a breve termine di questo metallo su *Thalassoma pavo* e su *Carassius carassius*. Tale concentrazione, come mostrato in precedenza, aveva causato dopo 48h di esposizione solo una lieve neurodegenerazione confinata a pochi siti encefalici in entrambi i teleostei. L'esposizione cronica al CuCl_2 ha determinato in *Carassius carassius* eventi neurodegenerativi più estesi riguardanti differenti aree encefaliche. L'area telencefalica Dm è risultata interessata da morte neuronale sebbene sia stato riscontrato solo un modesto numero di cellule degenerate (Fig. IV.33A). Molto più evidente è risultata invece la neurodegenerazione riportata in DI e sicuramente di maggiore entità rispetto a quella osservata dopo 48h di trattamento alla stessa concentrazione (Fig. IV.33B). Anche a livello diencefalico sono stati riscontrati segni pronunciati di danni neuronali. In NDLI, in particolare, la reazione argirofilica è apparsa ben evidente (Fig. IV.33C). Per quanto riguarda l'OT invece è stato possibile rinvenire una modesta neurodegenerazione che interessava tutti gli strati cellulari (Fig. IV.33D). Durante la valutazione degli effetti del metallo a breve termine è importante ricordare che questa medesima concentrazione aveva indotto in tale area encefalica la comparsa di rare cellule degenerate.

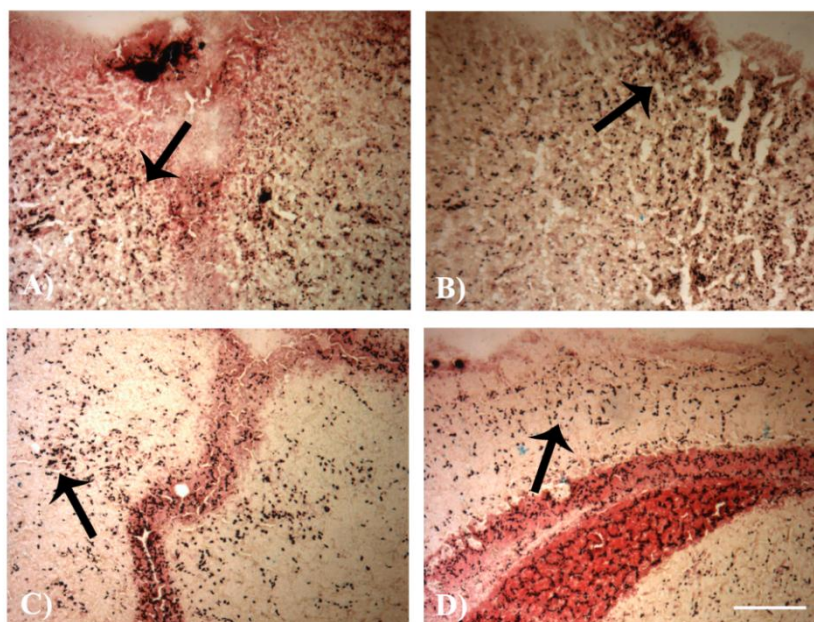


Fig. IV.33 Sezioni encefaliche rappresentative delle aree Dm (A), DI (B), NDLI (C) e OT (D) osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS in esemplari di *Carassius carassius* dopo trattamento cronico di 21d con la concentrazione 0.30 mg/L di CuCl_2 . Scale bar: 80 μm .

Dopo trattamento cronico anche in *Thalassoma pavo* è stato possibile riscontrare una vasta reazione argirofilica che andava ad interessare diversi campi neuronali. In particolare, a livello telencefalico la neurodegenerazione coinvolgeva quasi tutti i nuclei e non era più limitata al solo DI. Difatti, anche nel Dm è stato rinvenuto un modesto numero di elementi neuronali degenerati (Fig. IV.34A). Nel caso di DI, già colpito da danno neuronale dopo sole 48h di trattamento, a 21d è stata osservata una più evidente ed estesa neurodegenerazione (Fig. IV.34B). Anche a livello diencefalico vari nuclei mostravano, al termine dell'esposizione cronica al contaminante, chiari segni di processi degenerativi. Nello specifico, in NDLI è stata riscontrata una pronunciata reazione argirofilica che evidenziava una cospicua presenza di neuroni andati incontro a morte cellulare, molto più numerosi rispetto a quelli rinvenuti in questo stesso nucleo in *Carassius carassius* (Fig. IV.34C). A livello mesencefalico, nell'OT, i danni mediati dal Cu^{2+} dopo 21d, seppure evidenti, sono apparsi meno pronunciati rispetto a quelli indotti in altri siti encefalici (Fig. IV.34D).

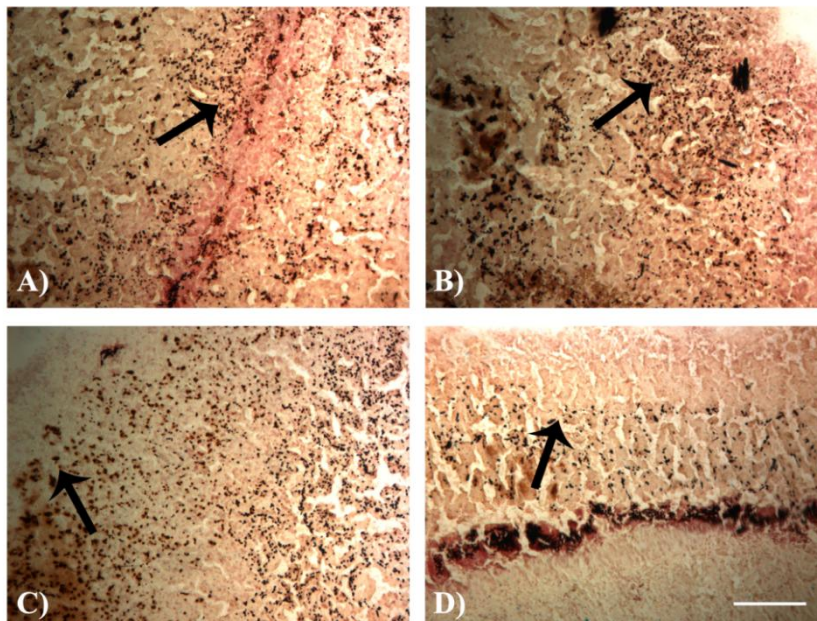


Fig. IV.34 Sezioni encefaliche rappresentative delle aree Dm (A), DI (B), NDLI (C) e OT (D) osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS in esemplari di *Thalassoma pavo* dopo trattamento cronico di 21d con la concentrazione 0.25 mg/L di CuCl_2 . Scale bar: 80 μm .

IV.4.3 Effetti trascrizionali del trattamento cronico

A questo punto è stata valutata l'influenza dell'esposizione cronica sulla trascrizione dell'HSP90 sottoponendo ad ISH le sezioni encefaliche di esemplari di *Thalassoma pavo* e *Carassius carassius* sacrificati al termine dell'intero periodo di trattamento (21d).

Nel caso di *Carassius carassius* l'esposizione cronica ha prodotto effetti trascrizionali sito-specifici. Infatti, mentre a livello telencefalico, in Dm (-30%) e in VI (-36%), e a livello diencefalico in NDLI (-55%), è stata osservata una moderata diminuzione della trascrizione di HSP90 rispetto ai ctrl (Fig. IV.35), una moderata *up-regulation* caratterizzata invece TLo (+30%) VCe (+43%) e CCe (+52%). Gli altri nuclei encefalici considerati non hanno subito alcuna variazione significativa dei loro livelli trascrizionali.

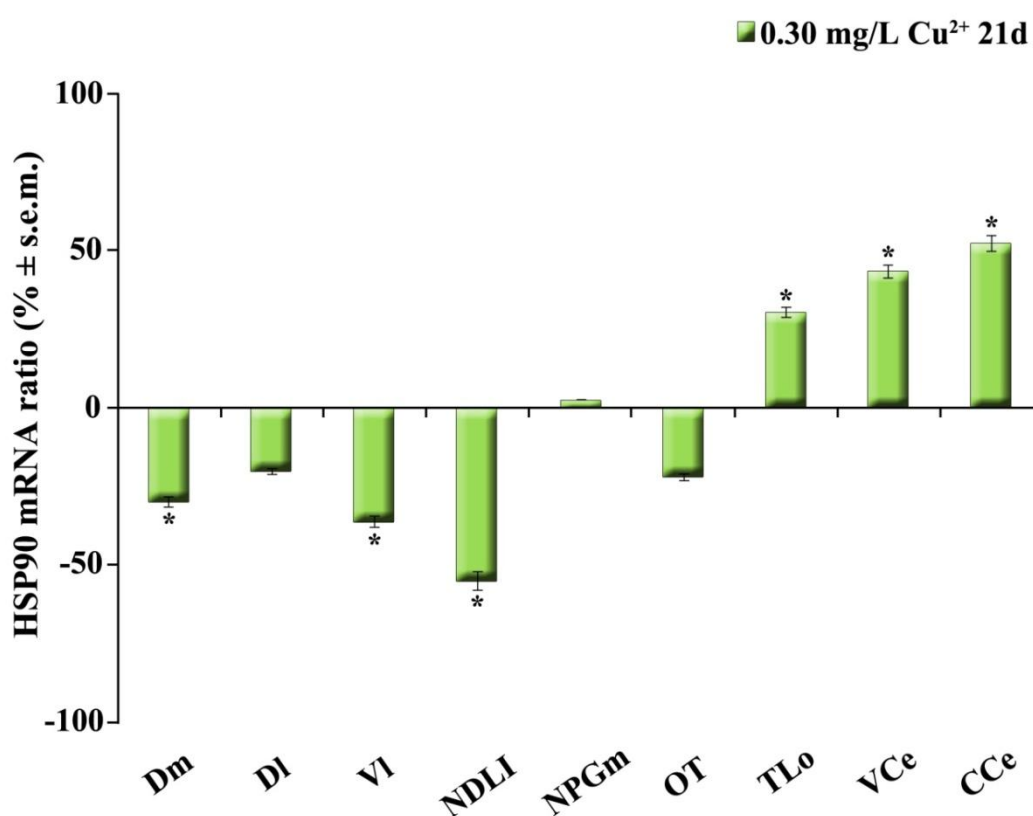


Fig. IV.35 Espressione dell'HSP90 nelle diverse aree encefaliche di *Carassius carassius* dopo 21d di esposizione al CuCl₂. I dati sono riportati come variazione (%) dei livelli di trascritto dell'HSP90 dei pesci trattati rispetto ai ctrl (*). Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$. Abbreviazioni: CCe: corpo del cervelletto; DI= nucleo laterale del telencefalo dorsale; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT= tetto ottico; TLo: tori longitudinali; VCe= valvola del cervelletto VI= nucleo laterale del telencefalo ventrale.

Decisamente differente è stato l'effetto sortito dall'esposizione cronica al contaminante sulla trascrizione dell'HSP90 nel sistema nervoso di *Thalassoma pavo*. Infatti, dopo i 21d di esposizione a 0.25 mg/L di CuCl₂ è stato possibile apprezzare un'*up-regulation* generalizzata del trascritto dell'HSP90 rispetto ai ctrl. In particolare, a livello telencefalico è stato riportato un incremento dei livelli di mRNA, moderato in Dm (+54%) e VI (+42%) ed elevato in DI (+72%; Fig. IV.36). Una moderata *up-regulation* è stata anche osservata a livello ipotalamico, in NDLI (+42%), e a livello cerebellare in VCe (+47%) e CCe (+54%). Elevati livelli di espressione hanno caratterizzato, inoltre, il nucleo diencefalico NPGm (+87%), mentre un innalzamento molto elevato dei livelli di trascritto è stato registrato in TLo (+108%). Dopo questo trattamento l'OT non ha mostrato, invece, alcuna variazione significativa dell'espressione dell'HSP90.

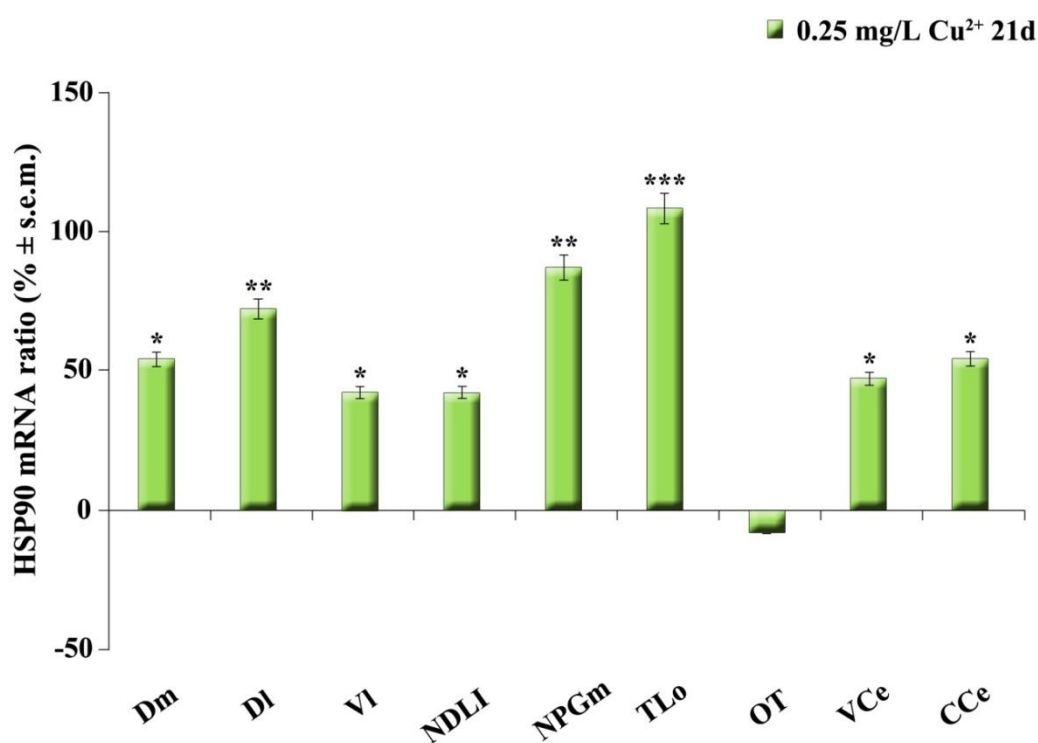


Fig. IV.36 Espressione dell'HSP90 nelle diverse aree encefaliche di *Thalassoma pavo* dopo 21d di esposizione al CuCl₂. I dati sono riportati come variazione (%) dei livelli di trascritto dell'HSP90 dei pesci trattati rispetto ai ctrl (*). Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Abbreviazioni: CCe: corpo del cervelletto; DI= nucleo laterale del telencefalo dorsale; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT= tetto ottico; TLo: tori longitudinali; VCe= valvola del cervelletto VI= nucleo laterale del telencefalo ventrale.

IV.5 Effetti dell'ORX-A dopo esposizione cronica al CuCl₂

Dopo aver valutato gli effetti neuro-comportamentali indotti dall'esposizione cronica dei due teleostei al contaminante, lo studio è stato completato valutando l'effetto dell'ORX-A in risposta allo stress cronico indotto dal metallo. A tal fine gli animali sono stati sottoposti ad una singola iniezione di neuropeptide al 21d di esposizione al CuCl₂. I risultati derivanti da questo co-trattamento sono stati confrontati con quelli ottenuti dopo la sola esposizione cronica al CuCl₂.

IV.5.1 Effetti dell'ORX-A sul comportamento

In *Carassius carassius* la somministrazione di ORX-A non ha prodotto variazioni significative del *feeding* rispetto ai trattati con il solo metallo. Infatti, l'elevata riduzione di tale attività osservata al 21d nei pesci esposti al Cu²⁺ non ha subito variazioni durante la contemporanea iniezione di ORX-A (Fig. IV.37A). Per quanto riguarda lo *swimming* il neuropeptide ha promosso una moderata riduzione dell'incremento indotto dal CuCl₂ facendo sì che non fosse registrata alcuna variazione significativa di questo comportamento rispetto ai ctrl (Fig. IV.37B). Situazione differente è stata quella osservata nel caso del *resting state*. Infatti, l'ORX-A ha prodotto un incremento considerevole di tale atteggiamento, sia rispetto ai ctrl che rispetto al trattamento con il solo metallo (Fig. IV.37C). La categoria *swimming towards surface*, grazie alla somministrazione del neuropeptide, ha subito un'attenuazione dell'effetto mediato dall'esposizione cronica al contaminante (Fig. IV.37D). Infatti, durante il co-trattamento Cu²⁺+ORX-A i pesci hanno mostrato un'elevata riduzione di tale attività rispetto agli esposti al solo Cu²⁺ che però non ha spazzato totalmente l'effetto del metallo. Anche nel caso degli *abnormal motor behaviors* è stata osservata un'attenuazione ORX-A-dipendente dell'alterazione indotta dal solo metallo (Fig. IV.37E). In particolare, l'ORX-A è stata capace di promuovere una moderata riduzione degli *abnormal motor behaviors* causati dall'esposizione cronica al CuCl₂. Ciononostante anche durante il co-trattamento Cu²⁺+ORX-A è stato riportato un incremento molto elevato di tali atteggiamenti rispetto ai ctrl.

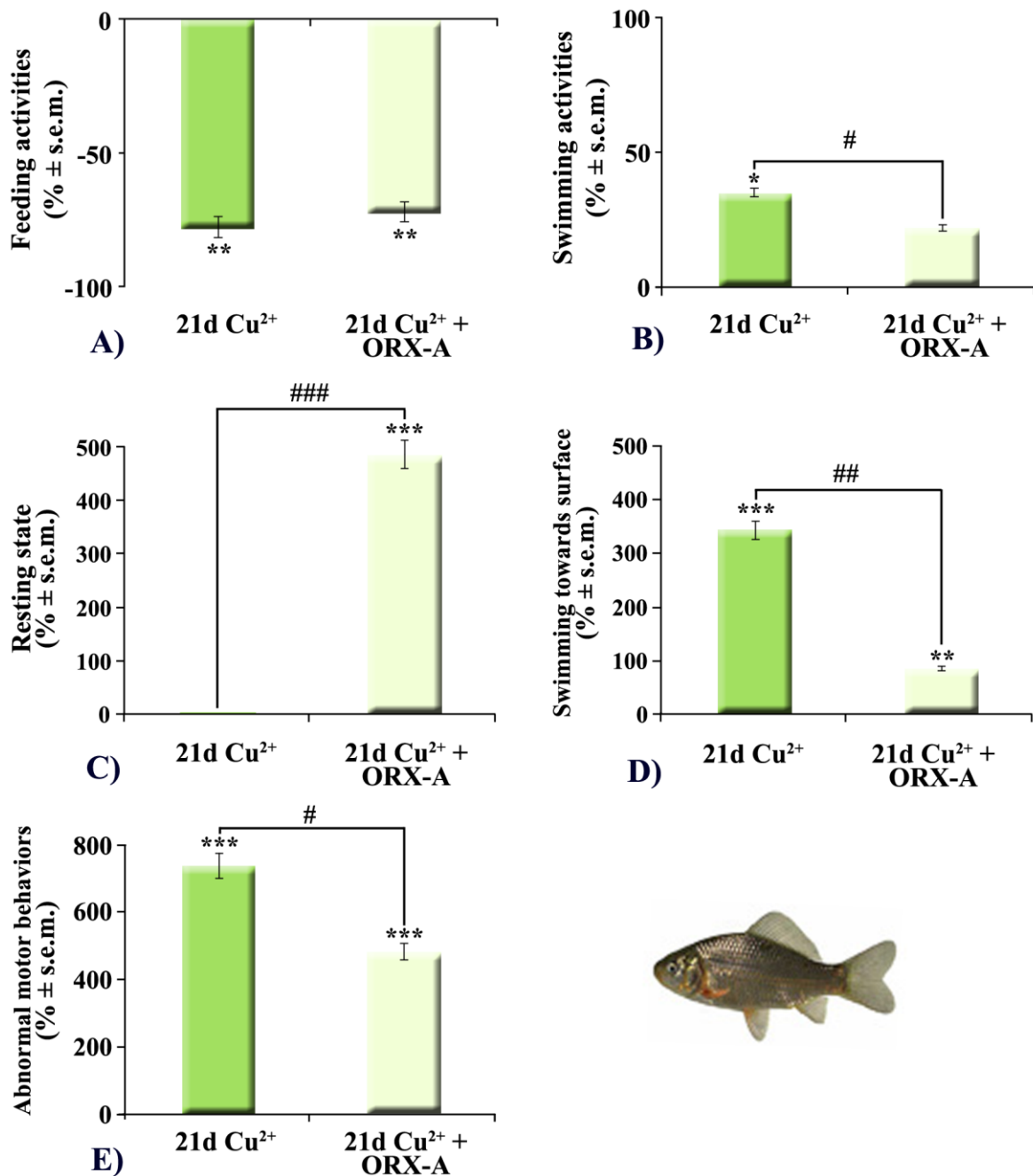


Fig. IV.37 Effetto dell'ORX-A sul comportamento di *Carassius carassius* al 21d di esposizione cronica al CuCl₂. I dati sono riportati come variazione (%) di *feeding* (A), *swimming* (B), *resting state* (C), *swimming towards surface* (D) e *abnormal motor behaviors* (E) dei pesci al 21d di esposizione al CuCl₂ +/- ORX-A (10 ng/g BW) rispetto ai ctrl (*). I dati relativi al trattamento con ORX-A sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al trattamento con il solo metallo (#). Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando p<0.05; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001.

In *Thalassoma pavo* la somministrazione di ORX-A al 21d di esposizione cronica al CuCl₂ ha prodotto effetti analoghi a quelli appena descritti per *Carassius carassius*. Per quanto riguarda il *feeding*, mentre al 21d di trattamento con il solo metallo era stata

osservata una riduzione molto elevata di quest'attività, la somministrazione sembrava attenuare tale effetto rispetto ai ctrl (Fig. IV.38A). Nel caso dello *swimming*, il neuropeptide ha potenziato la riduzione di quest'attività già promossa dal contaminante, facendo registrare addirittura un moderato decremento del tempo trascorso nello *swimming*, rispetto agli animali trattati con il solo metallo (Fig. IV.38B). In concomitanza a questo effetto inibitorio sul nuoto, il co-trattamento Cu^{2+} +ORX-A ha causato anche un incremento molto pronunciato del *resting state* sia rispetto ai ctrl che agli esposti al solo Cu^{2+} (Fig. IV.38C). Molto interessante è risultato l'effetto della somministrazione di ORX-A sullo *swimming towards surface*. In particolare, questo neuropeptide ha ostacolato l'incremento molto elevato di tale attività determinato dal solo metallo (Fig. IV.38D). In presenza di ORX-A al 21d lo *swimming towards surface* non ha mostrato, pertanto, alcun aumento significativo rispetto ai ctrl. Gli *abnormal motor behaviors* hanno subito anch'essi una forte riduzione durante il co-trattamento (Fig. IV.38E); tuttavia, l'iniezione del neuropeptide non è riuscita ad impedirne l'insorgenza e tali atteggiamenti sono rimasti, dunque, incrementati in modo molto pronunciato rispetto ai ctrl.

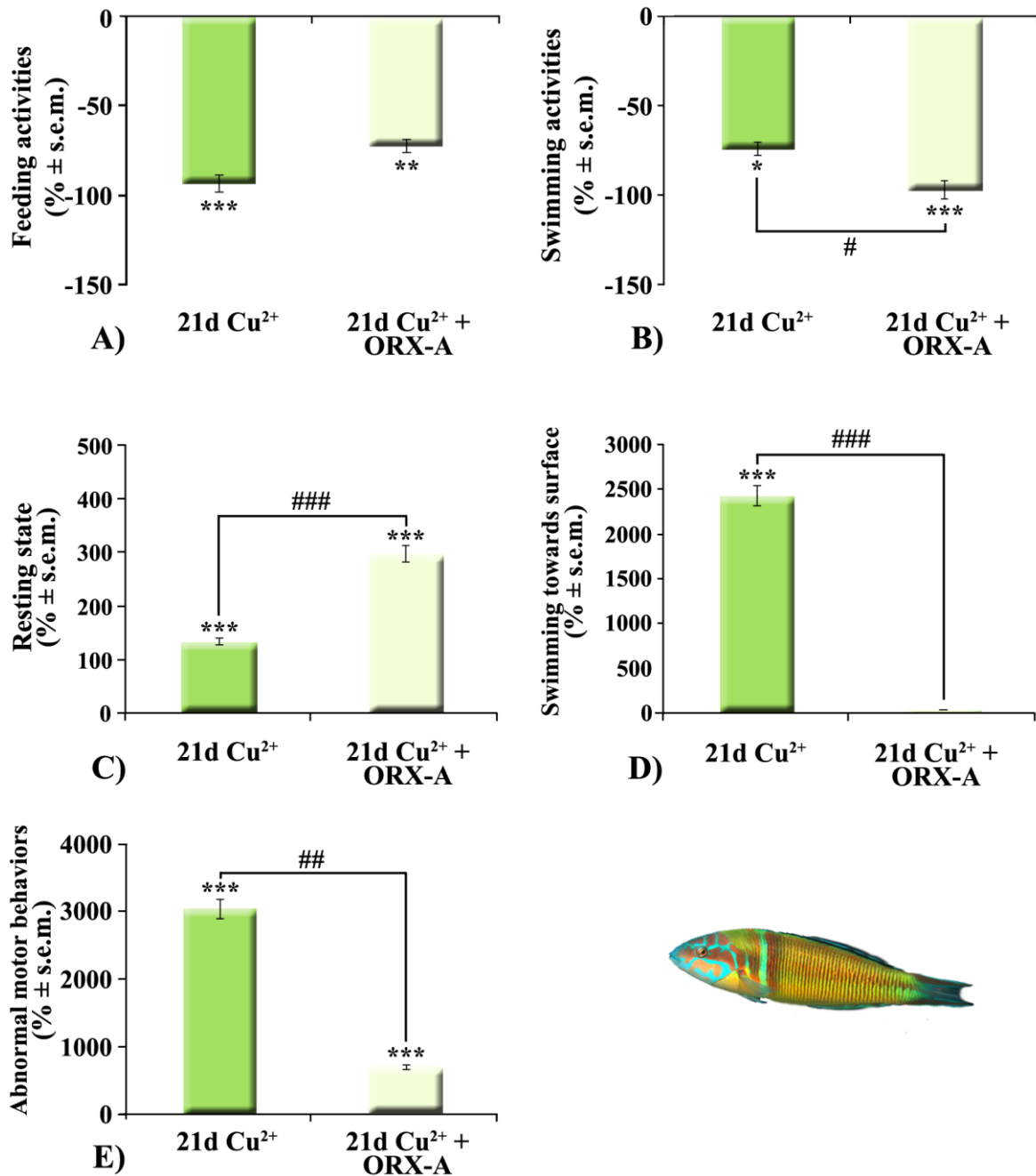


Fig. IV.38 Effetto dell'ORX-A sul comportamento di *Thalassoma pavo* al 21d di esposizione cronica al CuCl_2 . I dati sono riportati come variazione (%) di *feeding* (A), *swimming* (B), *resting state* (C), *swimming towards surface* (D) e *abnormal motor behaviors* (E) dei pesci al 21d di esposizione al CuCl_2 +/- ORX-A (10 ng/g BW) rispetto ai ctrl (*). I dati relativi al trattamento con ORX-A sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al trattamento con il solo metallo (#). Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

IV.5.2 Effetti dell'ORX-A sui fenomeni neurodegenerativi

Anche per gli animali trattati con ORX-A al 21d di esposizione cronica è stata effettuata l'analisi neurodegenerativa per valutare eventuali modifiche indotte dalla somministrazione del neuropeptide, rispetto alla reazione argirofilica riscontrata nei teleostei esposti per 21d al solo Cu^{2+} .

In entrambi i teleostei non sono state osservate variazioni sostanziali dei danni neuronali rispetto a quelli provocati dal solo metallo. In particolare, nel Dm di *Carassius carassius* (Fig. IV.39A) il livello di neurodegenerazione restava inalterato in seguito al co-trattamento con l'ORX-A. Un cospicuo numero di elementi neuronali degenerati sono stati rinvenuti in DI (Fig. IV.39B) ed anche in questo caso non sono state apprezzate modifiche considerevoli nell'entità della reazione argirofilica. Un'evidente neurodegenerazione è stata osservata anche in NDLI (Fig. IV.39C). La somministrazione di ORX-A, non ha promosso effettive variazioni nell'entità del danno indotto dal metallo. In modo analogo, in OT (Fig. IV.39D) la neurodegenerazione risultava anche in questo caso paragonabile a quella rinvenuta dopo trattamento cronico.

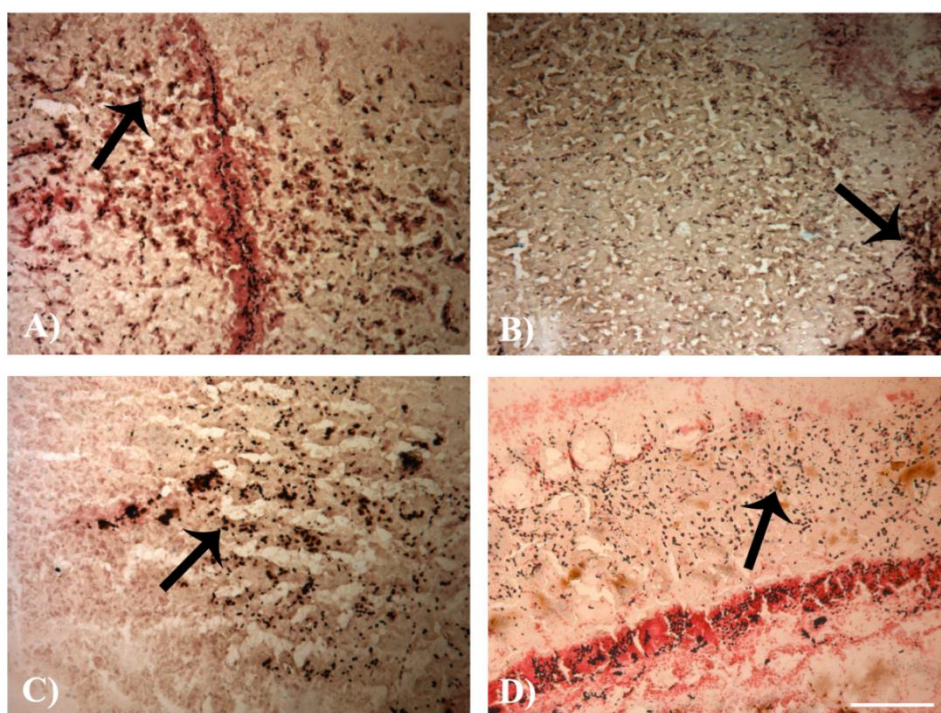


Fig. IV.39 Sezioni encefaliche rappresentative delle aree Dm (A), DI (B), NDLI (C) e OT (D) osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS in esemplari di *Carassius carassius* dopo trattamento cronico di 21d con la concentrazione 0.30 mg/L di CuCl_2 e sottoposti ad iniezione i.p. di ORX-A (10 ng/g BW) durante il 21d di esposizione al metallo. Scale bar: 80 μm .

Negli esemplari di *Thalassoma pavo*, sottoposti a somministrazione di ORX-A al 21d di trattamento cronico, si è potuto registrare a livello di Dm un'evidente neurodegenerazione (Fig. IV.40A) che, se confrontata con quella indotta dalla sola esposizione cronica mostrata in precedenza, non mostrava significative variazioni. In DI, invece, è stato possibile rinvenire un numero considerevole di cellule degenerate (Fig. IV.40B). Tuttavia, se paragonata all'esposizione al solo Cu^{2+} la neurodegenerazione, grazie all'effetto del neuropeptide, sembrava meno pronunciata. A livello ipotalamico, NDLI ha fatto osservare un'evidente neurodegenerazione (Fig. IV.40C) che in questo caso appariva ridotta in modo appena apprezzabile rispetto a quella riportata in questo stesso nucleo quando agli animali esposti al metallo per 21d non veniva somministrata ORX-A. Al contrario in OT, non sono state osservate variazioni consistenti nel danno neuronale precedentemente osservato (Fig. IV.40D). In ogni caso tale sito mesencefalico risultava, anche in questo caso, quello meno colpito da morte neuronale.

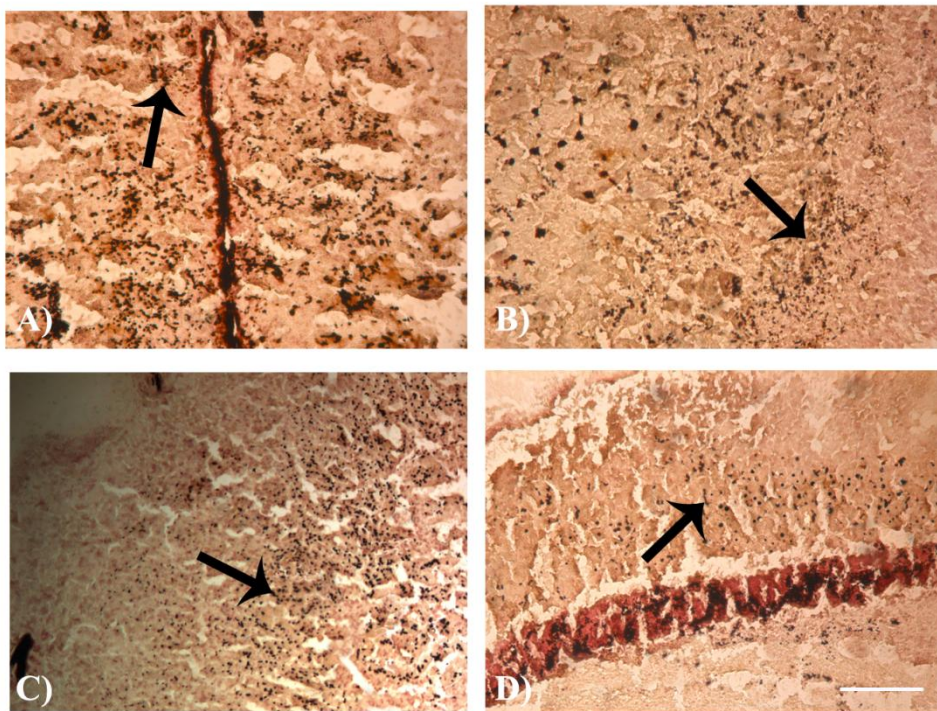


Fig. IV.40 Sezioni encefaliche rappresentative delle aree Dm (A), DI (B), NDLI (C) e OT (D) osservate al microscopio ottico in seguito a colorazione ACS in esemplari di *Thalassoma pavo* dopo trattamento cronico di 21d con la concentrazione 0.25 mg/L di CuCl_2 e sottoposti ad iniezione i.p. di ORX-A (10 ng/g BW) durante il 21d di esposizione al metallo. Scale bar: 90 μm .

IV.5.3 Effetti trascrizionali dell'ORX-A dopo esposizione cronica

Dopo aver valutato l'effetto dell'esposizione cronica al CuCl_2 sull'espressione dell'HSP90, si è voluto verificare se la singola iniezione di ORX-A al 21d di trattamento promuovesse

qualche variazione della risposta trascrizionale osservata. A tal fine le sezioni encefaliche di entrambi i teleostei sono state sottoposte ad ISH con i rispettivi *probes*, specifici per il riconoscimento dell'mRNA del suddetto *chaperon*.

Nel teleosteo d'acqua dolce la somministrazione di ORX-A induceva una generale attenuazione degli effetti riscontrati negli animali esposti esclusivamente al metallo. Infatti, in NDLI che aveva mostrato una moderata *down-regulation* dell'HSP90 dopo esposizione cronica al CuCl_2 , questo neuropeptide causava un ritorno dei livelli di trascritto verso valori prossimi a quelli dei ctrl (Fig. IV.41). Al contrario, la *down-regulation* Cu^{2+} -dipendente, che aveva caratterizzato i nuclei telencefalici Dm e VI, è stata riscontrata anche negli esemplari trattati con ORX-A. Per quanto riguarda TLo e VCe, in cui il Cu^{2+} aveva indotto una moderata *up-regulation* dell'mRNA dell'HSP90, la somministrazione di ORX-A ha ristabilito i livelli trascrizionali tipici dei ctrl. Al contrario, in CCe nonostante l'iniezione di ORX-A è stato mantenuto il moderato incremento trascrizionale osservato negli esposti al solo metallo.

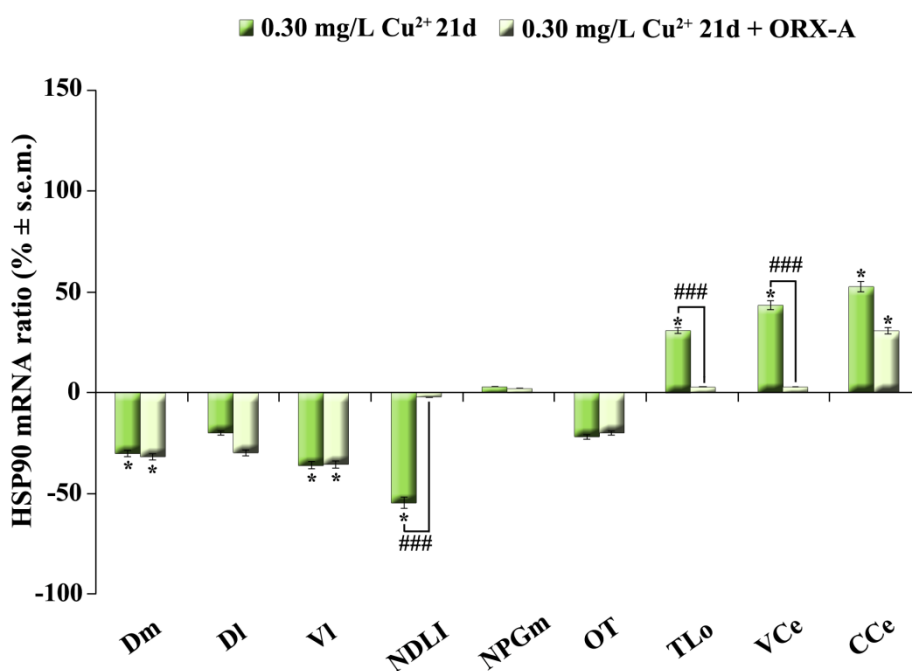


Fig. IV.41 Effetto dell'ORX-A sull'espressione neuronale dell'HSP90 in *Carassius carassius* dopo trattamento cronico con CuCl_2 . I dati sono riportati come variazione (%) dei livelli di trascritto dell'HSP90 nei pesci esposti al CuCl_2 +/- ORX-A rispetto ai ctrl (*). I dati relativi al trattamento con ORX-A sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al trattamento con il solo metallo (#). Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$. Abbreviazioni: CCe: corpo del cervelletto; DI= nucleo laterale del telencefalo dorsale; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT= tetto ottico; TLo= tori longitudinali; VCe= valvola del cervelletto; VI= nucleo laterale del telencefalo ventrale.

Nel caso di *Thalassoma pavo* nel quale il trattamento cronico aveva promosso un'up-regulation generalizzata dei livelli di trascritto, è stato osservato che l'iniezione di ORX-A non era in grado di potenziare l'espressione dell'HSP90. In particolare, a livello telencefalico, Dm, Dl e Vl mostravano un ritorno della quantità di mRNA verso i normali livelli trascrizionali (Fig IV.42). Effetto analogo veniva riscontrato anche in NDLI in cui in presenza di ORX-A non si riportava alcun effetto significativo sulla trascrizione dell'HSP90 rispetto ai ctrl. In NPGm (-43%) si assisteva, invece, ad una moderata riduzione dei livelli trascrizionali rispetto ai pesci esposti al solo Cu^{2+} ; tuttavia, permaneva in questo nucleo diencefalico una moderata up-regulation dell'HSP90 sempre rispetto ai ctrl. In TLo e nelle aree cerebellari VCe e CCe, che al termine dei 21d di trattamento avevano mostrato un incremento trascrizionale rispettivamente molto elevato e moderato, non si assisteva ad alcuna modifica significativa della risposta trascrizionale in seguito all'iniezione di ORX-A.

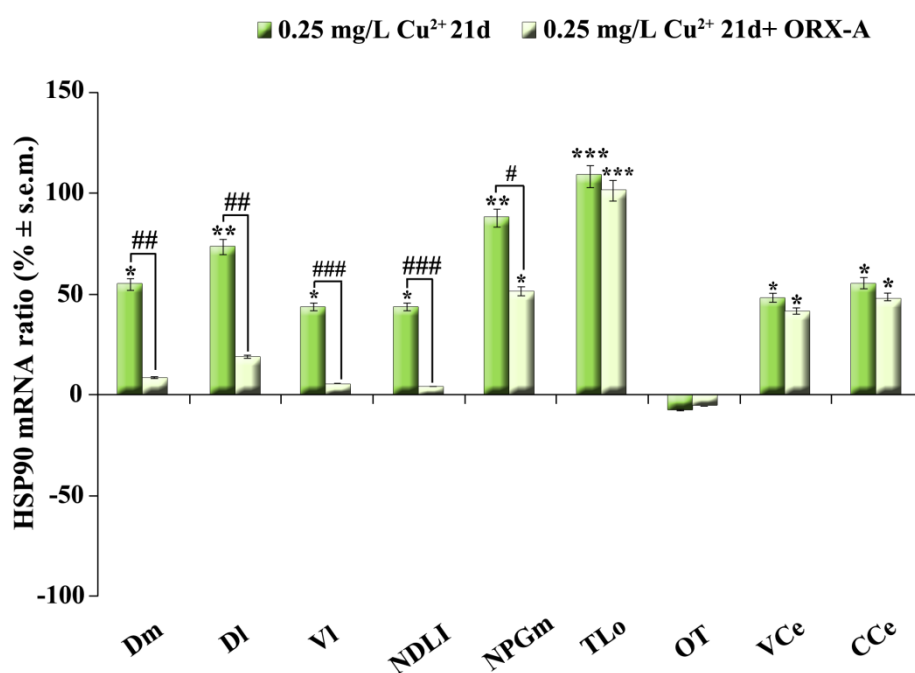


Fig. IV.42 Effetto dell'ORX-A sull'espressione neuronale dell'HSP90 in *Thalassoma pavo* dopo trattamento cronico con CuCl_2 . I dati sono riportati come variazione (%) dei livelli di trascritto dell'HSP90 nei pesci esposti al CuCl_2 +/- ORX-A rispetto ai ctrl (*). I dati relativi al trattamento con ORX-A sono stati inoltre confrontati con quelli relativi al trattamento con il solo metallo (#). Analisi statistica: ANOVA seguita dal Newman-Keul's test quando $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$. Abbreviazioni: CCe: corpo del cervelletto; Dl= nucleo laterale del telencefalo dorsale; Dm= nucleo mediale del telencefalo dorsale; NDLI= nucleo diffuso del lobo inferiore; NPGm= nucleo preglomeruloso mediale; OT= tetto ottico; TLo= tori longitudinali; VCe= valvola del cervelletto; Vl= nucleo laterale del telencefalo ventrale.

Discussione

Nel presente studio l'attenzione è stata focalizzata alla comprensione dei complessi meccanismi che governano le risposte neuro-comportamentali durante condizioni di stress indotte dall'esposizione al Cu^{2+} . I risultati ottenuti forniscono una prima evidenza degli effetti sortiti dal metallo sia in un teleosteo marino che d'acqua dolce (*Thalassoma pavo* e *Carassius carassius*), mettendo al contempo in evidenza, a livello encefalico, nuove strategie molecolari che coinvolgono l'HSP90 e il sistema ORXergico.

Da un punto di vista comportamentale il Cu^{2+} si è dimostrato un potente inibitore delle principali attività in entrambi i teleostei, in modo analogo agli effetti sul comportamento causati in *Thalassoma pavo* da altri metalli come Cd^{2+} (Giusi et al., 2005) e Pb^{2+} (Zizza et al., 2012). In particolare, la considerevole riduzione dello stimolo alimentare, osservata soprattutto durante esposizione alle più alte concentrazioni di metallo nonché a seguito dell'esposizione cronica, risulta in accordo con studi effettuati in *Cyprinus carpio* in cui si sottolinea la capacità del Cu^{2+} di influenzare pesantemente il tempo di latenza per il *feeding* (Kuz'mina, 2011). Tale alterazione potrebbe essere almeno in parte correlata alla tossicità del metallo a livello olfattivo. Recenti evidenze hanno infatti dimostrato che il Cu^{2+} nel *goldfish* è causa di notevoli disturbi della risposta olfattiva ad aminoacidi e feromoni (Kolmakov et al., 2009), come conseguenza ad esempio dell'inibizione del pathway trasduzionale dell'adenilato ciclasi (Gao et al., 2005). E' utile ricordare che la risposta allo stress, attivata dall'esposizione al metallo, può condizionare essa stessa il sistema nervoso e specificamente le funzioni ipotalamiche e di altri centri nervosi responsabili del controllo dell'assunzione di cibo. E' infatti noto che il CRF, il cui rilascio è stimolato anche dall'esposizione ai metalli, è capace di influenzare negativamente il comportamento alimentare (Morimoto et al., 2011).

Oltre agli effetti sul *feeding*, l'analisi comportamentale ha mostrato severe alterazioni di altre attività tipiche dei teleostei, quali lo *swimming* e il *resting state*. La riduzione della normale *swimming performance* rinvenuta durante i trattamenti a breve termine, e nel caso di *Thalassoma pavo* anche nel trattamento di 21d, sembra in linea con gli effetti negativi determinati da questo metallo sulla velocità di nuoto (De Boeck et al., 2006). La riduzione dell'attività motoria viene indicata in alcuni casi come una strategia pro-sopravvivenza messa in atto dai pesci per evitare dispendio energetico e soprattutto consumo di ossigeno durante condizioni ambientali avverse. Le elevate prestazioni motorie causerebbero infatti rapido consumo di ossigeno diminuendo di gran lunga la tolleranza dell'animale. Tuttavia, nel caso del teleosteo marino, solo negli esemplari esposti alla più bassa concentrazione di CuCl_2 , la riduzione della normale attività di nuoto corrispondeva ad un incremento

significativo del *resting state*. Negli animali esposti alla concentrazione più alta veniva invece registrata insorgenza di *abnormal motor behaviors* incredibilmente evidenti e non ascrivibili alla categoria *swimming* intesa come normale nuoto esplorativo. Effetti analoghi sono stati già osservati in questo stesso teleosteo durante esposizione ad alte dosi di Pb^{2+} , durante la quale si registravano frequenti movimenti iperattivi (Giusi et al., 2008). Tali atteggiamenti, contrariamente a quanto osservato in *Thalassoma pavo*, in *Carassius carassius* si sono verificati in maniera più moderata e solo a 48h di esposizione con la concentrazione di 1.45 mg/L. Simili differenze tra i due teleostei tendono a sottolineare la specie-specificità delle risposte e delle alterazioni indotte dal Cu^{2+} sul comportamento motorio, in modo paragonabile a quanto già proposto da altri studi (De Boeck et al., 2006; Eychmans et al., 2011).

A livello neuronale le disfunzioni motorie provocate da questo metallo potrebbero essere dovute ad alterazioni del contenuto di monoamine in specifiche aree encefaliche, come quelle telencefaliche, preposte nei pesci al controllo motorio (De Boeck et al., 1995). Dall'analisi neurodegenerativa il nucleo telencefalico DI è risultato colpito da evidente degenerazione a seguito dell'esposizione a breve termine ed in modo ancora più pronunciato dopo trattamento cronico. I danni neuronali indotti in alcune aree critiche per il controllo di importanti funzioni fisiologiche potrebbero dunque fornire un ulteriore elemento per chiarire le cause delle alterazioni comportamentali indotte dal metallo, soprattutto nel caso dell'esposizione prolungata a seguito della quale la neurodegenerazione interessava molte più aree encefaliche. La capacità dei metalli di indurre neurodegenerazione è infatti nota determinando, in primo luogo, stress ossidativo e alterando diversi processi cellulari che possono condurre i neuroni a morte per necrosi o apoptosi (Galli et al., 2004; Levenson, 2005).

Alcune alterazioni osservate in questo studio, quale l'incremento considerevole dello *swimming towards surface*, in entrambi i teleostei, sembrerebbero un chiaro segno della tossicità del metallo a livello delle branchie. E' possibile infatti che i pesci siano spinti a ricercare un maggiore apporto di ossigeno in superficie a causa delle alterazioni a carico dell'epitelio branchiale, target preferenziale degli effetti tossici di questo metallo (De Boeck et al., 2006; Monteiro et al., 2005). Questa ipotesi è supportata dal fatto che anche nel caso di altri metalli, la permanenza dei pesci in superficie è stata considerata come indicativa di alterate capacità respiratorie (Bilberg et al., 2012).

Particolarmente interessanti si sono rivelati i risultati del test di recupero. Il periodo di permanenza in acqua priva di metallo dopo esposizione a breve termine ha evidenziato le

straordinarie capacità di recupero di questi teleostei. Infatti, nonostante le severe alterazioni del comportamento, indotte dal Cu^{2+} , essi si sono dimostrati in grado di ristabilire almeno parzialmente le normali *performances* alimentari e motorie. Parallelamente al recupero sul piano comportamentale, l'ACS ha fatto riscontrare a livello telencefalico una netta riduzione del danno, ben apprezzabile solo nei pesci che erano stati prima trattati con le più basse concentrazioni del metallo. Questo dato non dovrebbe sorprenderci più di tanto visto che sono ormai note le spiccate proprietà rigenerative dell'encefalo dei pesci, anche nella fase adulta. Difatti, mentre nei mammiferi queste risultano confinate a OB e HIP (Zupanc, 2006), le proprietà neurogeniche dei pesci caratterizzano molte aree che consentono una rapida ed efficace riparazione di lesioni anche gravi (Zupanc e Ott, 1999). In particolare, tra queste aree encefaliche vi sono l'OT (in cui le nuove cellule rimangono vicine alla zona di proliferazione), il cervelletto e il telencefalo (in cui i nuovi neuroni sono in grado di migrare verso specifiche aree target; Zupanc, 2008). Ciò che è importante, almeno in riferimento al mio studio, è che la generazione di nuove cellule è particolarmente rapida ed efficiente dal momento che a distanza di soli due giorni dalla lesione il numero di cellule danneggiate inizia a ridursi gradualmente (Zupanc e Sîrbulescu, 2011) e ciò è in linea con quanto osservato nel mio studio proprio dopo 48 h di permanenza in acqua senza contaminante. In aggiunta, proprio in *Carassius carassius* era stato da tempo dimostrato che le sue elevate capacità di resistenza a condizioni ambientali estreme sono strettamente correlate alla presenza di centri proliferativi la cui ablazione comporta la perdita stessa di tali capacità (Kirsche, 1960).

La plasticità dell'encefalo di questi due teleostei e i meccanismi di difesa e riparazione dei danni indotti da questo contaminante sembrano comprendere l'HSP90, *chaperon* molecolare cruciale sia per il mantenimento delle funzioni neuronali (Gerges et al., 2004) che in risposta a stati di stress nei pesci (Manchado et al., 2008). In modo analogo a quanto mostrato in altri teleostei che vivevano in acque i cui sedimenti erano contaminati (Costa et al., 2011), nel presente studio le più evidenti modifiche trascrizionali sono state riscontrate negli animali esposti alla più alta concentrazione di metallo e a seguito di esposizione cronica. Nonostante ciò, è stato evidenziato che la risposta trascrizionale era altamente specie-specifica. In particolare, in *Thalassoma pavo* numerosi nuclei encefalici hanno mostrato significative *up-regulation* del trascritto per l'HSP90 dopo trattamento di 48h con la concentrazione di 1.07 mg/L di CuCl_2 , eccetto una moderata riduzione riportata in OT. Dopo esposizione cronica, l'incremento dei livelli trascrizionali interessava quasi tutti i

nuclei considerati, tranne OT, che però non mostrava alcuna *down-regulation* rispetto ai ctrl. Simili risposte trascrizionali sembrano dunque suggerire in questo teleosteo la partecipazione di questa *chaperon* ai meccanismi che presiedono alla protezione e mantenimento delle funzioni neuronali in condizioni di stress soprattutto se queste causano eventi proteotossici come quelli indotti dal Cu^{2+} tramite produzione di ROS (Jomova e Valko, 2011) o tramite interazione a livello dei gruppi tiolici delle proteine (Letelier et al., 2005).

Differente è risultata la risposta trascrizionale in *Carassius carassius* in cui l'alta concentrazione di metallo è stata responsabile di un'*up-regulation* solo in VCe e di una moderata *down-regulation* nei nuclei telencefalici. Dopo esposizione cronica, l'*up-regulation* interessava anche TLo e CCe mentre la *down-regulation* colpiva anche NDLI. Si può sottolineare che in questo teleosteo l'innalzamento dei livelli di HSP90 si verificava proprio in aree cerebellari, quali VCe e CCe, particolarmente importanti per il controllo motorio nei pesci. Nello specifico VCe, oltre ad essere preposto al controllo di funzioni motorie nei ciprinidi, sembra che conservi le più alte funzioni del cervelletto dei mammiferi (Ikenaga et al., 2002). D'altro canto CCe è ritenuto fondamentale nel garantire al pesce un'andatura corretta durante il nuoto, mantenendo un nuoto sostenuto alle alte velocità (Matsumoto et al., 2007). Anche nel caso di TLo la risposta trascrizionale sembra non essere casuale in virtù del fatto che quest'area mesencefalica funge nei teleostei da *link* cruciale nei circuiti pre-motori che discendono dal telencefalo fino al tronco encefalico (Wullimann, 1994). Tuttavia, proprio a livello telencefalico questi trattamenti hanno fatto riscontrare una *down-regulation* dell'HSP90 e ciò potrebbe far supporre che l'*up-regulation* riscontrata a livello cerebellare e in TLo sia una sorta di evento compensatorio all'effetto del contaminante nei nuclei telencefalici di *Carassius carassius*. Infatti, specialmente il pallio laterale nei teleostei è una regione fortemente connessa alla cognizione e alla memoria spaziale; essi si muovono nello spazio grazie a punti di riferimento forniti proprio da input provenienti da DI (Broglia et al., 2005). Risultati di altri studi affermano, inoltre, che lesioni a carico di questo nucleo si traducono nel *goldfish* in deficit dell'apprendimento spaziale (Salas et al., 1996).

Il fatto che in *Carassius carassius*, a livello telencefalico, e in *Thalassoma pavo*, a livello dell'OT, si assista addirittura ad una riduzione dei livelli di trascritto per l'HSP90 potrebbe essere dovuto ad un effetto inibitorio indotto, almeno inizialmente, dalle alte concentrazioni di metallo o in alternativa potrebbe rappresentare una conseguenza della perdita del contenuto neuronale a seguito degli eventi neurodegenerativi. Un effetto

inibitorio promosso dal Cu^{2+} sull'espressione delle HSPs è stato in effetti già riscontrato in altri pesci come *Scophthalmus rhombus* nel quale il trattamento con CuSO_4 è stato causa di una riduzione dei livelli di HSP70 e HSP60 (Chairi et al., 2010). Inoltre, uno studio recente condotto sul ciprinide asiatico *Tanichthys albonubes* ha mostrato che anche nel caso di altri metalli, come il Cd^{2+} , l'espressione dell'HSP90 può subire una riduzione (Liu et al., 2011).

Risposte trascrizionali molto interessanti sono state registrate in entrambi i teleostei dopo la fase di recupero e precisamente negli animali prima esposti alla concentrazione più alta. E' stata infatti osservata una generale *up-regulation* del trascritto in quasi tutte le aree considerate anche in quelle che, come NPGm, non avevano mostrato variazioni significative durante i trattamenti. Una simile risposta trascrizionale, riscontrata proprio dopo il periodo in acqua priva di Cu^{2+} , potrebbe essere mirata al ripristino delle funzioni neuro-comportamentali perturbate, oltre che alla riparazione di quei danni neuronali indotti dal precedente periodo di esposizione.

Ugualmente interessanti risultano gli effetti della somministrazione di ORX-A durante i trattamenti, anche da un punto di vista comportamentale. Il sistema ORXergico è ormai ritenuto come uno dei principali regolatori di numerose funzioni fisiologiche non solo nei mammiferi (Sakurai, 2007) ma anche nei pesci (Facciolo et al., 2011). Inoltre, è stato dimostrato che numerosi agenti o situazioni ambientali inducenti stress promuovono l'attivazione dei neuroni ORXergici (Winsky-Sommerer et al., 2004; Watanabe et al., 2005). Il sistema ORXergico sembra difatti uno dei principali modulatori richiesti per coordinare l'azione di circuiti neuronali preposti al controllo di funzioni autonome e dei comportamenti emozionali (Kuwaki, 2011), regolando ad esempio le reazioni cardiovascolari (Samson et al., 2007; Deng et al., 2007) e respiratorie (Machado et al., 2002; Zhang et al., 2005) stress-associate.

Nel presente lavoro l'iniezione di ORX-A sembra prevenire gran parte delle alterazioni comportamentali indotte dal metallo, soprattutto nei trattamenti a breve termine. Nel caso del *feeding* la somministrazione del neuropeptide, in concomitanza all'esposizione alla bassa concentrazione di CuCl_2 , abolisce completamente l'influenza del metallo su questa attività comportamentale, in modo analogo a quanto già mostrato in *Thalassoma pavo* esposto al Pb^{2+} (Zizza et al., 2012). E' interessante notare l'effetto di questo neuropeptide sugli *abnormal motor behaviors* che vengono ridotti in maniera evidente rispetto ai trattamenti con il metallo da solo. In concomitanza l'ORX-A ha mostrato una tendenza a incrementare il *resting state*. Un simile effetto è in effetti insolito in condizioni fisiologiche considerato che diversi studi hanno dimostrato come la somministrazione del neuropeptide

sia in grado di stimolare l'attività locomotoria (Matsuda et al., 2011). Tuttavia, non bisogna dimenticare che in questo caso ci troviamo di fronte ad una situazione di stress in cui il neuropeptide potrebbe agire diversamente per indurre un certo recupero delle attività motorie, come misura attivata a livello neuronale per incrementare la tolleranza dell'animale ed evitare dispendio energetico in una simile condizione. In ogni caso nei ratti è stato osservato che l'iniezione di ORX-A nel nucleo paraventricolare talamico provoca una riduzione dell'attività locomotoria ed un concomitante incremento del *freezing* indicando che, nonostante l'ORX-A sia in grado di promuovere l'*arousal*, quest'azione non è da intendersi necessariamente correlata ad innalzamento dell'attività locomotoria (Li et al., 2009), soprattutto in condizioni di stress.

Inoltre, in entrambi i teleostei, durante trattamento cronico, e in *Carassius carassius*, durante quelli a breve termine, l'ORX-A ha riportato lo *swimming towards surface* verso i valori dei ctrl evitando la pronunciata alterazione indotta dal Cu^{2+} . Tale risposta, in virtù della associazione fatta in precedenza sul significato del movimento in superficie come conseguenza dei deficit respiratori riportati dagli animali trattati, lascia supporre che l'intervento dell'ORX-A sia mirato al miglioramento delle *performances* respiratorie dei pesci. Questa mia supposizione trova sostegno nel fatto che la LHA, sede dei neuroni ORXergici nei mammiferi, è stata di recente indicata come un importante centro di regolazione della respirazione (Song et al., 2012). Difatti, lesioni a carico di quest'area si traducono in un'immediata inibizione dell'attività respiratoria (Redgate e Gellhorn, 1958).

Anche a livello neuronale la somministrazione di ORX-A ha influenzato positivamente la trascrizione dell'HSP90, soprattutto negli esemplari di *Thalassoma pavo* esposti a trattamento di 48h, dal momento che sono stati riportati significativi incrementi dei livelli di espressione dell'HSP90 in numerosi nuclei encefalici. Anche in questo caso la risposta trascrizionale interessava aree critiche per il controllo delle principali funzioni dei teleostei, come quelle preposte al comportamento alimentare in particolare NDLI, nucleo ipotalamico coinvolto nel controllo dell'orientamento dell'animale verso la fonte di cibo (Northcutt e Butler, 1993) e NPGm, parte di un sistema gustativo fondamentale per la ricerca e l'assunzione di cibo deputato quindi alla ricezione e integrazione di informazioni gustative, olfattive e viscerali dai centri gustativi periferici (Kato et al., 2012; Folgueira et al., 2005). Gli incrementi riscontrati a livello di questi nuclei diencefalici ben si correlano all'effetto positivo promosso dall'ORX-A sul *feeding* in questi teleostei.

Per quanto attiene i fenomeni neurodegenerativi l'ORX-A ha fatto osservare lievi, ma comunque apprezzabili, riduzioni del danno neuronale indotti dal metallo durante i

trattamenti a breve termine. Ciò era particolarmente evidente in DI di *Carassius carassius* e in OT di *Thalassoma pavo*. A sostegno di questi risultati, alcune evidenze hanno mostrato che l'ORX-A durante condizioni ischemiche è in grado di promuovere la sopravvivenza neuronale *in vitro*, principalmente attraverso l'inibizione della caspasi-3 (Sokolowska et al., 2012), e di sopprimere il danno neuronale *in vivo* modulando l'intolleranza post-ischemica al glucosio (Harada et al., 2011). L'ORX-A, infatti, dato il suo coinvolgimento in numerosi processi fisiologici e i differenti pathway di secondi messaggeri da essa attivati, possiede potenzialmente effetti multipli, anche se sembra che l'induzione dei meccanismi neuroprotettivi mediati da questo neuropeptide sia principalmente correlata alla riduzione di stress ossidativo (Butterick et al., 2012). Una simile prospettiva potrebbe in effetti essere possibile, se si considera che la tossicità del Cu^{2+} è principalmente dovuta alla sua capacità di indurre produzione di ROS (Jomova e Valko, 2011).

In conclusione, i risultati del presente lavoro forniscono le prime importanti informazioni sull'impatto del Cu^{2+} a livello delle funzioni neuro-comportamentali di *Carassius carassius* e *Thalassoma pavo*. In aggiunta a ciò, si evidenziano le straordinarie capacità di recupero e riparazione delle alterazioni metallo-dipendenti che risultano fortemente correlate alle risposte trascrizionali dell'HSP90 in specifiche aree encefaliche. Questa HSP sembra infatti far parte di un complesso programma neuroprotettivo che, come dimostrato in questo studio, prevede anche il coinvolgimento del sistema ORXergico in qualità di importante modulatore delle risposte adattative e compensatorie in risposta allo stress. A tal proposito, sarebbero necessari ulteriori studi che consentano di definire meglio il ruolo di questo sistema neurorecettoriale durante simili condizioni nei pesci. Il sistema ORXergico dei pesci potrebbe infatti agire di concerto con altri fattori molecolari come l'*Hypoxia-Inducible Factor-1 α* , la cui attivazione mediata dal sistema ORXergico è stata già dimostrata nei mammiferi (Sikder e Kodadek, 2007; Yuan et al., 2011), o attivare l'espressione della stessa HSP90 attraverso l'interazione con altri sistemi neurorecettoriali, come quello istaminergico, in grado di esercitare un ruolo protettivo contro la neurotossicità dei metalli (Giusi et al., 2008).

Bibliografia

- Ahmed S.S., Santosh W.** (2010). Metallomic profiling and linkage map analysis of early parkinson's disease: a new insight to aluminium marker for the possible diagnosis. *PLoS One*. 5(6), e11252.
- Airaksinen S., Rabergh C.M.I., Lahti A., Kaatrasalo A., Sistonen L., Nikinmaa M.** (2003). Stressor dependent regulation of the heat shock response in zebrafish, *Danio rerio*. *Comp. Biochem. Physiol.* 134, 839-846.
- American Society for Testing Material (ASTM).** (1997). Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. Philadelphia: American Society for Testing and Materials Standards. E 729-790.
- Anckar J., Sistonen L.** (2011). Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 1089-1115.
- Andrew A.S., Warren A.J., Barchowsky A., Temple K.A., Klei L., Soucy N.V., O'Hara K.A., Hamilton J.W.** (2003). Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environ. Health Perspect.* 111, 825-838.
- Baldo B.A., Daniel R.A., Berridge C.W., Kelley A.E.** (2003). Overlapping distributions of orexin/hypocretin and dopamine – beta- hydroxylase immunoreactive fibers in rat brain regions mediating arousal, motivation and stress. *J. Comp. Neurol.* 464(2), 220-237.
- Basha D.C., Rani M.U., Devi C.B., Kumar M.R., Reddy G.R.** (2012). Perinatal lead exposure alters postnatal cholinergic and aminergic system in rat brain: reversal effect of calcium co-administration. *Int. J. Dev. Neurosci.* 30(4), 343-350.
- Basha, M.R., Wei, W., Bakheet, S.A., Benitez, N., Siddiqi, H.K., Ge, Y., Lahiri, D.K., Zawia, N.H.** (2005). The fetal-basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent over-expression of amyloid precursor protein and β -amyloid in the aging brain. *J. Neurosci.* 25, 823-829.
- Bensaude O., Bellier S., Dubois M.F., Giannoni F., Nguyen V.T.** (1996). Heat-shock induced protein modifications and modulation of enzyme activities. In Feige, U., Morimoto, R.I., Yahara, I. and Polla, B., eds. *Stress-Inducible Cellular Responses*. Basel: Birkhäuser. 199-219.
- Becker J.S., Zoriy M.V., Pickhardt C., Palomero-Gallagher N., Zilles K.** (2005). Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 3208-3216.
- Berretta S.** (2005). Cortico-amygdala circuits: role in the conditioned stress response. *Stress.* 8, 221-232.
- Berridge C.W.** (2008). Noradrenergic modulation of arousal. *Brain Res. Rev.* 58, 1-17.
- Berridge C.W., España R.A., Vittoz N.M.** (2010). *Brain Res.* 1314, 91-102.
- Berridge C.W., Mitton E., Clark W., Roth R.H.** (1999). Engagement in a non-escape (displacement) behavior elicits a selective and lateralized suppression of frontal cortical dopaminergic utilization in stress. *Synapse.* 32, 187-197.
- Bervoets L., Knaepkens G., Eens M., Blust R.** (2005). Fish community responses to metal pollution. *Environ. Pollut.* 138:338-349.

- Besshoh S., Bawa D., Teves L., Wallace M.C., Gurd J.W.** (2005). Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and postsynaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J. Neurochem.* 93(1),186-194.
- Bilberg K., Hovgaard M.B., Besenbacher F., Baatrup E.** (2012). *In Vivo* Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Toxicol.* 2012, 293784.
- Bopp S.K., Abicht H.K., Knauer K.** (2008). Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat. Toxicol.* 86,197-204.
- Borjigin J., Payne A.S., Deng J., et al.** (1999). A novel pineal night-specific ATP-ase encoded by the Wilson disease gene. *J. Neurosci.* 19, 1018-1026.
- Bressler J., Kim K.A., Chakraborti T., Goldstein G.** (1999). Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 24,595-600.
- Broglio C., Gómez A., Duran E., Ocaña F.M., Jiménez-Moya F., Rodríguez F., Salas C.** (2005). Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: specialized pallial areas for spatial, temporal and emotional memory in actinopterygian fish. *Brain Res. Bull.* 66, 277-281.
- Broglio C., Rodríguez F., Gómez A., Arias J. L., Salas C.** (2010). Selective involvement of the goldfish lateral pallium in spatial memory. *Behav. Brain Res.* 210, 191-201.
- Brown R.E., Sergeeva O.A., Eriksson K.S., Haas H.L.** (2002). Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline). *J. Neurosci.* 22(20), 8850-8859.
- Brown M.A., Zhu L., Schmidt C., Tucker P.W.** (2007). Hsp90-from signal transduction to cell transformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 241-246.
- Bruce J.L., Price B.D., Coleman C.N., Calderwood S.K.** (1993). Oxidative injury rapidly activates the heat shock transcription factor but fails to increase levels of heat shock proteins. *Cancer Res.* 53:12-51.
- Bruses J.L., Chauvet N., Rutishauser U.** (2001). Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J. Neurosci.* 21, 504-512.
- Bukau B., Weissman J., Horwich A.** (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell.* 125(3), 443-451.
- Burrows F., Zhang H., Kamal A.** (2004). Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 3(12),1530-1536.
- Butterick T.A., Nixon J.P., Billington C.J., Kotz C.M.** (2012). Orexin A decreases lipid peroxidation and apoptosis in a novel hypothalamic cell model. *Neurosci. Lett.* 524(1),30-4.
- 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.
- Campbell H.A., Handy R.D., Sims D.W.** (2002). Increased metabolic cost of swimming and consequent alterations to circadian activity in rainbow trout exposed to dietary copper. *Can. J., Fish Aquat. Sci.* 59, 768-777.

- Canesi L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M., Gallo G.** (1999). Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46, 67-76.
- Cahill G.M.** (2002). Circadian melatonin rhythms in cultured zebrafish pineals are not affected by catecholamine receptor agonists. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105, 270-275.
- Cara J.B., Aluru N., Moyano F.J., Vijayan M.M.** (2005). Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 142(4), 426-431.
- Cerdà-Reverter J.M., Zanuy S., Munoz-Cueto J.A.** (2001a). Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. the telencephalon. *J. Morphol.* 247, 217-228.
- Cerdà-Reverter J.M., Zanuy S., Munoz-Cueto J.A.** (2001b). Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) II: the diencephalon. *J. Morphol.* 247, 229-251.
- Ceyhun S.B., Aksakal E., Kirim B., Atabeyoglu K., Erdogan O.** (2012). Chronic toxicity of pesticides to the mRNA expression levels of metallothioneins and cytochrome P450 1A genes in rainbow trout. *Toxicol. Ind. Health.* 28(2), 162-169.
- Chairi H., Fernández-Diaz C., Navas J.I., Manchado M., Rebordinos L., Blasco J.** (2010). *In vivo* genotoxicity and stress defences in three flatfish species exposed to CuSO₄. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1279-1285.
- Chambers K.J., Tonkin L.A., Chang E., Shelton D.N., Linskens M.H., Funk W.D.** (1998). Identification and cloning of a sequence homologue of dopamine beta-hydroxylase. *Gene.* 218, 111-120.
- Chanda S., Dasgupta U.B., Guhamazumder D., Gupta M., Chaudhuri U., Lahiri S., Das S., Ghosh N., Chatterjee D.** (2006). DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic exposed people with and without malignancy. *Toxicol. Sci.* 89,431-7.
- Chaurasia S.S., Gupta P., Kar A., Maiti P.K.** (1996). Lead induced thyroid dysfunction and lipid peroxidation in the fish *Clarias batrachus* with special reference to hepatic type I-5' monodeiodinase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56,649-654.
- Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.E., Saper C.B., Yanagisawa M.** (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98(4), 437-451.
- Chen S., Bawa D., Besshoh S., Gurd J.W., Brown I.R.** (2005) Association of heat shock proteins and neuronal membrane components with lipid rafts from the rat brain. *J. Neurosci. Res.* 81(4), 522-529.
- Chen F., Zhou Q.X.** (2009). Joint toxic effects of galaxolide and cadmium on *Carassius auratus* under polluting flow conditions containing soil-water interfaces from urban areas. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 35, 228-236.
- Cheng T.F., Choudhuri S., Muldoon-Jacobs K.** (2012). Epigenetic targets of some toxicologically relevant metals: a review of the literature. *J. Appl. Toxicol.* 32(9),643-653.

- Choi B.S., Zheng W.**(2009). Copper transport to the brain by the blood-brain barrier and blood-CSF barrier. *Brain Res.* 1248, 14-21.
- Ciocca D.R., Arrigo A.P., Calderwood S.K.** (2012). Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch. Toxicol.* In press.
- Colborn T.** (2002). Clues from wildlife to create an assay for thyroid system disruption. *Envir. Health Perspec.* 110,363-367.
- Cory-Slechta D.A., Virgolini M.B., Thiruchelvam M., Weston D.D., Bauter M.R.** (2004). Maternal stress modulates effects of developmental lead exposure. *Environ. Health Perspect.* 112,717-730.
- Costa P.M., Miguel C., Caeiro S., Lobo J., Martins M., Ferreira A.M., Caetano M., Vale C., DelValls T.A., Costa M.H.** (2011). Transcriptomic analyses in a benthic fish exposed to contaminated estuarine sediments through laboratory and in situ bioassays. *Ecotoxicology.* 20(8), 1749-1764.
- Csermely P., Schnaider T., Soti C., Prohá'zka Z., Nardai G.** (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 79, 129-168.
- Currie S., Reddin K., McGinn P., McConnell T., Perry S.F.** (2008). Beta-adrenergic stimulation enhances the heat-shock response in fish. *Physiol. Biochem. Zool.* 81(4), 414-425.
- Dang Z., Lock R.A.C., Flik G., Wendelaar Bonga S.E.** (2000). Na⁺/K⁺ ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *J. Exp. Biol.* 203, 379-387.
- Dang Z., Lock R.A.C., Flik G., Wendelaar Bonga S.E.** (1999). Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. *Am. J. Physiol.* 277, R320-R331.
- Date Y., Mondal M.S., Matsukura S., Ueta Y., Yamashita H., Kaiya H., Kangawa K., Nakazato M.** (2000). Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 76, 1-6.
- da Silva E.S., dos Santos T.V., Hoeller A.A., dos Santos T.S., Pereira G.V., Meneghelli C., Pezlin A.I., dos Santos M.M., Faria M.S., Paschoalini M.A., Marino-Neto J.** (2008). Behavioral and metabolic effects of central injections of orexins/hypocretins in pigeons (*Columba livia*). *Regul. Pept.* 147, 9-18.
- Deane E.E., Kelly S.P., Lo C.K.M., Woo N.Y.S.** (1999). Effects of GH, prolactin and cortisol on hepatic heat shock protein 70 expression in a marine teleost *Sparus sarba*. *J. Endocrinol.* 161, 413-421.
- De Boeck G., Nilsson G.E., Elofsson U., Vlaeminck A., Blust R.** (1995). Brain monoamine levels and energy status in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to sublethal levels of copper. *Aquat. Toxicol.* 33, 265-277.
- De Boeck G., Van der Ven K., Hattink K., Blust R.** (2006). Swimming performance and energy metabolism of rainbow trout, common carp and gibel carp respond differently to sublethal copper exposure. *Aquat. Toxicol.* 80, 92-100.

- De Boeck G., Van der Ven K., Meeus W., Blust R.** (2007). Sublethal copper exposure induces respiratory stress in common and gibel carp but not in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 144(4), 380-390.
- De Boeck G., Vlaeminck A., Balm P.H., Lock R.A., De Wachter B., Blust R.** (2001). Morphological and metabolic changes in common carp, *Cyprinus carpio*, during short-term copper exposure: interactions between Cu^{2+} and plasma cortisol elevation. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 374-381.
- de Lima M.N., Laranja D.C., Bromberg E., Roesler R., Scroder N.** (2005). Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav. Brain Res.* 156, 139-143.
- de Olmos J.S., Beltramino C.A., de Olmos de Lorenzo S.** (1994). Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia, and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.* 16(6), 545-61.
- Dethloff G.M., Schlenk D., Khan S., Bailey H.C.** (1999). The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Envir. Contam. Toxicol.* 36, 415-423.
- Deng B.S., Nakamura A., Zhang W., Yanagisawa M., Fukuda Y., Kuwaki T.** (2007). Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. *J. Appl. Physiol.* 103,1772-1779.
- De Oliveira-Filho E.C., Matos Lopes R., Paumgarten F.J.R.** (2004). Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere.* 56,369-374.
- Dobrowolska J., Dehnhardt M., Matusch A., Zoriy M., Palomero-Gallagher N., Koscielniak P., Zilles K., Becker J.S.** (2008). Quantitative imaging of zinc, copper and lead in three distinct regions of the human brain by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 74, 717-723.
- Dominguez L., Morona R., Joven A., Gonzalez A., Lopez J.M.** (2010). Immunohistochemical localization of orexins (hypocretins) in the brain of reptiles and its relation to monoaminergic systems. *J. Chem. Neuroanat.* 39, 20-34.
- D'Souza S.M., Brown I.R.** (1998). Constitutive expression of heat shock proteins Hsp90, Hsc70, Hsp70 and Hsp60 in neural and non-neural tissues of the rat during postnatal development. *Cell Stress Chaperones* 3,188-199.
- Duncan J.A., Storey K.B.** (1991). Subcellular enzyme binding and the regulation of glycolysis in anoxic turtle brain. *Am. J. Physiol. Regul. Integ. Comp. Physiol.* 262, R517-R523.
- Dundjerski J., Predic J., Kovač T., Pavković N., Ivanišević L., Čvoro A., Matić G.** (2000). A possible role of metallothionein and heat shock proteins in glucocorticoid receptor protection against cadmium intoxication. *Arch. Biol. Sci.* 52, 89-95.
- Dunn A.J., Berridge C.W.** (1990). Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses?. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 15, 71-100.
- Echeverria P.C., Picard D.** (2010). Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim. Biophys. Acta.* 1803(6),641-649.

- Eder K.J., Leutenegger C.M., Köhler H.R., Werner I.** (2009). Effects of neurotoxic insecticides on heat-shock proteins and cytokine transcription in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17, 182-190.
- Elbaz I., Yelin-Bekerman L., Nicenboim J., Vatine G., Appelbaum L.** (2012). Genetic ablation of hypocretin neurons alters behavioral state transitions in zebrafish. *J. Neurosci.* 32(37), 12961-12972.
- Eyckmans M., Celis N., Horemans N., Blust R., De Boeck G.** (2011). Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquat. Toxicol.* 103(1-2), 112-120.
- Eyckmans M., Tudorache C., Darras V.M., Blust R., De Boeck G.** (2010). Hormonal and ion regulatory response in three freshwater fish species following waterborne copper exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 152, 270-278.
- Eriksson K.S., Sergeeva O.A., Selbach O., Haas H.L.** (2004). Orexin (hypocretin)/dynorphin neurons control GABAergic inputs to tuberomammillary neurons. *Eur.J. Neurosci.* 19, 1278-1284.
- España R.A., Valentino R.J., Berridge C.W.** (2003). Fos immunoreactivity in hypocretin-synthesizing and hypocretin-1 receptor-expressing neurons: effects of diurnal and nocturnal spontaneous waking, stress and hypocretin-1 administration. *Neuroscience.* 121, 201–217.
- Facciolo R.M., Crudo M., Giusi G., Alò R., Canonaco M.** (2009). Light- and Dark- dependent Orexinergic neuronal signals promote neurodegenerative phenomena accounting for distinct behavioral responses in the teleost *Thalassoma pavo*. *J. Neurosci. Res.* 87,748-757.
- Facciolo R.M., Crudo M., Giusi G., Canonaco M.,** (2010). GABAergic influences on ORX receptor-dependent abnormal motor behaviors and neurodegenerative events in fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243,77-86.
- Facciolo R.M., Crudo M., Zizza M., Giusi G., Canonaco M.** (2011). Feeding behaviors and ORXR- β -GABA A R subunit interactions in *Carassius auratus*. *Neurotoxicol. Teratol.* 33(6), 641-650.
- Farrell W.J., Delville Y., Wilczynski W.** (2003). Immunocytochemical localization of orexin in the brain of the green anole lizard (*Anolis carolinensis*), *Soc. Neur.* 33(828),4.
- Feder M., Hofmann G.E.** (1999). Heat shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243-282.
- Finney D.J.** (1989). Probit Analysis. third ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Folgueira M., Anadòn R., Yañez J.** (2005). Experimental study of the connections of the preglomerular nuclei and corpus mamillare in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Brain. Res. Bull.* 66, 361-364.
- Forsyth R.B., Candido P.M., Babich S.L., Iwama G.K.** (1997). Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease. *J. Aquat. Animal Health.* 9, 18-25.
- Foster J.A., Brown I.R.** (1997). Differential induction of heat shock mRNA in oligodendrocytes, microglia, and astrocytes following hyperthermia. *Mol. Brain Res.* 45(2), 207-218.

- Fu L.Y., Acuna-Goycolea C., van den Pol A.N.** (2004). Neuropeptide Y inhibits hypocretin/orexin neurons by multiple presynaptic and postsynaptic mechanisms: tonic depression of the hypothalamic arousal system. *J. Neurosci.* 24, 8741-8751.
- Fujiki N., Yoshida Y., Ripley B., Honda K., Mignot E., Nishino S.** (2001). Changes in CSF hypocretin 1 (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *Neuroreport.* 12, 993-997.
- Furuse M., Ando R., Bungo T., Ao R., Shimojo M., Masuda Y.** (1999). Intracerebroventricular injection of orexins does not stimulate food intake in neonatal chicks. *Br. Poult. Sci.* 40, 698-700.
- Gaggelli E., Kozlowski H., Valensin D., Valensin G.** (2006). Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem. Rev.* 106, 1995-2044.
- Galli C.L., Corsini E., Marinovich M.** (2004). Tossicologia. Edit. Piccin. 219-220.
- Gallo L., Lucadamo L., Mezzotero A., Morisi A., Battezzore M., Fenoglio S.** (2011). First data on the freshwater fish fauna of Calabria (southern Italy). *Italian J. Zool.* iFirst:1-6.
- Gao X., Du Z., Patel T.B.** (2005). Copper and zinc inhibit Galphas function: a nucleotide-free state of Galphas induced by Cu^{2+} and Zn^{2+} . *J. Biol. Chem.* 280(4), 2579-2586.
- Garza A., Vega R., Soto E.** (2006). Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med. Sci. Monit.* 12, RA57-65.
- Gerges N.Z., Tran I.C., Backos D.S., Harrell J.M., Chinkers M., Pratt W.B., Esteban J.A.** (2004). Independent Functions of hsp90 in Neurotransmitter Release and in the Continuous Synaptic Cycling of AMPA Receptors. *J. Neurosci.* 24(20), 4758-4766.
- Giusi G., Facciolo R.M., Alò R., Carelli A., Madeo M., Brandmayr P., Canonaco M.** (2005). Some environmental contaminants influence motor and feeding behaviors in the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*) via distinct cerebral histamine receptor subtypes. *Environ. Health Perspect* 113, 1522-1529.
- Giusi G., Alò R., Crudo M., Facciolo R.M., Canonaco M.** (2008). Specific cerebral heat shock proteins and histamine receptor cross-talking mechanisms promote distinct lead-dependent neurotoxic responses in teleosts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227, 248-256.
- Giusi G., Alò R., Crudo M., Di Vito A., Facciolo R.M., Canonaco M.** (2010). Environmental stressors and neurobiological features of marine teleosts: Histamine receptors as targets. *Crit. Rev. Toxicol.* 49(7), 620-632.
- Giustiniani J., Daire V., Cantaloube I., Durand G., Pous C., Perdiz D., Baillet A.** (2009). Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53. *Cell. Signal.* 21, 529-539.
- Goel G., Guo M., Ding J., Dornbos D. 3rd, Ali A., Shenaq M., Guthikonda M., Ding Y.** (2010). Combined effect of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and heat shock protein (HSP)-70 in reducing apoptotic injury in hypoxia: a cell culture study. *Neurosci. Lett.* 483(3), 162-166.
- Goldstein G.W.** (1990). Lead poisoning and brain cell function. *Environ. Health Perspectives.* 89, 91-94.

- Grad I, Picard D.** (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell Endocrinol.* 275(1-2), 2-12.
- Gravato C., Teles M., Oliveira M., Santos M.A.** (2006). Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla Anguilla L.* – the influence of pre-exposure to β -naphthoflavone. *Chemosphere.* 65, 1821-1830.
- Grosell M.** (2006). Intestinal anion exchange in marine fish osmoregulation. *J. Exp. Biol.* 209, 2813-2827.
- Grosell M., Blanchard J., Brix K.V., Gerdes R.** (2007). Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquat. Toxicol.* 84, 162-172.
- Grosell M., Boetius I., Hansen J.M., Rosenkilde P.** (1996). Influence of pre-exposure to sub-lethal levels of copper on ^{64}Cu uptake and distribution among tissues of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Comp. Physiol. Biochem. Part C* 114, 229-235.
- Grosell M.H., Hogstrand C., Wood C.M.** (1997). Copper uptake and turnover in both Cu acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 38, 257-276.
- Grosell M.H., Hogstrand C., Wood C.M.** (1998). Renal Cu and Na excretion and hepatic Cu metabolism in both Cu acclimated and non acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 40, 275-291.
- Grosell M., McDonald M.D., Walsh P.J., Wood C.M.** (2004). Effects of prolonged copper exposure on the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*). II. Copper accumulation, drinking rate, and Na^+/K^+ -ATPase activity. *Aquat. Toxicol.* 68, 263-275.
- Grosell M., Nielsen C., Bianchini A.** (2002). Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 133, 287-303.
- Guo R., Ki J.S.** (2012). Differential transcription of heat shock protein 90 (HSP90) in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* by copper and endocrine-disrupting chemicals. *Ecotoxicology.* 21(5), 1448-1457.
- Hainzl O., Lapina M.C., Buchner J., Richter K.** (2009). The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* 284, 22559-22567.
- Hammerschmidt C.R., Sandheinrich M.B., Wiener J.G., Rada R.G.** (2002). Effects of dietary methylmercury on reproduction of fathead minnows. *Environ. Sci. Technol.* 36, 877-883.
- Handy R.D.** (2003). Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 135, 25-38.
- Handy R.D., Eddy F.B., Baines H.** (2002). Sodium-dependent copper uptake across epithelia: a review of rationale with experimental evidence from gill and intestine. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes.* 1566, 104-115.
- Handy R.D., Sims D.W., Giles A., Campbell H.A., Musonda M.M.** (1999). Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquat. Toxicol.* 47, 23-41.

- Hara J., Beuckmann C.T., Nambu T., Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Sugiyama F., Yagami K., Goto K., Yanagisawa M., Sakurai T.** (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*. 30(2), 345-354.
- Harada S., Fujita-Hamabe W., Tokuyama S.** (2011). Effect of orexin-A on post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage. *J. Pharm. Sci.* 115, 155-163.
- Hartl F.U., Hayer-Hartl M.** (2002). Protein folding. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein". *Science*. 295, 1852-1858.
- Hartl F.U.** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 381, 571-580.
- Hashemi S., Blust R., De Boeck G.** (2008). The effect of starving and feeding on copper toxicity and uptake in Cu acclimated and non-acclimated carp. *Aquat. Toxicol.* 86, 142-147.
- Hayashida N., Fujimoto M., Tan K., Prakasam R., Shinkawa T., Li L., Ichikawa H., Takii R., Nakai A.** (2010). Heat shock factor 1 ameliorates proteotoxicity in cooperation with the transcription factor NFAT. *EMBO J.* 29(20), 3459-3469.
- Haynes A.C., Jackson B., Chapman H., Tadayyon M., Johns A., Porter R.A., Arch J.R.** (2000). A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul. Pept.* 96, 45-51.
- Hecker J.G., McGarvey M.** (2011). Heat shock proteins as biomarkers for the rapid detection of brain and spinal cord ischemia: a review and comparison to other methods of detection in thoracic aneurysm repair. *Cell Stress Chaperones*. 16(2), 119-131.
- Herrero P., Pè Rez P., Abades N.N., Hardy O., Torres B.** (1999). Tectotectal connectivity in goldfish. *J. Comp. Neurol.* 411, 455-471.
- Heilig M.** (2004). The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropep.* 38, 213-224.
- Horvath T.L., Peyron C., Diano S., Ivanov A., Aston-Jones G., Kilduff T.S., van Den Pol A.N.** (1999). Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervations of the locus coeruleus noradrenergic system. *J. Comp. Neurol.* 415, 145-159.
- Hwang G.W.** (2012). Role of Intracellular Defense Factors against Methylmercury Toxicity. *Biol. Pharm. Bull.* 35(11), 1881-1884.
- Huesa G., van den Pol A.N., Finger T.E.** (2005). Differential distribution of hypocretin (orexin) and melanin-concentrating hormone in the goldfish brain. *J. Comp. Neurol.* 488, 476-491.
- Ida T., Nakahara K., Murakami T., Hanada R., Nakazato M., Murakami N.** (2000). Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Bhiocem. Biophys. Res. Commun.* 270, 318-23.
- Ikenaga T., Yoshida M., Uematsu K.** (2005). Morphology and immunohistochemistry of efferent neurons of the goldfish corpus cerebelli. *J. Comp. Neurol.* 487, 300-311.
- Ikenaga T., Yoshida M., Uematsu K.** (2002). Efferent connections of the cerebellum of the goldfish, *Carassius auratus*. *Brain Behav. Evol.* 60(1), 36-51.
- Iwama G.K., Thomas P.T., Forsyth R.B., Vijayan M.M.** (1998). Heat shock protein expression in fish. *Fish Biol. Fisheries.* 8, 35-56.

- Jackson S.E.** (2012). Hsp90: Structure and Function. *Top. Curr. Chem.* In press.
- Jászberényi M, Bujdosó E, Pataki I, Telegdy G.** (2000). Effects of orexins on the hypothalamic-pituitary-adrenal system. *J. Neuroendocrinol.* 12, 1174-1178.
- Jeziarska B., Katarzyna Ł., Malgorzata W.** (2009). The effects of heavy metals on embryonic development of fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 625-640.
- Johansson D., Nilsson G.E., Törnblom E.** (1995). Effects of anoxia on energy metabolism in crucian carp brain slices studied with microcalorimetry. *J. Exp. Biol.* 198, 853-859.
- Johansson D., Nilsson G.E.** (1995). Roles of energy status, KATP channels and channel arrest in fish brain K⁺ gradient dissipation during anoxia. *J. Exp. Biol.* 198, 2575-2580.
- Jomova K., Valko M.** (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 283(2-3), 65-87.
- Jones I., Kille P., Sweeney G.** (2005). Cadmium delays growth hormone expression during rainbow trout development. *J. Fish. Biol.* 59, 1015-1022.
- Johnson A., Carew E., Sloman K.A.** (2007). The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 84, 431-438.
- Johren O., Neidert S.J., Kummer M., Dendorfer A., Dominiak P.** (2001). Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinol.* 142, 3324-3331.
- Jurvich D.A., Sistonen L., Kroes R.A., Morimoto R.I.** (1992). Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science.* 255, 1243-1245.
- Kagawa N., Mugiyama Y.** (2002). Brain HSP70 mRNA expression is linked with plasma cortisol levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a potential predator. *Zoolog Sci.* 19(7), 735-740.
- Kalra S.P., Dube M.G., Pu S., Xu B., Horvath T.L., Kalra P.S.** (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 20(1), 68-100.
- Karlsson R.M., Holmes A., Heilig M., Crawley J.N.** (2005). Anxiolytic-like actions of centrally administered neuropeptide Y, but not galanin, in C57BL/6J mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 80, 427-436.
- Karunanithi S., Barclay I.R., Brown I.R., Robertson R.M., Atwood H.L.** (2002). Enhancement of presynaptic performance in transgenic *Drosophila* over-expressing heat shock protein Hsp70. *Synapse.* 44, 8-14.
- Karunanithi S., Barclay J.W., Robertson R.M., Brown I.R., Atwood H.L.** (1999). Neuroprotection at *Drosophila* synapses conferred by prior heat shock. *J. Neurosci.* 19, 4360-4369.
- Kaslin J., Panula P.** (2001). Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 440, 342-377.
- Kaslin J., Nystedt J.M., Ostergard M., Peitsaro N., Panula P.** (2004). The orexin/ hypocretin system in zebrafish is connected to the aminergic and cholinergic systems. *J. Neurosci.* 24:2678-2689.

- Kaslin J., Ganz J., Brand M.** (2008) Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363(1489),101-22.
- Katayama S., Hamasu K., Shigemi K., Cline M.A., Furuse M.** (2010). Intracerebroventricular injection of orexin-A, but not orexin-B, induces arousal of layer-type neonatal chicks. *Comp. Biochem. Physiol. A.*
- Kato T., Yamada Y., Yamamoto N.** (2012). Ascending gustatory pathways to the telencephalon in goldfish. *J. Comp. Neurol.* 520, 2475-2499.
- Kayaba Y., Nakamura A., Kasuya Y., Ohuchi T., Yanagisawa M., Komuro I., Fukuda Y., Kuwaki T.** (2003). Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol.* 285(3):R581-93.
- Kiang J.G., McClain D.E.** (1993). Effect of heat shock, $(Ca^{2+})_i$, and cAMP on inositol trisphosphate in human epidermoid A-431 cells. *Am. J. Physiol.* 264, C1561-C1569.
- Kirsche W.** (1960). Experimentelle untersuchungen zur frage der regeneration und function des tectum opticum con *Carassius carassius* L. *Zeitschr.f.mikro.-anat. Forschung.* 67,140-182.
- Kolmakov N.N., Hubbard P.C., Lopes O., Canario A.V.** (2009). Effect of acute copper sulfate exposure on olfactory responses to amino acids and pheromones in goldfish (*Carassius auratus*). *Environ. Sci. Technol.* 43, 8393-83999.
- Kojima K., Kamijo M., Kageyama H., Uchiyama M., Shioda S., Matsuda K.** (2009). Neuronal relationship between orexin-A- and neuropeptide Y-induced orexigenic actions in goldfish. *Neuropeptides.* 43, 63-71.
- Kolmakov N.N., Hubbard P.C., Lopes O., Canario A.V.** (2009). Effect of acute copper sulfate exposure on olfactory responses to amino acids and pheromones in goldfish (*Carassius auratus*). *Environ. Sci. Technol.* 43, 8393-8399.
- Korotkova T.M., Sergeeva O.A., Eriksson K.S., Haas H.L., Brown R.E.** (2003). Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J. Neurosci.* 23(1), 7-11.
- Kottelat M., Freyhof J.** (2007). *Handbook of European Freshwater Fishes.* Publications Kottelat, Cornol (CH).
- Kukkonen J.P., Holmqvist T., Ammoun S., Akerman K.E.O.** (2002). Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, 1567-1591.
- Kuru M., Ueta Y., Serino R., Nakazato M., Yamamoto Y., Shibuya I., Yamashita H.** (2000). Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport.*11, 1977-1980.
- Kusch R.C., Krone P.H., Chivers D.P.** (2008). Chronic exposure to low concentrations of waterborne cadmium during embryonic and larval development results in the long-term hindrance of antipredator behavior in zebrafish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27(3), 705-710.
- Kuz'mina V.V.** (2011). The influence of zinc and copper on the latency period for feeding and the food uptake in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquat Toxicol.* 102, 73-78.
- Kuwaki T.** (2011). Orexin links emotional stress to autonomic functions. *Auton. Neurosci.* 161(1-2), 20-27.

- Lang M., Soll R.M., Durrenberger F., Dautzenberg F.M., Beck-Sickinger A.G.** (2004). Structure activity studies of orexin A and orexin B at the human orexin 1 and orexin 2 receptors led to orexin 2 receptor selective and orexin 1 receptor preferring ligands. *J. Med. Chem.* 47, 1153-1160.
- Lange A., Ausseil O., Segner H.** (2002). Alterations in tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comp. Biochem. Physiol. C* 131, 231-243.
- Lee B., Duong C.N., Cho J., Lee J., Kim K., Seo Y., Kim P., Choi K., Yoon J.** (2012). Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Biomed Biotechnol.* 2012, 262670.
- Le Guével R., Petit F.G., Le Goff P., Métivier R., Valotaire Y., Pakdel F.** (2000). Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. *Biol. Reprod.* 63, 259-266.
- Letelier M.E., Lepe A.M., Faundez M., Salazar J., Marin R., Aracena P., Speisky H.** (2005). Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 151, 71-82.
- Levenson C.W.** (2005). Trace metal regulation of neuronal apoptosis: from genes to behavior. *Physiol. Behav.* 86, 399-406.
- Li Y., Li S., Sui N., Kirouac G. J.** (2009). Orexin-A acts on the paraventricular nucleus of the midline thalamus to inhibit locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93, 506-514.
- Li J., Quabius E.S., Wendelaar Bonga S.E., Flik G.** (1998). Effect of waterborne copper on branchial chloride cells and Na⁺/K⁺-ATPase activities in *Mozambique tilapia* (*Oreochromis mossambicus*). *Aquat. Toxicol.* 43, 1-11.
- Lin L. Faraco J., Li R., Kadotani H., Rogers W., Lin X., Qiu X., de Jong P.J., Nishino S., Mignot E.** (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell.* 98(3), 365-376.
- Linder M.C.** (1991). Biochemistry of Copper. *Plenum Press*, New York.
- Linnik P.M., Zubenko I.B.** (2000). Role of bottom sediments in the secondary pollution of aquatic environments by heavy-metal compounds. *Lakes and Reserv.: Research and Management* 5, 11-21.
- Liu H., Chen H., Jing J., Ma X.** (2012). Cloning and characterization of the HSP90 beta gene from *Tanichthys albonubes* Lin (Cyprinidae): effect of copper and cadmium exposure. *Fish Physiol. Biochem.* 38(3), 745-756.
- Liu R.J., van den Pol A.N., Aghajanian G.K.** (2002). Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J. Neurosci.* 22(21), 9453-9464.
- Loones M.T., Chang Y., Morange M.** (2000). The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggests a role in neuronal and non-neuronal differentiation. *Cell Stress Chaperones.* 5(4), 291-305.

- Lopez J.M., Dominguez L., Moreno N., Gonzalez A.** (2009a). Comparative immunohistochemical analysis of the distribution of orexins (hypocretins) in the brain of amphibians, *Peptides*. 30, 873-887.
- Lopez J.M., Dominguez L., Moreno N., Morona R., Joven A., Gonzalez A.** (2009b). Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the brain of the lungfishes *Protopterus dolloi* and *Neoceratodus forsteri*. *Brain Behav. Evol.* 74, 302-322.
- Luoma S.M., Rainbow P.S.** (2005). Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1921-1931.
- Lushchak V., Lushchak L.P., Mota A.A., Hermes-Lima M.** (2001). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol. Integr. Reg. Comp. Physiol.* 280, R100-R107.
- Lutsenko S.** (2010). Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14(2), 211-217.
- Lund P.E., Shariatmadari R., Uustare A., Detheux M., Parmentier M., Kukkonen J.P., Åkerman K.E.O.** (2000). The orexin OX1 receptor activates a novel Ca²⁺ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 275, 30806-30812.
- Machado B.H., Bonagamba L.G., Dun S.L., Kwok E.H., Dun N.J.** (2002). Pressor response to microinjection of orexin/hypocretin into rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Regul. Pept.* 104, 75-81.
- Macken A., Giltrap M., Ryall K., Foley B., McGovern E., McHugh B., Davoren M.** (2009). A test battery approach to the ecotoxicological evaluation of cadmium and copper employing a battery of marine bioassays. *Ecotoxicol.* 18, 470-480.
- Maekawa S, Iino S, Miyata S.** (2003). Molecular characterization of detergent- insoluble cholesterol-rich membrane microdomain (raft) of central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1610, 216-270.
- Mahler S.V., Smith R.J., Moorman D.E., Sartor G.C., Aston-Jones G.** (2012). Multiple roles for orexin/hypocretin in addiction. *Prog. Brain Res.* 198, 79-121.
- Makhnevych T, Houry WA.** (2012). The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochim. Biophys. Acta.* 1823(3), 674-682.
- Manzon L.A.** (2002). The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125, R291-R310.
- Manchado M., Salas-Leiton E., Infante C., Poncea M., Asensioa E., Crespoa A., Zuastia E., Canavatea J.P.** (2008). Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene.* 416, 77-84.
- Marcus J.N., Aschkenasi C.J., Lee C.E., Chemelli R.M., Saper C.B., Yanagisawa M., Elmquist J.K.** (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 435(1), 6-25.
- Martin C.C., Tang P., Bernardo G., Krone P.H.** (2001). Expression of the chaperonin 10 gene during zebrafish development. *Cell Stress Chaperones.* 6, 38-43.

- Matsuda K., Kang K.S., Sakashita A., Yahashi S., Vaudry H.** (2011). Behavioral effect of neuropeptides related to feeding regulation in fish. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1220:117-126.
- Matsumoto N, Yoshida M, Uematsu K.** (2007). Effects of partial ablation of the cerebellum on sustained swimming in goldfish. *Brain Behav. Evol.* 70(2), 105-114.
- Matta M.B., Linse J., Cairncross C., Francendese L., Kocan R.M.** (2001). Reproductive and transgenerational effects of methylmercury or Aroclor 1268 on *Fundulus heteroclitus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(2), 327-35.
- Mazzocchi G., Malendowicz L.K., Gottardo L., Aragona F., and Nussdorfer G.G.** (2001). Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylylate cyclase-dependent signaling cascade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 778-782.
- McDonald R.J., Hong N.S., Craig L.A., Holahan M.R., Louis M., Muller R.U.** (2005). NMDA-receptor blockade by CPP impairs post-training consolidation of a rapidly acquired spatial representation in rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1201-1213.
- McCormick C.A., Hernandez D.V.** (1996). Connections of octaval and lateral line nuclei of the medulla in the goldfish, including the cytoarchitecture of the secondary octaval population in goldfish and catfish. *Brain. Behav. Evol.* 47, 113-137.
- Meek J., Nieuwenhuys R.** (1998). Holosteans and teleosts. In: Nieuwenhuys R., Ten Donkelaar H.J., Nicholson C., editors. *The central nervous system of vertebrates*, vol. 2. Berlin: Springer. 759-937.
- McGeer J.C., Szebedinszky C., McDonald D.G., Wood C.M.** (2000a). Effect of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquat. Toxicol.* 50, 245-256.
- McGeer J.C., Szebedinszky C., Mc Donald D.G., Wood C.M.** (2000b). Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat. Toxicol.* 50, 231-243.
- Mieiro C.L., Pereira M.E., Duarte A.C., Pacheco M.** (2011). Brain as a critical target of mercury in environmentally exposed fish (*Dicentrarchus labrax*) - Bioaccumulation and oxidative stress profiles. *Aquat. Toxicol.* 103, 233-240.
- Miura T., Maruyama K., Shimakura S.I., Kaiya H., Uchiyama M., Kangawa K., Shioda S., Matsuda K.** (2007). Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin. *Peptides.* 28, 1207-1213.
- Miyayama T., Arai Y., Hirano S.** (2012). Environmental exposure to silver and its health effects. *Nihon Eiseigaku Zasshi.* 67(3), 383-399.
- Monteiro SM, Mancera JM, Fontainhas-Fernandes A, Sousa M.** (2005). Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 141(4), 375-383.
- Morimoto R.I., Santoro M.G.** (1998). Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacological targets for cytoprotection. *Nat. Biotechnol.* 16, 833-838.
- Morimoto N., Hashimoto K., Okada R., Mochida H., Uchiyama M., Kikuyama S., Matsuda K.** (2011). Inhibitory effect of corticotropin-releasing factor on food intake in the bullfrog, *Aquarana catesbeiana*. *Peptides.* 32(9), 1872-1875.

- Muchowski P.J., Wacker J.L.** (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature Rev. Neurosc.* 6 (1),11-22.
- Müller Y.M., Rivero L.B., Carvalho M.C., Kobus K., Farina M., Nazari E.M.** (2008). Behavioral impairments related to lead-induced developmental neurotoxicity in chicks. *Arch. Toxicol.* 82, 445-451.
- Muraki Y., Yamanaka A., Tsujino N., Kilduff T.S., Goto K., Sakurai T.** (2004). Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT_{1A} receptor. *J. Neurosci.* 24, 7159-66.
- Nambu T., Sakurai T., Mizukami K., Hosoya Y., Yanagisawa M., Goto K.** (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res.* 827, 243-260.
- Nakamachi T., Matsuda K., Maruyama K., Miura T., Uchiyama M., Funahashi H., Sakurai T., Schioda S.** (2006). Regulation by orexin of feeding behaviour and locomotor activity in the Goldfish. *J. of Neuroendocrinol.* 18, 290-297.
- Nakano K., Iwama G.K.** (2002). The 70-kDa heat shock protein response in twointertidal sculpins *Oligocottus maculosus* and *Oligocottus synderi*: relationship of Hsp70 and thermal tolerance. *Comp. Physiol. Biochem.* 133, 79-94.
- Näslund E., Ehrstrom M., Ma J., Hellstrom P., Kirchgessner A.L.** (2002). Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 282, G470-479.
- Nelson R.J.** (1995). Biological rhythms and behavior. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Nemoto T., Sato N.** (1998). Oligomeric forms of the 90-kDa heat shock protein. *Biochem. J.* 330, 989-995
- Niimi M., Sato M., Taminato T.** (2001). Neuropeptide Y in central control of feeding and interactions with orexin and leptin. *Endocrine.* 14, 269–273.
- Nilsson G.E.** (2001). Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol. Sc.* 16, 217-221.
- Nilsson G.E., Hylland P., Löfman C.O.** (1994). Anoxia and adenosine induce increased cerebral blood flow in crucian carp. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 267, R590-R595.
- Nilsson G.E.** (1990). Long-term anoxia in crucian carp – changes in the levels of amino-acid and monoamine neurotransmitters in the brain, catecholamines in chromaffin tissue, and liver-glycogen. *J. Exp. Biol.* 150:295-320.
- Nishino S., Nishino S., Ripley B., Overeem S., Lammers G.J., Mignot E.** (2000) Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet.* 355 (9197), 39-40.
- Nishino S.** (2007). Narcolepsy: pathophysiology and pharmacology. *J. Clin. Psychiatry.* 68 suppl. 13, 9-15.
- Northcutt R.G.** (2006). Connections of the Lateral and Medial Divisions of the Goldfish Telencephalic Pallium. *J. Comp. Neurol.* 494, 903-943.
- Northcutt R.G., Butler A.B.** (1993). The diencephalon of the Pacific herring, *Clupea harengus*: retinofugal projections to the diencephalon and optic tectum. *J. Comp. Neurol.* 328, 547-561.

- Novak C.M., Jiang X.L., Wang C.F., Teske J.A., Kotz C.M., Levine J.A.** (2005). Caloric restriction and physical activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci. Lett.* 383, 99-104.
- Núñez A., Rodrigo-Angulo M.L., De Andrés I., Garzón M.** (2009). Hypocretin/Orexin Neuropeptides: Participation in the Control of Sleep-Wakefulness Cycle and Energy Homeostasis. *Current Neuropharmacol.* 7, 50-59.
- Ohkubo T., Boswell T., Lumineau S.** (2002). Molecular cloning of chicken prepro-orexin cDNA and preferential expression in the chicken hypothalamus, *Biochim. Biophys. Acta.* 1577, 476-480.
- Ohkubo T., Tsukada A., Shamoto K.** (2003). cDNA cloning of chicken orexin receptor and tissue distribution: sexually dimorphic expression in chicken gonads. *J. Mol. Endocrinol.* 31, 499-508.
- Ohno K., Sakurai T.** (2008). Orexin neuronal circuitry: Role in the regulation of sleep and wakefulness. *Frontiers in neuroendocrinol.* 29,70-87.
- Onishchenko N., Karpova N., Sabri F., Castren E., Ceccatelli S.** (2008). Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *J. Neurochem.* 106,1378-1387.
- Osborne N., Sherry J., Rendell J.L., Currie S.** (2007). The role of hsp90 in 17 α -ethynylestradiol-induced endocrine disruption in rainbow trout hepatocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68,13-19.
- Padmini E.** (2010). Physiological adaptations of stressed fish to polluted environments: role of heat shock proteins. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 206, 1-27.
- Pandey S., Parvez S., Ahamd Ansar R., Ali M., Kaur M., Hayat F., Ahmad F., Raisuddin S.** (2008). Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata*. *Bloch. Chem. Biol. Interact.* 174, 183-192.
- Panula P.** (2010). Hypocretin/orexin in fish physiology with emphasis on zebrafish. *Acta Physiol.* 198, 381-386.
- Pearl L.H., Prodromou C.** (2000). Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10(1),46-51.
- Peyron C., Tighe D.K., van den Pol A.N., de Lecea L., Heller H.C., Sutcliffe J.G., Kilduff T.S.** (1998a). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 18, 9996-10015.
- Peyron C., Petit J., Rampon C., Jouvét M., Luppi P.** (1998b). Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neurosci.* 82, 443-468.
- Pinho G.L., Pedroso M.S., Rodrigues S.C., Souza S.S., Bianchini A.** (2007). Physiological effects of copper in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: waterborne versus waterborne plus dietborne exposure. *Aquat. Toxicol.* 84(1), 62-70.
- Pratt W.B., Morishima Y., Murphy M., Harrell M.** (2006). Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* (172),111-138.
- Prigge S.T., Mains R.E., Eipper B.A., Amzel L.M.** (2000). New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1236-59.

- Prober D.A., Rihel J., Onah A.A., Sung R.J., Schier A.F.** (2006). Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in *zebrafish*. *J. Neurosci.* 26, 13400-13410.
- Prodromou C., Roe S.M., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H.** (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell.* 90, 65-75.
- Qian Y., Tiffany-Castiglioni E.** (2003). Lead-induced endoplasmic reticulum (ER) stress responses in the nervous system. *Neurochem. Res.* 28, 153-162.
- Rabindran S.K., Haroun R.I., Clos J., Wisniewski J., Wu C.** (1993). Regulation of heat shock factor trimerization: role of a conserved leucine zipper. *Science.* 259, 230-234.
- Rajotte J.W., Couture P.** (2002). Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1296-1304.
- Rabergh C.M., Airaksinen S., Soitomo A., Bjorklund H.V., Johansson T., Nikinmaa M., Sistonen L.** (2000). Tissue specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor1 mRNAs in response to heat stress. *J. Exp. Biol.* 203, 1817-1824.
- Reddy G.R., Basha M.R., Devi C.B., Suresh A., Baker J.L., Shafeek A., Heinz J., Chetty C.S.** (2003). Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 347-352.
- Redgate E.S., Gellhorn E.** (1958). Respiratory activity and the hypothalamus. *Am. J. Physiol.* 193, 189-194.
- Reichard J.F., Schnekenburger M., Puga A.** (2007). Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 352, 188-192.
- Reid, S.G., Fritsche, R., Jonsson, A.C.** (1995). Immunohistochemical localization of bioactive peptides and amines associated with the chromaffin tissue of 5 species of fish. *Cell Tissue Res.* 280, 499-512.
- Ritossa F. M.** (1962). A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia.* 18, 571-573.
- Rivera-Mancia S., Perez-Neri I., Rios C., Tristan-Lopez L., Rivera-Espinosa L., Montes S.** (2010). The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chem. Biol. Interact.* 186, 184-199.
- Roberts R.J., Agius C., Saliba C., Bossier P., Sung Y.Y.** (2010). Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *J. Fish Dis.* 33(10), 789-801.
- Rodgers R.J., Halford J.C., Nunes de Souza R.L., Canto de Souza A.L., Piper D.C., Arch J.R., Blundell J.E.** (2000). Dose-response effects of orexin-A on food intake and the behavioural satiety sequence in rats. *Regul Pept.* 96, 71-84.
- Rodgers R.J., Halford J.C., Nunes de Souza R.L., Canto de Souza A.L., Piper D.C., Arch J.R., Upton N., Porter R.A., Johns A., Blundell J.E.** (2001). SB-334867, a selective orexin-1 receptor antagonist, enhances behavioural satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1444-1452.

- Rodgers R.J., Ishii Y., Halford J.C.G., Blundell J.E.** (2002). Orexins and appetite regulation. *Neuropep.* 36:303–25.
- Roos D.H., Puntel R.L., Santos M.M., Souza D.O.G., Farina M., Nogueira C.W., Aschner M., Burger M.E., Barbosa N.B.V., Rocha J.B.T.** (2009). Guanosine and synthetic organoselenium compounds modulate methylmercury-induced oxidative stress in rat brain cortical slices: involvement of oxidative stress and glutamatergic system. *Toxicol. In Vitro.* 23(2),302-307.
- Rosati A.M., Traversa U., Lucchi R., Poli A.** (1995). Biochemical and pharmacological evidence for the presence of A1 but not A2a adenosine receptors in the brain of the low vertebrate teleost *Carassius auratus* (goldfish). *Neurochem. Int.* 26,411-423.
- Sanchez E.R., Toft D.O., Schlesinger MJ, Pratt WB.** (1985). Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat-shock protein. *J. Biol. Chem.* 260(23), 2398-2401.
- Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Richardson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S., Arch J.R., Buckingham R.E., Haynes A.C. Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.S., Terrett J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J., Yanagisawa M.** (1998). Orexins and Orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 92, 573-585.
- Sakisaka T., Meerlo T., Matteson J., Plutner H., Balch W.E.** (2002). Rab-alphaGDI activity is regulated by a Hsp90 chaperone complex. *Embo J.* 21, 6125-6135.
- Sakurai T.** (1999). Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regul. Pept.* 85(1),25-30.
- Sakurai T.** (2007). The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat. Rev. Neurosci.* 8,171-181.
- Salas C., Rodríguez F., Vargas J.P., Durán E., Torres B.** (1996). Spatial learning and memory deficits after telencephalic ablation in goldfish trained in place and turn maze procedures. *Behav. Neurosci.* 110,965-980.
- Samson W.K., Taylor M.M, Follwell M., Ferguson A.V.** (2002). Orexin actions in hypothalamic paraventricular nucleus: physiological consequences and cellular correlates. *Regul. Pept.* 104, 97-103.
- Samson W.K., Bagley S.L., Ferguson A.V., White M.M.** (2007). Hypocretin/orexin type 1 receptor in brain: role in cardiovascular control and the neuroendocrine response to immobilization stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292(1), R382-387.
- Santos N.R., Huston J.P., Brandão M.L.** (2003). Blockade of histamine H2 receptors of the periaqueductal gray and inferior colliculus induces fear-like behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75,25-33.
- Saper C.B., Chou T.C., Scammell T.E.** (2001). The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci.* 24, 726-731.
- Sathiyaa R., Campbell T., Vijayan M.M.** (2001). Cortisol modulates hsp90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 679-685.

- Scheiber I.F., Dringen R.** (2012). Astrocyte functions in the copper homeostasis of the brain. *Neurochem. Int.* Doi: 10.1016/j.neuint.2012.08.017.
- Scott G.R., Sloman K.A.** (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68:369-392.
- Scott G.R., Sloman K. A., Rouleau C., Wood C.M.** (2003). Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 206,1779-1790.
- Sellin M.K., Kolok A.S.** (2006). Cd exposures in fathead minnows: effects on adult spawning success and reproductive physiology. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51(4), 594-599.
- Serpa R.F., de Jesus E.F., Anjos M.J., de Oliveira L.F., Marins L.A., do Carmo M.G., Correa Junior J.D., Rocha M.S., Lopes R.T., Martinez A.M.** (2008). Topographic trace-elemental analysis in the brain of Wistar rats by X-ray microfluorescence with synchrotron radiation. *Anal. Sci.* 24, 839-842.
- Soga S., Kozawa T., Narumi H., Akinaga S., Irie K., Matsumoto K., Sharma S.V., Nakano H., Mizukami T., Hara M.** (1998). Radicol leads to selective depletion of Raf kinase and disrupts K-Ras-activated aberrant signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 822-828.
- Soleimani A.F., Zulkifli I., Omar A.R., Raha A.R.** (2012). The relationship between adrenocortical function and Hsp70 expression in socially isolated Japanese quail. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 161(2), 140-144.
- Sharma D.R., Wani W.Y., Sunkaria A., Kandimalla R.J., Verma D., Cameotra S.S., Gill KD.** (2012). Quercetin Protects Against Chronic Aluminum-Induced Oxidative Stress and Ensuing Biochemical, Cholinergic, and Neurobehavioral Impairments in Rats. *Neurotox. Res.* Doi: 10.1016/j.neuint.2012.08.017.
- Sharma P., Mishra K.P.** (2006). Aluminum-induced maternal and developmental toxicity and oxidative stress in rat brain: response to combined administration of Tiron and glutathione. *Reprod. Toxicol.* 21(3), 313-321.
- Shibata M., Mondal M.S., Date Y., Nakazato M., Suzuki H., Ueta Y.** (2008). Distribution of orexins-containing fibers and contents of orexins in the rat olfactory bulb. *Neurosci. Res.* 61, 99-105.
- Sikder D., Kodadek T.** (2007). The neurohormone orexin stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity. *Genes Dev.* 21, 2995-3005.
- Singletary K.G., Deviche P., Strand C., Delville Y.** (2006) Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the brain of a male songbird, the house finch, *Carpodacus mexicanus*. *J. Chem. Neuroanat.* 32, 81-89.
- Skaggs H.S., Henry R.P.** (2002). Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133, 605-612.
- Sloman K.A., Scott G.R., Diao Z., Rouleau C., Wood C.M., McDonald D.G.** (2003) Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 65(2), 171-185.

- Smart D., Jerman J.C., Brough S. J., Rushton S.L., Murdock P.R., Jewitt F., Elshourbagy N.A., Ellis C.E., Middlemiss D.N., Brown F.** (1999). Characterisation of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese Hamster Ovary cell-line using FLIPR. *Br. J. Pharmacol.* 128, 1-3.
- Smith B.N., Davis S.F., van Den Pol A.N., Xu W.** (2002). Selective enhancement of excitatory synaptic activity in the rat nucleus tractus solitarius by hypocretin 2. *Neuroscience*.115, 707–714.
- Sokolowska P., Urbanska A., Namiecinska M., Bieganska K., Zawilska J.B.** (2012). Orexins promote survival of rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 506, 303-306.
- Song N., Zhang G., Geng W., Liu Z., Jin W., Li L., Cao Y., Zhu D., Yu J., Shen L.** (2012). Acid sensing ion channel 1 in lateral hypothalamus contributes to breathing control. *PLoS One*.7(7), e39982.
- Sonoda S., Fukumoto K., Izumi Y., Yoshida H., Tsumuki H.** (2006). Cloning of heat shock protein genes (hsp90 and hsc70) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 63, 36-47.
- Spinazzi R., Andreis P.G., Rossi G.P., Nussdorfer G.G.** (2006). Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol. Rev.* 58, 46-57.
- Stebbins C.E., Russo A.A., Schneider C., Rosen N., Hartl F.U., Pavletich N.P.** (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell.* 89, 239-250.
- Stevenson T.C., Ciccotosto G.D., Ma X.M., Mueller G.P., Mains R.E., Eipper B.A.** (2003). Menkes protein contributes to the function of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase. *Endocrinol.* 144, 188-200.
- Strausak D, Mercer JF, Dieter HH, Stremmel W, Multhaup G.** (2001). Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res. Bull.*15;55(2), 175-185.
- Stringari J., Nunes A.K.C., Franco J.L., Bohrer D., Garcia S.C., Dafre A.L., Milatovic D., Souza D.O., Rocha J.B.T., Aschner M., Farina M.** (2008). Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227,147-154.
- Sumpter J.P.** (1997). In: **Iwama G.K., Pickering A.D., Sumpter J.P., Schreck C.B.** (Eds.), *The Endocrinology of Stress*. Cambridge University Press, Cambridge. 95-118.
- Sutcliffe J.G., de Lecea L.** (2002). The hypocretins: setting the arousal threshold. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 339-349.
- Taheri S., Sunter D., Dakin C., Moyes S., Seal L., Gardiner J., Rossi M., Ghatei Mand Bloom S.** (2000). Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system. *Neurosci. Lett.* 279, 109-112.
- Taipale M., Jarosz D.F. Lindquist S.** (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11(7), 515-528.

- Takai T., Takaya T., Nakano M., Akutsu H., Nakagawa T., Aimoto S., Nagai K., Ikegami T.** (2006). Orexin-A is composed of a highly conserved C-terminal and a specific, hydrophilic N-terminal region, revealing the structural basis of specific recognition by the orexin-1 receptor. *J. Peptide Sci.* 12, 443-454.
- Takiguchi M., Achanzar W.E., Qu W., Li G., Waalkes M.P.** (2003). Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp. Cell. Res.* 286, 355-365.
- Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J.** (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *EXS.* 101, 133-164.
- Tellis M.S., Alsop D., Wood C.M.** (2012). Effects of copper on the acute cortisol response and associated physiology in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 155, 281-289.
- Thorpe A.J., Kotz C.M.** (2005). Orexin A in the nucleus accumbens stimulates feeding and locomotor activity. *Brain Res.* 10508(1-2), 156-62.
- Tobaben S., Thakur P., Fernandez-Chacon R., Sudhof T.C., Rettig J., Stahl B.** (2001). A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron.* 31, 987-999.
- Toscano C.D., Guilarte T.R.** (2005). Lead neurotoxicity: From exposure to molecular effects. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49, 529-554.
- Toshinai K., Date Y., Murakami N., Shimada M., Mondal M.S., Shimbara T., Guan J.L., Wang Q.P., Funahashi H., Sakurai T., Shioda S., Matsukura S., Kangawa K., Nakazato M.** (2003). Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway, *Endocrinol.* 144: 1506–1512.
- Tsutsumi S., Mollapour M., Prodromou C., Lee CT, Panaretou B, Yoshida S, Mayer MP, Neckers LM.** (2012). Charged linker sequence modulates eukaryotic heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 2937-2942.
- U.S. Environmental Protection Agency. Ecological monitoring research division environmental monitoring systems laboratory.** Probit analysis program, version 1.5.
- Van Waarde A.** (1991). Alcoholic fermentation in multicellular organisms. *Physiol. Zool.* 64, 895-920.
- van den Pol T.M., Nolan M.F., Lee K., Richardson P.J., Buijs R.M., Davies C.H., Spanswick D.** (2003). Orexins induce increased excitability and synchronisation of rat sympathetic preganglionic neurones. *J. Physiol.* 549, 809-821.
- Vaughan C.K., Mollapour M., Smith J.R., Truman A., Hu B., Good V.M., Panaretou B., Neckers L., Clarke P.A., Workman P., Piper P.W., Prodromou C., Pearl L.H.** (2008). Hsp90-dependent activation of protein kinases is regulated by chaperone-targeted dephosphorylation of Cdc37. *Mol. Cell.* 31, 886-895.
- Volkoff H.** (2012). Sleep and orexins in non mammalian vertebrates. *Vitam. Horm.* 89, 315-339.
- Volkoff H., Bjorklund J.M., Peter R.E.** (1999). Stimulation of feeding behavior and food consumption in the goldfish, *Carassius auratus*, by orexin-A and orexin-B. *Brain Res.* 846, 204-209.

- Volkoff H.** (2006). The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine- related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. *Comp.Biochem. physiol.* 144, 325-331.
- Vornanen M, Asikainen J, Haverinen J.** (2011). Body mass dependence of glycogen stores in the anoxia-tolerant crucian carp (*Carassius carassius* L.). *Naturwissenschaften.* 98(3), 225-232.
- Walsh D., Li Z., Wu Y., Nagata K.** (1997). Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development. *Cell Mol. Life Sci.* 53, 198-211.
- Wang Y., Hodgkinson V., Zhu S., Weisman G.A., Petris M.J.** (2011). Advances in the understanding of mammalian copper transporters. *Adv. Nutr.* 2(2), 129-137.
- Watanabe S., Kuwaki T., Yanagisawa M., Fukuda Y., Shimoyama M.** (2005). Persistent pain and stress activate pain-inhibitory orexin pathways. *Neuroreport* 16, 5-8.
- Weis F., Moullintraffort L., Heichette C., Chrétien D., Garnier C.** (2010). The 90-kDa Heat shock protein Hsp90 protects tubulin against thermal denaturation. *J. Bio. Chem.* 285(13), 9525-9534.
- Weyts F.A.A., Flik G., Rombout J.H.W.M., Verburgvan Kemenade B.M.L.** (1998). Cortisol induces apoptosis in activated B cells, not in other lymphoid cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Develop. Comp. Immunol.* 22, 551-562.
- White L.D., Cory-Slechta D.A., Gilbert M.E., Tiffany-Castiglioni E., Zawia N.H., Virgolini M., Rossi-George A., Lasley S.M., Qian Y.C., Riyaz Basha Md.** (2007). New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 225, 1-27.
- Whitmore D., Foulkes N.S., Sassone- Corsi P.** (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404, 87-91.
- Williams R.H., Burdakov D.** (2008). Hypothalamic orexins/hypocretins as regulators of breathing. *Expert. Rev. Mol. Med.* 10, e28.
- Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Yanagisawa M.** (2001). To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 429-458.
- Winsky-Sommerer R., Boutrel B., de Lecea L.** (2005). Stress and arousal: the corticotrophin-releasing factor/hypocretin circuitry. *Mol Neurobiol.* 32(3), 285-294.
- Winsky- Sommerer R., Yamanaka A., Diano S., Borok E., Roberts A.J., Sakurai T., Kilduff T.S., Horvath T.L., de Lecea L.** (2004). Interaction between the corticotrophin- releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J. Neurosci.* 24(50):11439-48.
- Wood C.M.** (2001). Toxic responses of the gill. In: Schlenk D., Benson W.H. (Eds.), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts.* Taylor and Francis, London, UK. 1-89.
- Wong K.K.Y., Ng S.Y.L., Lee L.T.O., Ng H.K.H., Chow B.K.C.** (2011). Orexins and their receptors from fish to mammals: a comparative approach. *General and Comp. Endocrinol.* 171, 124-130.
- Wullimann M.F.** (1994). The teleostean torus longitudinalis: a short review on its structure, histochemistry, connectivity, possible function and phylogeny. *Eur. J. Morphol.* 32, 235-242.

- Wullimann, M. F., Rupp, B., Reichert, H.** (1996). Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas. *Medical*. 144.
- Xiao C., Gu Y., Zhou C.Y., Wang L., Zhang M.M., Ruan D.Y.** (2006). Pb²⁺ impairs GABAergic synaptic transmission in rat hippocampal slices: A possible involvement of presynaptic calcium channels. *Brain Res.* 1088, 93-100.
- Xu B., Xu Z.F., Deng Y., Liu W., Yang H.B., Wei Y.G.** (2012). Protective effects of MK-801 on methylmercury-induced neuronal injury in rat cerebral cortex: involvement of oxidative stress and glutamate metabolism dysfunction. *Toxicology*. 300(3), 112-120.
- Xu M., Volkoff H.** (2007). Molecular characterization of prepro-orexin in Atlantic cod (*Gadus morhua*): cloning, localization, developmental profile and role in food intake regulation. *Mol. Cell Endocrinol.* 271, 28-37.
- Yamamoto N., Ito H.** (2005). Fiber connections of the anterior preglomerular nuclei in Cyprinids with notes on telencephalic connections of the preglomerular complex. *The Journal of Comparative Neurology*. 491, 212-233.
- Yamano T., Mizukami S., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Udono H.** (2008) Hsp90-mediated assembly of the 26S proteasome is involved in major histocompatibility complex class I antigen processing. *J. Biol. Chem.* 283, 28060-28065.
- Yang L., Zha J., Li W., Li Z., Wang Z.** (2010). Atrazine affects kidney and adrenal hormones (AHs) related genes expressions of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Aquat Toxicol.* 97(3), 204-211.
- Yenari M. A.** (2002). Heat shock proteins and neuroprotection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 513, 281-299.
- Yoshida Y., Fujiki N., Nakajima T., Ripley B., Matsumura H., Yoneda H., Mignot E., Nishino S.** (2001). Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur. J. Neurosci.* 14(7), 1075-1081.
- Yoshida K., McCormack S., España R.A., Crocker A., Scammell T.E.** (2006). Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 494(5), 845-861.
- Yokogawa T., Marin W., Faraco J., Pezeron G., Appelbaum L., Zhang J., Rosa F., Murrain P., Mignot E.** (2007). Characterization of sleep in zebrafish and insomnia in hypocretin receptor mutants. *PLoS Biol.* 5 e277.
- Young J.C., Moarefi I., Hartl F.U.** (2001). Hsp90: A specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.* 154, 267-273.
- Yuan L.B., Dong H.L., Zhang H.P., Zhao R.N., Gong G., Chen X.M., Zhang L.N., Xiong L.** (2011). Neuroprotective effect of orexin-A is mediated by an increase of hypoxia-inducible factor-1 activity in rat. *Anesthesiology*. 114, 340-354.
- Zhang W., Fukuda Y., Kuwaki T.** (2005). Respiratory and cardiovascular actions of orexin-A in mice. *Neurosci. Lett.* 385, 131-136.
- Zhdanova I.V., Wang S.Y., Leclair O.U., Danilova N.P.** (2001). Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res.* 903, 263-268.

- Zhu Y., Miwa Y., Yamanaka A., Yada T., Shibahara M., Abe Y., Sakurai T., Goto K.** (2003). Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J. Pharmacol. Sci.* 92, 259-266.
- Zhu L., Onaka T., Sakurai T., Yada T.** (2002). Activation of orexin neurones after noxious but not conditioned fear stimuli in rats. *Neuroreport.* 13, 1351-1353.
- Zimmer A.M., Barcarolli I.F., Wood C.M., Bianchini A.** (2012). Waterborne copper exposure inhibits ammonia excretion and branchial carbonic anhydrase activity in euryhaline guppies acclimated to both fresh water and sea water. *Aquat. Toxicol.* 122-123, 172-180.
- Zizza M., Giusi G., Crudo M., Canonaco M., Facciolo R.M.** (2012). Lead-induced neurodegenerative events and abnormal behaviors occur via ORXRergic/GABA_ARergic mechanisms in a marine teleost. *Aquat. Toxicol.* Doi:10.1016/j.aquatox.2012.11.011.
- Zou J., Guo Y., Guettouche T., Smith D.F., Voellmy R.** (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell.* 94, 471-80.
- Zupanc G.K.** (2006). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 192(6), 649-670.
- Zupanc G. K., Ott R.** (1999). Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced. *Exp. Neurol.* 160,78-87.
- Zupanc G.K., Sîrbulescu R.F.** (2011). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Eur. J. Neurosci.* 34(6), 917-929.