

Università degli Studi della Calabria

Dottorato di Ricerca in Biologia Animale

XIX CICLO

Disciplina: NEUROANATOMIA COMPARATA (BIO/06)

***Ruolo neuroprotettivo del sistema istaminergico
e delle HSPs nella risposta allo stress ambientale
nell'encefalo del Teleosteo *Thalassoma pavo****

di

GIUSEPPINA GIUSI

TUTOR: Dr. Rosa Maria Facciolo

COORDINATORE: Prof. Bruno Tota

INDICE

ABSTRACT	1
RIASSUNTO	3
INTRODUZIONE	5
STATO DELL'ARTE	10
Gli stressori ambientali negli habitats acquatici	11
1. I contaminanti ambientali	12
1.1 <i>Metalli pesanti</i>	12
1.2 <i>Gli xenoestrogeni</i>	15
2. Il modello sperimentale: <i>Thalassoma pavo</i>	19
Ruolo neuroprotettivo di markers neuronali nella risposta allo stress	21
3. Istamina	21
4. Recettori istaminergici	26
5. Ruolo fisiologico dell'istamina	44
6. Le proteine dello stress (HSPs)	47
6.1 Ruolo delle HSPs in SNC	49
6.2 HSPs nei Pesci	54
MATERIALI E METODI	57
Parte I: Organizzazione anatomica dell'encefalo di <i>Thalassoma pavo</i>	58
1.1 Metodo di Nissl	58
Parte II: Studio comportamentale ed analisi neurodegenerative	59
2.1 Animali e trattamenti	60
2.2 Studio comportamentale	62
2.3 ACS: protocollo sperimentale	62
2.4 Fluoro-Jade B: protocollo sperimentale	63
Parte III: Ruolo neuroprotettivo del sistema istaminergico e HSPs	64
3.1 Animali e trattamenti	65
3.2 Autoradiografia recettoriale	66
3.3 Estrazione dell'RNA totale	69
3.4 Trascrizione inversa	70
3.5 La reazione a catena della DNA polimerasi	70
3.6 Ibridazione <i>in situ</i>	73
3.7 Analisi Statistica	75

RISULTATI	76
Parte I: Organizzazione anatomica dell'encefalo di <i>Thalassoma pavo</i>	77
1.1 Il Telencefalo	77
1.2 Il Mesencefalo	80
1.3 Il Diencefalo	82
1.4 Il Cervelletto	85
Parte II: Studio comportamentale ed analisi neurodegenerative	87
2.1 Studio Comportamentale	87
2.2 Analisi neurodegenerative	90
Parte III: Ruolo neuroprotettivo del sistema istaminergico e HSPs	93
3.1 Distribuzione autoradiografica del sistema istaminergico	93
3.2 Caratterizzazione dei sottotipi recettoriali istaminergici	95
3.3 Identificazione molecolare di H ₂ R e H ₃ R	96
3.4 Pattern di espressione di H ₂ R e H ₃ R	106
3.5 Antagonisti istaminergici: attività comportamentali e trascrizionali	107
3.6 Effetti degli stressori ambientali sull'espressione di H ₂ R e H ₃ R	113
3.7 Effetti di Cim e Tio sull'espressione dei recettori istaminergici in presenza dei contaminanti ambientali	117
3.8 Identificazione molecolare di HSP90 e HSP70	122
3.9 Effetti degli stressori ambientali sull'espressione di HSP90 e HSP70	129
3.10 Effetti di Cim e Tio sull'espressione delle HSPs in presenza dei contaminanti ambientali	133
DISCUSSIONE	139
BIBLIOGRAFIA	147

Abstract

At date, a plethora of evidence regarding adverse morpho-functional and neurobiological aspects provoked by environmental stressors has been considered. Following exposure to stress factors, the activation of both specific neurosignaling mechanisms and molecular pathways account for the modulation of complex adaptative processes in animal targets. In this context, the aim of the present work is to analyze the neuroprotective role of histaminergic system and *heat shock proteins* towards environmental neurotoxicants such as heavy metals and pesticides in the Teleost *Thalassoma pavo*. Such environmental stressors account for significative alterations on motor and feeding behaviors, which are tightly correlated to neurodegenerative processes in key brain regions. In this work, the molecular characterization of H₂R and H₃R permits to demonstrate a conservation of specific sequences, which appear to be determinant for the function of such subtypes in phylogenetically distant Vertebrates. Moreover, the inactivation of H₂R and H₃R, via the application of selective antagonists (Cimetidine and Thioperamide, respectively), induces in *Thalassoma pavo* abnormal behaviors and trascriptional alterations, suggesting a clear physiological role of this neuronal system in our model. The expression pattern of histaminergic system results to be highly modified following exposure to environmental stressors in a region-dependent manner. In particular, the heavy metals induce downregulations of H₂R mRNA in some brain regions such as mesencephalon, which is involved in the regulation of motor activities. On the other hand, both heavy metal and pesticides account for an increasement of H₃R trascriptional levels in hypothalamic and telencephalic areas. From the concomitant exposure to histaminergic antagonists and environmental stressors, it was possible to demonstrate that H₂R blockade is responsible for enhanced stressors-dependent neurotoxic effects. On the contrary, the inhibition of H₃R activities accounts for an amelioration of both abnormal motor behaviors and neuronal damage induced by such environmental stressors. Consistent with the effects on histaminergic system, heavy metals and pesticides also promote the activation of cellular defence processes through the stimulation of *heat shock proteins* trascription, i.e. HSP90 e HSP70. The histaminergic antagonists are able to influence *heat shock proteins* expression, inducing a heterogeneous pattern of HSP90 trascription levels, while in the case of HSP70 an enhanced expression is typical of all encephalic areas. The results of the present work demonstrate, for the first time in an aquatic Vertebrate, a possible interactions between histaminergic system-dependent neurosignaling activities and HSPs *network*, which could be represent an important neurophysiological mechanism operating during neuronal stress conditions.

Riassunto

Lo studio dei meccanismi neuronali e dei *pathways* molecolari che permettono alle cellule nervose di attivare sofisticate risposte adattative in condizioni di stress rappresenta un campo di ricerca attivo ed in continua evoluzione. In tale contesto, lo scopo del presente lavoro è di definire il ruolo neuroprotettivo esercitato dal sistema istaminergico e dalle *heat shock proteins* nel Teleosteo *Thalassoma pavo* in condizioni di stress ambientale indotto dall'esposizione a metalli pesanti (cadmio e piombo) e pesticidi (endosulfan ed atrazina). Tali stressori inducono nel Teleosteo significative alterazioni dei comportamenti motori ed alimentari, che si correlano agli eventi neurodegenerativi osservati in aree encefaliche critiche per l'espletamento di tali risposte. Dopo aver condotto la caratterizzazione molecolare di H₂R e H₃R, in questo lavoro l'inattivazione funzionale di tali sottotipi mediante applicazione di antagonisti selettivi (Cimetidina e Tioperamide, rispettivamente) induce significative alterazioni comportamentali e trascrizionali, suggerendo un preciso ruolo fisiologico per tali sottotipi in *Thalassoma pavo*. L'espressione del sistema istaminergico appare essere sensibilmente alterata dall'azione neurotossica esercitata dai contaminanti ambientali, i cui effetti neurotossici sono osservabili in aree encefaliche distinte. In particolare, gli effetti dei metalli pesanti sono caratteristici di aree strettamente implicate in attività motorie e si traducono in significativi decrementi dei livelli trascrizionali di H₂R, mentre nel caso di H₃R, ambedue le categorie di contaminanti promuovono un incremento dei livelli trascrizionali di tale sottotipo in aree ipotalamiche e telencefaliche. Dall'analisi degli effetti indotti dal trattamento combinato di tali antagonisti ed i suddetti contaminanti ambientali, è emerso che il blocco di H₂R determina un'esacerbazione degli effetti neurotossici dipendenti dall'azione di metalli pesanti e pesticidi. Al contrario, l'inibizione dell'influenza di H₃R sui comportamenti motori anomali di *Thalassoma pavo* determina un generale miglioramento del danno neuronale provocato da tali contaminanti. Accanto agli effetti sul sistema istaminergico, i metalli pesanti ed i pesticidi promuovono l'attivazione di meccanismi di difesa cellulare incrementando l'espressione delle *heat shock proteins*, in particolare HSP90 e HSP70. L'analisi dell'influenza degli antagonisti istaminergici sull'espressione di tali proteine dimostra un andamento eterogeneo nel pattern di espressione della HSP90, in alcuni casi sovrapponibile a quello osservato per i sottotipi istaminergici, mentre nel caso della HSP70 si osserva un generale incremento dei livelli di espressione in tutte le aree considerate. I risultati ottenuti in questo studio dimostrano per la prima volta in un Vertebrato acquatico una possibile interazione funzionale tra i sottotipi istaminergici ed il *network* delle HSPs, che potrebbe rappresentare un meccanismo neurofisiologico cruciale nella regolazione della risposta allo stress.

Introduzione

Negli ultimi decenni, il crescente interesse verso la comprensione dei meccanismi cellulari che regolano le condizioni omeostatiche negli organismi viventi, ha diretto la ricerca scientifica verso molteplici approcci sperimentali, dalle analisi molecolari alle applicazioni terapeutiche. Le strategie adattative, che sono particolarmente efficaci nella risposta ad eventi stressori, comprendono modificazioni nell'espressione genica, nella struttura e nella funzionalità cellulare (Kregel, 2001). A livello neuronale, lo studio delle alterazioni neurobiologiche determinate da eventi di stress ha consentito l'identificazione di specifici meccanismi neuronali e *pathways* molecolari che permettono alle cellule nervose di attivare sofisticate risposte adattative, che si traducono in attivazione/inattivazione di sistemi neuronali e cambiamenti dell'eccitabilità di membrana (McEwen, 2004). Dal punto di vista evolutivo, tali processi mantengono un elevato grado di conservazione, suggerendo l'esistenza di numerose analogie nei meccanismi di trasmissione neuronale operanti in condizioni di stress, oltre che nell'organizzazione spaziale delle aree encefaliche nelle diverse classi dei Vertebrati (Kaslin and Panula, 2001). In particolare, i Vertebrati acquatici sono sensibilmente condizionati dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente con il quale interagiscono, per le continue variazioni di natura biotica ed abiotica ed il costante rischio di contaminazione che deriva dall'immissione di sostanze inquinanti quali metalli pesanti (Goodwin et al., 2003) e xenoestrogeni (Gormley et al., 2003). Tra i metalli pesanti, il piombo (Pb^{2+}) ed il cadmio (Cd^{2+}) sono attualmente considerati neurotossine cerebrali, in grado di competere con lo ione Ca^{2+} ed interferire con i suoi sistemi di trasporto che, nel sistema nervoso centrale (SNC), svolgono un ruolo importante per il rilascio dei neurotrasmettitori e per la regolazione della trasmissione sinaptica (Minami et al., 2001; Struzyńska et al., 2005). Tra gli xenoestrogeni, i pesticidi Endosulfan (Ed) ed Atrazina (Atr) esplicano la loro azione neurotossica alterando i processi di comunicazione intercellulari che risultano critici per la differenziazione neuronale (Kumar and Gilula, 1996) e sono in grado di interferire con le attività neuroendocrine, lo sviluppo sessuale e la riproduzione negli animali target (Hayes et al., 2002).

Per tali motivi, i Pesci marini costituiscono un utile indicatore biologico della contaminazione degli ambienti acquatici, poichè permettono un'analisi a diversi livelli dell'organizzazione biologica (Burger et al., 2002). Negli studi neurotossicologici, le analisi comportamentali costituiscono un "*link*" d'eccellenza tra processi fisiologici ed ecologici e possono rappresentare un potente strumento per evidenziare il potenziale impatto di agenti tossici sulla crescita, sviluppo e sessualità degli animali target. In questo contesto, i Pesci costituiscono un valido modello sperimentale, dal momento che il loro repertorio comportamentale è ecologicamente rilevante, facilmente osservabile e quantificabile. In

generale, infatti, la *performance* comportamentale di un animale acquatico segue una specifica sequenza fisiologica che può essere influenzata e modificata da stimoli esterni agenti sulla complessità funzionale dei *networks* neuronali (Weber and Spieler, 1994). L'alterazione di queste specifiche sequenze e il loro mancato completamento verosimilmente è il risultato di un danno, cui consegue un'alterata risposta comportamentale a stimoli ambientali e fisiologici con gravi conseguenze sull'alimentazione, la fuga dai predatori, la riproduzione ed i rapporti sociali, oltre che sulla stessa sopravvivenza. Sulla base di tali considerazioni, nel presente lavoro si è cercato di analizzare specifiche strategie adattative e meccanismi di plasticità neuronale messi in atto dal Teleosteo *Thalassoma pavo* in condizioni di stress ambientale indotto dall'esposizione a metalli pesanti (Cd^{2+} e Pb^{2+}) e pesticidi (Ed e Atr). La scelta di tale Teleosteo quale modello è dovuta non solo alla sua posizione sistematica, alle proprietà neuroanatomiche simili a quelle di Vertebrati terrestri, ma anche per il ruolo ecologico di pulitore che esso svolge in specifiche nicchie ecologiche (Zander and Sotje, 2002).

Tra i meccanismi neuronali che consentono alle cellule nervose di attivare specifiche risposte adattative, il sistema istaminergico modula non solo svariate funzioni fisiologiche quali il bilancio energetico e la temperatura (Brown et al., 2001), ma anche la risposta allo stress nei Mammiferi (Canonaco et al., 2005); evidenze per le quali tale sistema può essere considerato un buon candidato in questo lavoro per l'analisi dei meccanismi neuroprotettivi in risposta allo stress ambientale in *Thalassoma pavo*. L'amina biogena istamina (HA) regola molte funzioni neurofisiologiche quali i cicli sonno-veglia, il *feeding*, la locomozione e l'apprendimento mediante il legame con i specifici sottotipi recettoriali (H_{1-4}R), appartenenti alla famiglia dei recettori associati alle proteine G (Leurs et al., 2005). Tra tali sottotipi, H_3R mostra localizzazione sia presinaptica che postsinaptica, che gli conferisce anche il ruolo di autorecettore, regolando con un meccanismo di *feedback* negativo il rilascio di HA (Brown et al., 2001). La caratterizzazione del sistema istaminergico ha raggiunto la sua completezza nei Mammiferi, sia dal punto di vista molecolare che funzionale, mentre scarsissime sono attualmente le conoscenze relative a tale sistema nei Pesci. In questi ultimi, le uniche evidenze sperimentali sono state ottenute attraverso la caratterizzazione farmacologica dei sottotipi H_1R e H_3R nell'encefalo di *Oreochromis niloticus* e *Danio rerio*, rispettivamente, (Peitsaro et al., 2000; Choich et al., 2004); altri studi hanno, inoltre, dimostrato che l'inibizione del sottotipo H_1R in *Carassius auratus* è correlata ad un aumento della ricerca del cibo (Spieler et al., 1999). Il presente studio costituisce dunque la prima analisi sperimentale volta all'identificazione di tale sistema in una specie acquatica quale *Thalassoma pavo* attraverso metodiche che comprendono saggi di legame recettoriale e

caratterizzazione molecolare dei sottotipi H₂R e H₃R mediante RT-PCR, sequenziamento genico ed ibridazione *in situ*. Accanto a tali indagini molecolari, in questo studio è stata condotta anche una caratterizzazione farmacologica di tali sottotipi recettoriali mediante trattamento intraperitoneale (i.p.) con antagonisti selettivi per H₂R e H₃R. La scelta di investigare le proprietà molecolari e funzionali di questi specifici sottotipi recettoriali si basa sul loro diretto coinvolgimento in attività comportamentali e fenomeni neurodegenerativi. Nei Mammiferi il trattamento con antagonisti per il sottotipo H₂R induce, infatti, un aggravamento del danno neuronale provocato da stati ischemici (Otsuka et al., 2003). D'altra parte, l'utilizzo di selettivi antagonisti per H₃R è stato correlato a disturbi nelle funzioni cognitive e deficit sensoriali e motori, che caratterizzano i più comuni disordini neurodegenerativi quali la malattia di Alzheimer (AD) e la schizofrenia (Fox et al., 2005). Al fine di verificare il ruolo neuroprotettivo di tali sottotipi in *Thalassoma pavo*, sono stati condotti trattamenti simultanei con antagonisti istaminergici ed i suddetti contaminanti ambientali, valutando le potenziali variazioni di espressione del sistema istaminergico in tali condizioni sperimentali. Inoltre, l'identificazione dei danni neuronali indotti dall'azione dei diversi agenti stressori presi in esame è stata condotta mediante l'applicazione di diverse tecniche neurodegenerative quali l'*Amino Cupric Silver* (ACS) e la tecnica del Fluoro-Jade B, quest'ultima utile anche per una determinazione quantitativa del numero di neuroni danneggiati da tali trattamenti farmacologici (Anderson et al., 2005).

Accanto a sensibili variazioni nelle attività neurocomportamentali modulate da determinati sistemi di neurotrasmissione, l'esposizione continuata a fattori di stress può indurre nella cellula l'attivazione di specifici *pathways* apoptotici che promuovono la morte cellulare programmata. In tale contesto, il complesso *network* delle *Heat Shock Proteins* (HSPs) rappresenta un paradigma basilare per la regolazione coordinata di molteplici segnali apoptotici al fine di facilitare il recupero cellulare da fenomeni degenerativi. Le HSPs rappresentano una famiglia di proteine altamente conservate nel corso dell'evoluzione, delle quali alcune sono costitutivamente espresse ed altre inducibili in risposta a svariati fattori di stress sia ambientale che farmacologico (Beere, 2005). È ormai ampiamente documentato che le HSPs funzionino da *chaperones*, rinaturando e riavvolgendo proteine che hanno subito un danno conformazionale per azione di una sostanza o un agente dannoso (Rutherford and Zuker, 1994), o presentando la proteina alterata e destinata alla demolizione al complesso proteosomico (Feder and Hofmann, 1999). Tra le varie HSPs in questo lavoro l'attenzione è stata diretta verso due proteine: HSP90 e HSP70. La HSP90 si distingue dagli altri *chaperones* sia per la sua affinità verso specifici substrati quali le proteine di trasduzione del segnale, sia per la sua localizzazione nelle terminazioni presinaptiche che

postsinaptiche, ove può controllare il rilascio di neurotrasmettitori (Gerges et al., 2004). Per quanto concerne la HSP70, essa è considerata la principale proteina inducibile in SNC, in condizioni neurodegenerative quali ischemia cerebrale, *shock* termico ed ipossia (Richter-Landsberg and Goldbaum, 2003). In questo lavoro, l'integrazione dei risultati comportamentali, trascrizionali e neurodegenerativi ha permesso di analizzare i principali fattori neuroprotettivi operanti nel Teleosteo *Thalassoma pavo* in condizioni di stress ambientale. In particolare, la precisa sincronizzazione funzionale tra meccanismi di neurotrasmissione (sistema istaminergico) e fattori cellulari di regolazione (HSPs) appare determinante nella risposta che le cellule nervose mettono in atto per difendere la propria integrità strutturale e funzionale.

Stato dell'arte

GLI STRESSORI AMBIENTALI NEGLI HABITATS ACQUATICI

Gli ambienti acquatici rappresentano ecosistemi dalle specifiche caratteristiche chimico-fisiche, che risultano cruciali per la sopravvivenza degli organismi colonizzanti tali habitat. Le sostanze chimiche sono presenti negli habitat acquatici in una moltitudine di forme chimico-fisiche che ne determinano diffusione, persistenza ed accumulo non solo nei vari compartimenti ambientali ma anche negli organismi viventi. A differenza delle sostanze organiche che possono andare incontro a degradazione, gli elementi chimici mostrano frequentemente una notevole tendenza all'accumulo (Goyer, 1993). Per tali ragioni alcuni elementi, in particolar modo i metalli pesanti e pesticidi, sono stati fra le prime sostanze ad essere identificate come fattori di rischio per l'ambiente e per gli animali. Il grado di esposizione cui l'uomo è sottoposto attraverso le vie tradizionali (aria, acqua, alimenti) è sufficientemente studiato e, per taluni aspetti, adeguatamente tenuto sotto controllo attraverso l'applicazione di norme e linee-guida (Satcher, 2000). Tuttavia, il continuo aumento di fonti non convenzionali di immissione e diffusione degli elementi nell'ambiente costituisce un fattore complementare, ma non trascurabile, dell'incremento delle loro concentrazioni in specifiche realtà ambientali. Ne consegue che sia elementi riconosciuti come tossici (con particolare riferimento ai metalli pesanti) che altri normalmente essenziali per la vita (ma che hanno superato i loro livelli fisiologici) possono determinare potenziali situazioni di rischio per gli animali target. Le inalazioni di gas, vapori o miscele di questi composti sono alla base di numerosi effetti deleteri che possono andare da una semplice irritazione a patologie sistemiche (Bakand et al., 2005). In generale, l'interazione degli elementi chimici, sia essenziali che potenzialmente tossici, con gli organismi viventi e con l'ecosistema può essere valutata a pieno solo quando se ne individuino le diverse forme chimiche sotto cui essi si presentano e se ne quantifichino i corrispondenti livelli, precisando i loro meccanismi di azione. In questo contesto, il monitoraggio biologico fornisce informazioni sull'effettiva esposizione cui un gruppo di individui o una popolazione è globalmente esposta. La misura della contaminazione nei vari comparti ambientali, ovvero la stima della potenziale esposizione di un organismo attraverso l'ambiente, viene così integrata dalla dose realmente assorbita dall'individuo attraverso la misura di specifici indicatori di esposizione e di effetto. Sulla base di quanto detto sinora, appare dunque evidente come il mezzo acquatico sia il deposito di una larga schiera di sostanze chimiche ad azione stressoria (Tanabe et al., 2004) ed i disturbi a carico della componente biotica dei sistemi acquatici naturali nascono in seguito ad esposizione a miscele complesse di contaminanti in acqua o nella dieta (Hopkins et al., 2004). Per capire come agenti stressori di

vario tipo agiscono sugli organismi target è necessario comprendere i loro effetti ai diversi livelli di organizzazione biologica, che vanno da quello cellulare a quello molecolare. In tale contesto è necessario analizzare gli effetti che si verificano in seguito ad esposizione nelle diverse fasi dello sviluppo biologico (embrionale, larvale, giovanile e adulto) a concentrazioni subletali di inquinanti, che risultano tra l'altro quelle con cui gli animali sono più frequentemente a contatto (Lawrence and Hemingway, 2003). Appare dunque evidente come il piccolo pesce d'acquario, dalle caratteristiche morfo-funzionali relativamente semplici, risulti un modello sperimentale adeguato nell'analisi dei vari livelli di organizzazione biologica, dimostrando così di essere un utile modello per determinare il meccanismo/i di azione degli agenti stressori (Escher and Hermens, 2002).

1. I contaminanti ambientali

Il fenomeno di contaminazione ambientale e la sua potenzialità nel provocare un vasto spettro di effetti tossici sia sugli organismi terrestri che acquatici rappresentano un grave pericolo per la salute pubblica e per la stabilità di molti habitat. Tra gli stressori ambientali, i metalli pesanti e gli xenoestrogeni comprendono una classe di composti naturali e sintetici che possono essere definiti "endocrine disruptors" (EDs), in quanto sono in grado di alterare le funzioni endocrine negli organismi target. Malgrado esista un'ampia documentazione riguardo gli effetti tossici esercitati da tali composti sull'uomo, una completa e dettagliata spiegazione sui meccanismi mediante i quali metalli pesanti e xenoestrogeni esercitano i loro effetti sul SNC non è stata ancora completamente definita.

1.1 Metalli pesanti

I metalli pesanti rappresentano uno dei gruppi di stressori ambientali più ampiamente diffuso e pericoloso, considerato la loro capacità di provocare effetti mutagenici, teratogenici e carcinogenici nell'uomo e negli animali colpiti (Brueske and Barrett, 1991; Toscano and Guilarte, 2005). Negli organismi acquatici ed in particolare nei Pesci, il potere di bioaccumulo e le azioni di tali metalli dipendono strettamente dalla modalità di somministrazione, dalla concentrazione e dalla durata cui l'animale è esposto. In tali Vertebrati, l'esposizione acuta ad alte concentrazioni di metalli pesanti è responsabile di alterazioni permanenti nei processi di osmoregolazione branchiale ed in generale negli scambi gassosi, mentre in condizioni croniche a concentrazioni definite subletali, vengono compromesse principalmente le capacità adattative di organi interni che preferibilmente accumulano tali metalli, quali ad esempio il fegato ed il cervello (Lange et al., 2002). Ne

conseguenze che l'alterazione di attività fisiologiche direttamente regolate da tali organi, quali la riproduzione, la crescita, la corretta mobilizzazione delle risorse energetiche, accanto a deficienze nei processi modulati dal canale olfattivo, possano direttamente provocare alterazioni irreversibili delle principali attività neurocomportamentali (Wendelaar Bonga, 1997; Campana et al., 2003). Nell'ambiente acquatico, infatti, alcuni comportamenti ed in particolar modo la competizione per il cibo o la ricerca di un rifugio rappresentano una necessità primaria per la sopravvivenza degli organismi colonizzanti tale habitat. L'accumulo di elevati livelli di metalli pesanti provoca un impatto considerevole sulle caratteristiche sociali dei Pesci, compromettendo i comportamenti di predazione e l'accoppiamento (Sloman et al., 2003). In questo contesto, l'azione neurotossica esercitata dai metalli pesanti Cd^{2+} and Pb^{2+} , in antagonismo a molti processi cellulari che usano Ca^{2+} e Zn^{2+} , determina un declino funzionale in molte regioni encefaliche che svolgono un ruolo chiave nella modulazione di tali attività comportamentali (Sorell and Graziano, 1990).

Cadmio e Piombo

Cd^{2+} è considerato uno dei più importanti metalli ambientali, poichè esso è utilizzato nella manifattura delle batterie ed in molte attività industriali, ragioni per cui esso risulta ampiamente diffuso ed estremamente tossico non solo per l'uomo (Liao and Freedman, 1998). Concentrazioni di Cd^{2+} che oscillano tra 0.01 to 0.1 $\mu g/L$ sono tipiche di siti non contaminati, mentre in ambienti acquatici quali mari, fiumi o laghi altamente inquinati, tali concentrazioni possono raggiungere anche valori di 0.5 $\mu g/L$ e raggiungono gli animali o per diretta inalazione o attraverso il consumo di cibi contenenti Cd^{2+} (Waalkes et al., 1992). Inoltre, considerata la sua insolubilità in acqua, tale metallo può facilmente accumularsi in molti tessuti quali fegato, polmone e cervello, provocando danni cellulari, perdita delle attività respiratorie e soprattutto disordini neurobiologici (Cattani et al., 1996; Pinot et al., 2000). Un grande numero di evidenze riguardo gli effetti di Cd^{2+} sulla fauna acquatica riportano che tale metallo pesante è in grado di interferire con i processi fisiologici di steroidogenesi e gametogenesi, provocando alterazioni nelle funzioni riproduttive. Tale attività è strettamente correlata a modificazioni dei meccanismi di trascrizione dei geni legati alla riproduzione, come dimostrato dall'inibizione della sintesi di estradiolo e della vitellogenina nella trota (Vetillard and Bailhache, 2005). Inoltre, l'influenza di Cd^{2+} in specifici processi cellulari determina effetti irreversibili a carico di specifici organuli quali i mitocondri, cui consegue l'alterazione dei processi di respirazione e del potenziale transmembrana e lo scatenarsi di meccanismi apoptotici (Green and Reed, 1998; Hartwig, 2001). In alcuni Teleostei è stato riportato a livello cellulare la produzione di elevati livelli di

HSP70 in seguito ad esposizione a tale metallo (Gordon et al., 1997). Accanto a tali effetti, Cd^{2+} provoca l'incremento di altre proteine metallo-dipendenti quali le metallotioneine che "sequestrano" i metalli nell'ambiente cellulare, e del glutatione, suggerendo che tali proteine possano costituire le prime difese contro la tossicità da metalli in ambienti acquatici soggetti ad elevati livelli di contaminazione (Wendelaar Bonga, 1997)

Per quanto concerne il metallo pesante Pb^{2+} , esso è attualmente considerato uno dei principali agenti stressori per molti organismi, considerata la sua abbondanza in svariati habitats, in particolare quelli acquatici. Tale metallo è comunemente utilizzato nella produzione di pitture, munizioni, leghe metalliche e batterie elettriche (Del Valls et al., 2002) e ciò, accanto ad un elevato potere di rilascio e bassa reattività chimica, lo rendono altamente persistente negli ambienti acquatici. Per la sua abilità nel competere con il Ca^{2+} , lo Zn^{2+} ed altri cationi bivalenti a livello molecolare, gli effetti di Pb^{2+} coinvolgono molti processi cellulari, inducendo alterazioni nella regolazione genica, nella sintesi proteica e nel metabolismo energetico (Rogers and Wood, 2004). Nelle branchie dei Pesci, esso provoca profonde alterazioni dei *pathways* respiratori mediante una diretta inibizione dell'attività della anidrasi carbonica e della Na^+/K^+ -ATPasi (Rogers et al., 2005), cui consegue uno sbilancio nella concentrazione di Ca^{2+} dovuta ad un meccanismo antagonistico $\text{Pb}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ che induce una condizione di ipocalcemia estremamente dannosa per la sopravvivenza dell'animale (Weber, 1993). Inoltre Pb^{2+} esercita effetti tossici sull'asse ipotalamo-ipofisi, come dimostrato da alterazioni nelle attività riproduttive e nella sintesi degli estrogeni (Antonio and Leret, 2000).

I metalli pesanti e meccanismi di neurotrasmissione

Gli effetti dei metalli pesanti sui sistemi neurotrasmettitoriali non sono limitati ad un solo sito di azione pertanto tale aspetto complica l'interpretazione di tali fenomeni. Nel caso del Cd^{2+} , tale metallo pesante a livello neuronale è responsabile di un elevato numero di disordini. Molte evidenze sperimentali riportano che Cd^{2+} , quando rilasciato dai terminali neuronali delle aree amigdalari, può essere facilmente sequestrato dagli stessi neuroni presinaptici e perturbare i meccanismi di trasmissione sinaptica (Minami et al., 2001). In tale contesto, Cd^{2+} potrebbe modificare i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti ed interferire con i sistemi di co-trasporto coinvolti nel rilascio di neuromediatrici a livello di tali terminazioni sinaptiche, in particolare glutammato ed aspartato. Inoltre negli organismi acquatici, quale la trota, elevate concentrazioni di tale metallo accumulandosi nei bulbi olfattivi provocano significative alterazioni nelle risposte comportamentali a specifici segnali di allarme (Wendelaar Bonga, 1997).

Pb^{2+} è in grado di modificare molte attività comportamentali e neuronali negli organismi target. L'esatto meccanismo responsabile dell'azione neurotossica del Pb^{2+} risulta estremamente complesso, ma numerose evidenze riportano nei Mammiferi processi di perossidazione lipidica, eccitotossicità, alterazioni nella sintesi, accumulo e rilascio dei neurotrasmettitori, alterazioni nell'espressione dei recettori e danni a livello delle cellule gliali (Garza et al., 2006). Osservazioni simili sono state riportate anche nei Pesci, nei quali tale metallo agisce da neurotossina cerebrale in grado non solo di alterare il bilancio funzionale di molti neurotrasmettitori (Rademacher et al., 2003), ma anche di indurre stati di iperattività, perdita dei riflessi visivo-motori ed alterazioni nei meccanismi di apprendimento (Weber and Dingel, 1997). Accanto a tali evidenze, gli effetti di Pb^{2+} in alcuni Teleostei sono preferibilmente diretti in aree encefaliche legate alle attività riproduttive, come dimostrato dalla riduzione dei livelli di serotonina e di conseguenza l'inibizione delle gonadotropine a livello ipotalamico (Khan and Thomas, 2001). Nei Mammiferi, gli effetti neurotossici di Pb^{2+} sono osservabili anche in alcune aree telencefaliche quali l'ippocampo (HIP) e si traducono in *deficits* dei processi di apprendimento spaziale e della plasticità sinaptica (Nihei et al., 2000), strettamente correlati ad alterazioni Ca^{2+} -dipendenti del sistema glutammatergico (Toscano et al., 2003). In accordo con tali evidenze, studi recenti riportano che gli astrociti hanno la proprietà di accumulare alcuni metalli pesanti quali il Pb^{2+} , attivando i cosiddetti “depositi di Pb^{2+} ” al fine di proteggere i neuroni dall'azione neurotossica di tali metalli. In tali condizioni l'aumentata espressione dei due trasportatori per il glutammato GLAST and GLT-1 suggerisce un ruolo protettivo degli astrociti nei primi stadi di sviluppo neonatale in risposta agli elevati livelli di glutammato provocati da esposizione a Pb^{2+} (Struzynska et al., 2005).

1.2 Gli xenoestrogeni

Gli estrogeni ambientali o xenoestrogeni sono compresi nel gruppo degli EDs, in grado di alterare molte attività fisiologiche i.e. modifiche della sintesi, rilascio e/o accumulo, trasporto e metabolismo degli ormoni endogeni (Kavlock et al., 1996). Gli xenoestrogeni agiscono in maniera “estrogeno-simile” nei tessuti target di molte specie animali, dai Crostacei ai Pesci, Uccelli fino ai Mammiferi, sebbene le loro azioni biologiche in questi ultimi non sono ancora totalmente chiarite. Gli effetti di tali EDs sono stati estesamente riportati nei Pesci e comprendono inibizione della crescita gonadale e riduzione nel numero e funzionalità dei gameti (Bisson and Hontela, 2002).

Tra gli xenoestrogeni, i pesticidi rappresentano una classe di contaminanti ambientali largamente utilizzati nelle attività agricole. Tra i pesticidi, la tossicità di Ed raggiunge livelli

elevati soprattutto nei Pesci e negli Invertebrati marini per l'elevato grado di persistenza nell'interfaccia acqua-suolo (Dutta and Arends, 2003). In maniera analoga ad altri pesticidi, l'azione di tale composto perdura a lungo dopo la somministrazione iniziale, colpendo anche organismi non presenti nell'ambiente acquatico. In maniera analoga, l'erbicida Atr mostra una grande variabilità nel tipo di risposta estrogenica indotta e gli effetti tossici dipendono dalla concentrazione e dalla specie esposta (Giusi et al., 2006a).

Endosulfan e atrazina

Ed (6,7,8,9,10,10-esacloro-1,5,5a,6,9,9a-esaidro-6,9-metano-2,4,benzodioxatiepina 3-ossido) appartiene alla classe dei pesticidi conosciuti come organoclorati, caratterizzati da un'alta persistenza nell'ambiente e da un consistente tasso di bioaccumulo nei tessuti animali. Gli organoclorati sono costituiti da due anelli e presentano scarsa solubilità in acqua ed elevati livelli di solubilità nei grassi, per cui vengono facilmente assorbiti nel tessuto adiposo degli animali esposti. Ed è costituito da due isomeri α -Ed e β -Ed, genericamente presenti in una miscela racemica le cui proporzioni variano da 4:1 a 7:3 (Schmidt et al 1997). A livello molecolare il sito d'azione di tale pesticida è la matrice lipidica, che svolge un ruolo critico nella funzionalità delle membrane cellulari: l'effetto di Ed determina un incremento di permeabilità, in seguito ad aumento nella distanza intermolecolare dei fosfolipidi (Videira et al 2001). Ed è in grado di interferire con la normale attività estrogenica, provocando rilevanti effetti sulla riproduzione animale. In maniera analoga ad altri pesticidi, questo composto è infatti noto per la sua azione di mimo estrogenico (Gormley and Teather, 2003), in grado di interferire con la secrezione degli ormoni steroidei prodotti dalle cellule adrenocorticali (Bisson and Hontela, 2002). Gli organismi giovani risultano tra i più fortemente colpiti, similmente a quanto evidenziato da esperimenti condotti su individui giovani di *Micropterus salmoides* (Pan and Dutta, 1997). Un'ulteriore conferma deriva da studi su embrioni prelarvali di *Danio rerio*, in cui Ed è capace di alterare la distribuzione delle cellule germinali primordiali (Willey and Krone, 2001). Un altro estrogeno ambientale noto per i suoi potenziali effetti tossici è l'erbicida Atr (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazina), ampiamente utilizzato a livello mondiale sia come diserbante selettivo nelle piantagioni di mais che come diserbante non selettivo in maniera estensiva su terreni agricoli. Tale composto mostra elevata persistenza nei mari, laghi e soprattutto nei sedimenti (Graymore, 2001), mostrando permanenza maggiore su suoli con elevato grado di umidità, dopo abbondanti piogge e in condizioni di pH stabile. Sulla base del suo elevato potere di bioaccumulo, elevati livelli di Atr si ritrovano in molti organi degli animali target (Lloyd-Smith et al., 1999). Studi sugli effetti tossici di Atr nei Pesci hanno dimostrato grande

variabilità nella risposta che appare essere strettamente dipendente dalla dose applicata e dalla specie in esame. Gli effetti di dosi subletali di Atr nella trota includono processi di proliferazione del reticolo endoplasmatico liscio, mitocondri e lisosomi anormali, aumento in numero dei perossisomi e disorganizzazione morfologica e funzionale dell'apparato del Golgi. Sebbene gli effetti tossici di Atr nei Pesci siano stati ampiamente analizzati, i meccanismi molecolari e di citotossicità non sono ancora completamente definiti. Alcune evidenze sperimentali riportano come tale erbicida sia in grado di indurre effetti apoptotici in molti tessuti in seguito all'induzione di specie chimiche reattive all'ossigeno e conseguente alterazione del potenziale mitocondriale transmembrana (Prasad et al., 1995). Inoltre Atr stimola la proliferazione cellulare ed i meccanismi di tumorigenesi, come dimostrato in embrioni di *Danio rerio* ove si osservano fenomeni di teratogenesi che sono associati a ritardi nello sviluppo embrionale ed anomalie funzionali degli apparati circolatorio e renale. Inoltre, gli effetti di Atr appaiono anche essere diretti sulle attività comportamentali, come dimostrato da anomalie motorie osservate nei Teleostei quali una spiccata inattività e disturbi nel mantenimento dell'equilibrio (Graymore, 2001).

Gli xenoestrogeni e meccanismi di neurotrasmissione

Tra le svariate azioni cellulari svolte da Ed, l'effetto tossicologico predominante è assimilabile a quello di tossina cerebrale (Kang et al. 2001), assumendo proporzioni rilevanti che si traducono in una sovrastimolazione del SNC in seguito ad inibizione della Ca^{2+}/Mg^{2+} ATPasi. Tale enzima risulta essenziale per il trasporto dei cationi attraverso le membrane, per cui tali alterazioni determinano un accumulo di Ca^{2+} intracellulare e modificazioni nel rilascio dei neurotrasmettitori (Clark, 1997). Nelle cellule neuronali tali effetti non sono limitati esclusivamente a livello delle membrane, ma risultano compromesse anche le attività bioenergetiche mitocondriali, principalmente per azione dell'isomero α , maggiormente concentrato e biologicamente più stabile nei tessuti rispetto al sangue. È stato difatti dimostrato che tale isomero distrugge l'integrità delle membrane neuronali in colture di cellule granulari del cervelletto, comportandosi da antagonista sul flusso degli ioni Cl^- nella fisiologia dei recettori dell'acido γ -aminobutirrico (GABA; Echobichon, 1996). A livello delle membrane postsinaptiche GABAergiche, uno dei principali effetti neurotossici indotti da Ed si traduce infatti nel blocco dell'azione inibente del GABA mediante il suo legame ad alta affinità col recettore $GABA_A$, provocando evidenti effetti convulsivi (Paul and Balasubramaniam, 1997). In diverse specie acquatiche quali *Onchorhynchus mykiss*, *Pimephales promelas*, *Ictalurus punctatus* e *Lepomis macrochirus* esposizioni continue con dosi subletali di tale contaminante provocano alterazioni nella normale attività del sistema

acetilcolinergico, che si riflettono in anomalie dei processi di crescita, capacità riproduttiva e sopravvivenza. In *Oryzias latipes*, in seguito a brevi somministrazioni di Ed, vengono alterati tutti gli stadi vitali, tra cui tempo di covata, grandezza e numero delle uova deposte (Dutta et al., 2003). A livello neuronale, Ed esplica principalmente la sua azione alterando i livelli di Ca^{2+} , ed i normali processi di comunicazione intercellulari, mediati da giunzioni specifiche dette gap-junctions, che risultano critici per la differenziazione neuronale (Kumar and Gilula, 1996). In aggiunta a queste evidenze sperimentali, alcuni studi propongono per Ed anche il ruolo di mitogeno, inibendo la Ca^{2+} -ATPasi calmodulina-dipendente e compromettendo in tal modo la differenziazione cerebrale (Kang et al., 2001).

Studi condotti sugli effetti tossici di Atr nei Mammiferi hanno evidenziato come l'azione di tale erbicida sia diretta prevalentemente sulla sintesi e funzione degli ormoni sessuali in ambedue i sessi: nei maschi di ratto *Sprague-Dawley* l'esposizione quotidiana alle concentrazioni di 100 e 200 mg/Kg durante il periodo pre-puberale è in grado di ridurre la concentrazione di testosterone ematica ed intratesticolare (Trentacoste et al., 2001). D'altra parte, la somministrazione orale di Atr in ratti femmine altera il ciclo ovarico, come diretta conseguenza di uno sbilanciamento funzionale dell'ormone luteinizzante (LH) e della prolattina (Cooper et al., 2000). L'azione di Atr si estende ai *pathways* neuronali implicati nel controllo dei movimenti (sistema dopaminergico nigrostriale) e nelle complesse funzioni cognitive (sistema dopaminergico mesocorticolimbico). In tal modo, tale contaminante potrebbe rappresentare un fattore di rischio per l'insorgenza di disordini e/o disfunzioni neurodegenerative quali il morbo di Parkinson e la schizofrenia (Rodriguez et al., 2005).

Sulla base delle evidenze sperimentali sinora riportate, appare evidente che, considerato il crescente accumulo di sostanze inquinanti negli ambienti acquatici, i Vertebrati colonizzanti tali habitats, e specialmente i Teleostei, risultano un target preferenziale dell'azione neurotossica di tale erbicida. A tal proposito, gli effetti indotti da Atr risultano estremamente spiccati in animali sessualmente maturi ed a dosi non relativamente elevate: le ultime ricerche hanno infatti dimostrato come tale insetticida sia in grado di interferire con la metamorfosi e la differenziazione sessuale nelle rane (*Xenopus laevis*), provocando fenomeni di ermafroditismo e demascolinizzazione anche a basse dosi (Hayes et al., 2002). Il meccanismo d'azione potrebbe consistere in una regolazione positiva della aromatasi, enzima che catalizza la conversione degli androgeni in estrogeni in diversi tessuti quali l'ovario, il tessuto adiposo ed il cervello (Roberge et al., 2004), quest'ultimo considerato uno degli organi target più seriamente colpite dall'azione di tale agente stressorio (Lee et al., 2000; Hecker et al., 2002).

2. Il modello sperimentale: *Thalassoma pavo*

Nella classe dei Pesci, che rappresentano il più antico ed eterogeneo gruppo dei Vertebrati, i Perciformi costituiscono un ordine caratterizzato da una grande varietà di specie: tra esse si ritrova la famiglia dei Labridi, nella quale si sono evolute molteplici strategie riproduttive ed adattamenti ambientali. In tale famiglia, la donzella pavonina *Thalassoma pavo*, per l'estrema reperibilità, collocazione sistematica (fig.1) e proprietà morfo-fisiologiche, rappresenta uno degli esemplari maggiormente utilizzati in indagini morfofunzionali e neurotossicologiche (Reinboth and Brusle-Sicard., 1997; Giusi et al., 2005a).

<i>Classificazione di Thalassoma pavo</i>	
Phylum	Cordati
Subphylum	Vertebrati
Superclasse	Gnatostomi
Classe	Osteitti
Sottoclasse	Attinopterigi
Superordine	Teleostei
Ordine	Perciformi
Famiglia	Labridi
Specie	<i>Thalassoma pavo</i>

Fig.1 Classificazione di *Thalassoma pavo*.

La famiglia dei Labridi, il cui nome deriva dalle peculiari labbra molto grosse e carnose, comprende esemplari caratterizzati da un'unica pinna dorsale, il cui corpo è rivestito da scaglie di tipo cicloide. In questi animali, il nuoto avviene mediante il movimento contemporaneo delle pinne pettorali da cui prende il nome di “nuoto labriforme”. La specie *Thalassoma pavo* ha il corpo fusiforme e compresso lateralmente, la testa è massiccia e la bocca piuttosto piccola; presenta otto raggi spiniformi sulla pinna dorsale e sul capo una livrea dalla colorazione accesa (fig. 2).



Fig.2 La donzella pavonina *Thalassoma pavo*.

La variabilità cromatica della livrea consente di distinguere tra maschi maturi, il cui corpo è verde bronzo con una fascia nucale di colore tra blu e verde, e femmine ed individui giovani, che presentano fasce trasversali chiare e fasce longitudinali nere sul corpo di colore verde bronzo. Questo esemplare è particolarmente diffuso nel Mediterraneo centro-meridionale, incluso l'Adriatico, ove si nasconde negli anfratti delle rocce. *Thalassoma pavo* è una specie ermafrodita proteroginica, caratterizzata da una livrea primaria con individui femminili ed una secondaria con individui maschili. La proteroginia è di tipo diandrica, in cui molti individui si sviluppano e riproducono dapprima come femmine, ma in età avanzata si trasformano in maschi se il tasso degli stessi nella popolazione diventa piccolo. Malgrado l'individuo sessualmente maturo possa esibire tre diversi fenotipi, esistono solo due possibili fasi: una fase iniziale (IP) in cui l'individuo è femmina o maschio primario ed una fase terminale (TP) in cui i maschi sviluppano una macchia bianca dietro la testa blu ed un corpo di colore verde separato da una striscia arancione. Tali maschi TP vengono chiamati secondari in quanto generati da inversione sessuale delle femmine, oppure possono derivare da maschi primari che hanno subito un cambiamento di taglia e colore. I maschi TP sono chiaramente i maschi dominanti della popolazione e difendono il loro territorio mediante comportamenti aggressivi, in contrasto alle femmine ed ai maschi IP che manifestano un basso tasso di aggressività (Larson et al., 2003). La riproduzione dei Labridi si verifica mediante la deposizione di uova pelagiche, oppure mediante la costruzione di un nido sorvegliato dal maschio. La deposizione delle uova con la presenza di un maschio a protezione delle stesse garantisce il successo riproduttivo (Alonzo and Warner, 2000).

RUOLO NEUROPROTETTIVO DI MARKERS NEURONALI NELLA RISPOSTA ALLO STRESS

Tra i sistemi di neurotrasmissione, il sistema istaminergico è attualmente considerato uno dei più importanti sistemi recettoriali cerebrali coinvolti nelle risposte adattative a fenomeni di stress (Ito, 2000). Accanto alla regolazione di svariate funzioni fisiologiche quali il movimento, l'alimentazione e l'osmoregolazione (Brown et al., 2001), recenti evidenze sperimentali dimostrano che tale sistema esercita un ruolo neuroprotettivo nei Mammiferi (Canonaco et al., 2005), mentre nei Pesci le conoscenze su tale sistema risultano ancora frammentarie. Tra i sottotipi recettoriali istaminergici ($H_{1-4}R$) mediante i quali il neurotrasmettitore HA esercita le sue funzioni fisiologiche, H_3R agisce non solo da eterorecettore ma anche da autorecettore, controllando in tal modo il rilascio di HA. Tale sottotipo è coinvolto nell'attivazione del *pathways* delle protein-chinasi ad azione mitogena (MAPK), modulando complessi meccanismi che risultano fondamentali nella plasticità neuronale. I processi adattativi che derivano dalla risposta a fattori di stress coinvolgono anche l'attivazione di specifiche proteine cellulari dello stress (HSPs), le quali a livello cerebrale risultano particolarmente abbondanti sia nelle terminazioni presinaptiche che postsinaptiche. In questo lavoro, l'attenzione si è incentrata su due HSPs con differenti proprietà funzionali: HSP90, che appare direttamente coinvolta nella regolazione dei processi di rilascio dei neurotrasmettitori a livello sinaptico (Gerges et al., 2004) e HSP70 che è la più biologicamente attiva nei meccanismi anti-apoptotici (Beere et al., 2005). L'integrazione funzionale tra tali markers neuronali potrebbe fornire interessanti risultati, delucidando un'eventuale concertazione nell'attività del sistema istaminergico e delle HSPs nel Teleosteo *Thalassoma pavo* durante la risposta che le cellule nervose mettono in atto per difendere la propria integrità strutturale e funzionale.

3. Istamina

Dal punto di vista filogenetico, il sistema istaminergico deriva da un antico gruppo di neuroni le cui proiezioni raggiungono tutto l'encefalo dei Vertebrati ed il contenuto di HA (fig. 3) varia enormemente tra le specie prese in esame. Nei Pesci (Brodin et al. 1990, Ekstrom et al. 1995, Eriksson et al. 1998), Roditori e Primati (Panula et al., 1990), è stato dimostrato che i neuroni secernenti HA sono localizzati nell'area del nucleo tuberomammillare (TMN) dell'ipotalamo (HTH) posteriore.

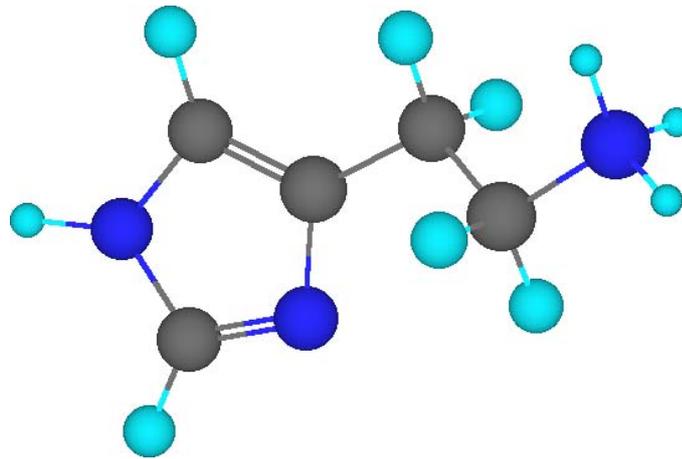


Fig.3 Struttura molecolare di HA. Legenda: ■ Azoto; ■ Carbonio; ■ Idrogeno.

Nell'encefalo dei Vertebrati, l'amina biogena HA svolge il ruolo di neurotrasmettitore e neuromodulatore, coinvolto in molteplici funzioni encefaliche ed è localizzata a livello di due principali popolazioni cellulari: i neuroni ed i mastociti, questi ultimi scarsamente rappresentati rispetto ai primi e con funzione sostanzialmente ancora sconosciuta. Per tale motivo si può assumere che la principale fonte di HA a livello della maggior parte delle regioni encefaliche sia rappresentata dai neuroni.

Sintesi e rilascio dell'istamina

HA viene sintetizzata nell'encefalo a partire dalla L-istidina ad opera dell'enzima L-istidina decarbossilasi (HDC). Una volta sintetizzata, HA viene trasportata all'interno di vescicole grazie all'azione di un trasportatore molecolare definito trasportatore vescicolare monoamminico 2 (VMAT2; Merickel and Edwards, 1995). L'azione di tale amina termina con il suo catabolismo, per cui la degradazione di HA è avviata con l'attivazione dell'enzima HA N-metiltransferasi (HNMT), il quale catalizza la sua trasformazione in tele-metilHA. Quest'ultima, a sua volta, viene trasformata in acido telemetilimidazolacetico grazie all'azione combinata degli enzimi monoammina ossidasi B (MAO-B) ed aldeide deidrogenasi (fig. 4).

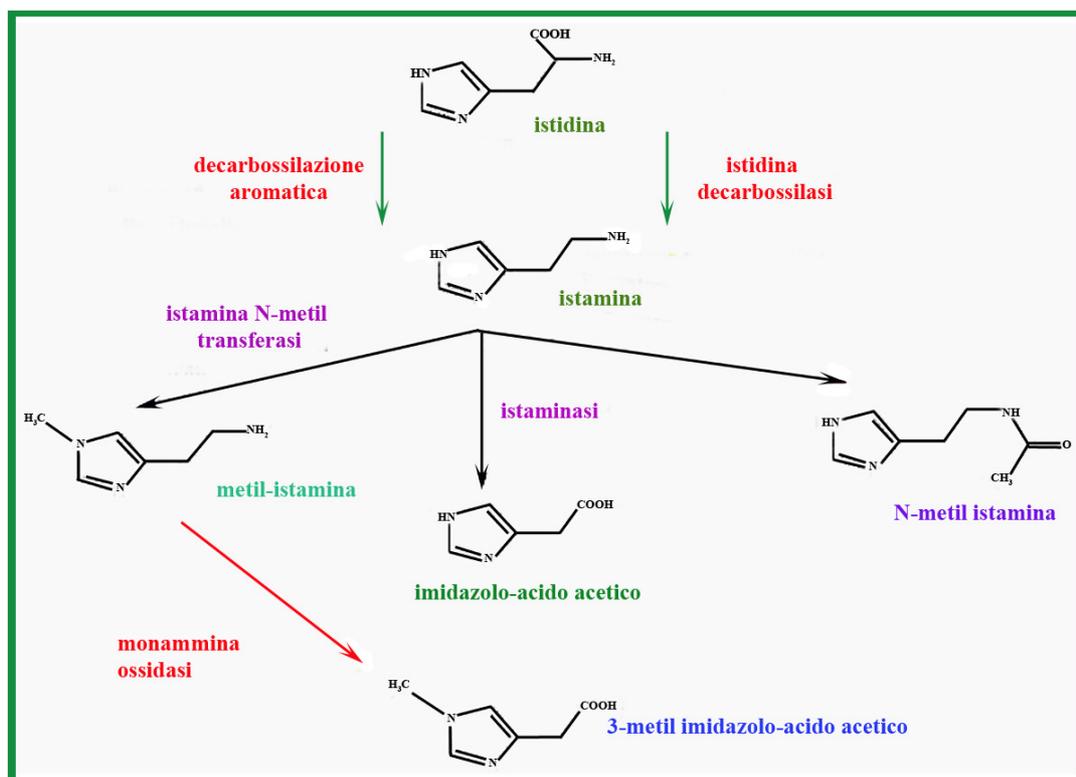


Fig. 4 *Pathways* metabolici di sintesi e degradazione di HA.

La sintesi di HA ed il suo stesso rilascio sono sotto il controllo degli autorecettori H_3R localizzati sul soma e sulle terminazioni assoniche dei neuroni istaminergici, sebbene esista anche un controllo esercitato da recettori $M1$ muscarinici, α_2 -adrenorecettori e mediato dall'ossido nitrico (NO), il quale esercita un'azione inibitoria sul rilascio di HA a livello ipotalamico (Prast et al., 1999). Il rilascio di HA a livello encefalico presenta un ritmo circadiano che risulta parallelo al tasso di scarica dei neuroni istaminergici nel ciclo sonno-veglia (Mochizuki et al., 1992).

I neuroni istaminergici sono localizzati all'interno di una piccola area di HTH posteriore in TMN, da dove numerosi prolungamenti raggiungono tutto l'encefalo. Tale nucleo nel ratto è suddiviso in tre sottogruppi: il sottogruppo tuberomammillare mediale (TMM), che consiste di circa 600 neuroni localizzati su entrambi i lati del recesso mammillare; il sottogruppo tuberomammillare ventrale (TMV), che comprende circa 1500 neuroni intorno ai corpi mammillari; la parte diffusa del nucleo tuberomammillare (TMDiff o E5) che comprende circa 100 corpi cellulari HDC-immunoreattivi. Il sottogruppo TMM è stato ulteriormente suddiviso in una parte dorsale (TMMd o E4) ed una ventrale (TMMv o E3), mentre il sottogruppo TMV è stato ulteriormente suddiviso in una parte rostrale (TMVr o E2) ed una caudale (TMVc o E1). Attualmente non esistono prove circa un ruolo diverso per tali nuclei per cui essi possono essere considerati come un unico gruppo funzionale. Dal

punto di vista strutturale, i neuroni istaminergici presentano un corpo cellulare dalla forma variabile, ovali, rotondi o triangolari ma la forma predominante è quella ovale. La loro taglia è stata valutata in lunghezza, larghezza e spessore e sono stati riportati i valori medi di 19.2 μm di lunghezza, 12.5 μm di larghezza e 11.7 μm di spessore rispettivamente. Essi si distribuiscono sulla superficie ventrale del cervello ed inviano vari dendriti primari che si suddividono in lunghi dendriti secondari. Alcuni di questi dendriti possono inoltre proiettarsi all'interno del recesso mammillare ed entrare in contatto con il liquido cefalorachidiano (CSF) ove specifiche sostanze disciolte, quali le citochine, possono influenzarne l'attività. HA presenta una distribuzione granulare in tutto il neurone, inclusi il corpo cellulare, i dendriti ed assoni ed anche la distribuzione di HDC nei neuroni istaminergici si estende in tutti i compartimenti cellulari. Inoltre, la distribuzione ubiquitaria delle vescicole VMAT2 in tutto il neurone (Nirenberg et al., 1996) suggerisce probabilmente che HA di nuova sintesi possa essere catturata in vescicole di deposito. Il significato funzionale di tale distribuzione non è ancora noto, ma si può ipotizzare un rilascio di tale molecola in siti extrasinaptici (Kukko-Lukjanov and Panula, 2003) mediante la specializzazione funzionale di espansioni simili a varicosità (Vizi, 2000).

Sistema istaminergico nei Mammiferi

Lo studio delle caratteristiche anatomiche e delle proprietà fisiologiche del sistema istaminergico nei Vertebrati ha avuto e tuttora ottiene una notevole attenzione: i Mammiferi costituiscono la classe dei Vertebrati nella quale tale sistema risulta quasi completamente caratterizzato (Hill et al., 1997), mostrando una localizzazione predominante a livello centrale, ma raggiungendo anche un elevato grado di distribuzione periferica. Nel sistema istaminergico dei Mammiferi, la distribuzione delle fibre istaminergiche risulta alquanto diffusa, in quanto i neuroni istaminergici localizzati in TMN inviano i loro prolungamenti assonici in tutto l'encefalo e parte del midollo spinale. In particolare sono state individuate due vie ascendenti ed una discendente: la via ascendente ventrale viaggia in corrispondenza della superficie ventrale dell'encefalo e fornisce l'innervazione a HTH, alla banda diagonale, al setto ed al bulbo olfattivo, mentre la via ascendente dorsale diparte dorsalmente da TMN, seguendo il versante laterale del terzo ventricolo per innervare il talamo (TH), HIP, l'amigdala (AMY) e le aree encefaliche rostrali. La via discendente è associata al fascicolo longitudinale mediale e fornisce l'input al peduncolo dell'encefalo ed al midollo spinale. L'organizzazione topografica del sistema istaminergico evidenzia una variabilità specie-specifica nella densità delle fibre. In generale, la più alta densità si individua a livello ipotalamico, dove tutti i nuclei ricevono una forte o moderata innervazione, mentre altre

formazioni quali la banda diagonale, il setto ed il tubercolo olfattivo risultano innervate dalla sola via ascendente ventrale. Le formazioni innervate dalla via ascendente dorsale tendono ad avere una minore densità di fibre, con AMY che presenta l'innervazione più abbondante e la corteccia cerebrale caratterizzata da una moderata densità di fibre in tutte le aree. La formazione ippocampale presenta una più forte innervazione a livello del giro dentato e del *subiculum*, con una bassa densità di fibre a livello dei campi CA3 e CA1. Le proiezioni al mesencefalo, al peduncolo encefalico, al cervelletto ed al midollo spinale tendono ad essere meno dense rispetto alle proiezioni ascendenti, con qualche evidente eccezione. Tutti gli altri gruppi di cellule aminergiche ricevono una moderata densità di fibre, con la sostanza nigra e l'area segmentale che rappresentano le regioni maggiormente innervate. Inoltre i collicoli superiori ed inferiori, il grigio periacqueduttale, il nucleo del nervo trigeminale ed il nucleo del tratto solitario ricevono una prominente innervazione. Nelle suddette regioni encefaliche, gli assoni istaminergici in genere non formano sinapsi specializzate ed il rilascio di HA avviene in corrispondenza di vari siti localizzati lungo tutto il prolungamento assonico: ciò suggerisce che i siti di rilascio di tale neurotrasmettitore ed i rispettivi recettori non sono localizzati in aree circoscritte, bensì si realizza un'azione concertata di HA su neuroni, cellule gliali e vasi sanguigni, in maniera ormone-simile (Brown et al., 2001).

Sistema istaminergico nei Pesci

Gli studi condotti sul sistema istaminergico nei non Mammiferi risultano attualmente scarsissimi ed in particolare nei Pesci, classe in cui gli studi condotti nel Teleosteo *Trachurus trachurus* hanno permesso di delucidare le prime caratteristiche filogenetiche di tale sistema nei Vertebrati. In tale Teleosteo un piccolo numero di neuroni istaminergici caratterizza la parte posteriore di HTH basale. Tali neuroni non si presentano organizzati in clusters così come osservato nei Mammiferi, bensì appaiono dispersi intorno al recesso posteriore del terzo ventricolo. Nell'encefalo di tale Vertebrato acquatico, l'area in cui si proiettano le fibre istaminergiche comprende il telencefalo, il diencefalo, in modo particolare la parte ventrale di HTH basale, il mesencefalo e la parte rostrale del midollo allungato; scarsa o assente appare l'innervazione nel bulbo olfattivo, cervelletto, parte caudale del midollo allungato, midollo spinale ed ipofisi (Inagaki et al., 1991). Più di recente, numerose evidenze sperimentali relative a tale sistema neuronale sono state ottenute nel Teleosteo *Danio rerio* nel quale la distribuzione dei neuroni istaminergici è limitata ad un unico cluster (Kaslin and Panula, 2001). Anche in tale specie i neuroni istaminergici sono concentrati in prossimità del recesso posteriore che, a differenza dei Mammiferi, risultano in posizione ventrale rispetto al corpo mammillare, mentre sia nel topo che nel ratto essi appaiono più

ravvicinati al corpo mammillare stesso. Questa diversa localizzazione potrebbe indicare che il corpo mammillare dei Teleostei non rappresenta in realtà l'omologo del corpo mammillare dei Mammiferi, ma esisterebbe invece una diretta corrispondenza tra il TMN di questi ultimi ed il nucleo del recesso posteriore (NRP) dei Vertebrati acquatici (Wullimann and Puelles, 1999; Hauptmann and Gerster, 2000). La distribuzione rostrocaudale dei neuroni istaminergici di *Danio rerio* è simile a quella riscontrata nel ratto (Panula et al., 2000). In questo Teleosteo i neuroni istaminergici organizzati in clusters si presentano più piccoli e rotondi e presentano sottili fibre varicose, mentre i neuroni istaminergici solitari sono più grandi e presentano fibre lunghe e sottili. Dal punto di vista funzionale, la paragonabile distribuzione di tale sistema in *Danio rerio* con quella riportata per i Mammiferi, suggerisce anche una similarità funzionale per HA nel corso dell'evoluzione. In particolare, l'elevata densità di fibre nel nucleo entopeduncolare (E) nei Teleostei, che è omologabile alla regione amigdalare nei Mammiferi, così come nella porzione rostro-dorsale del telencefalo, omologabile a HIP, suggerisce per HA un ruolo nella modulazione di attività emotive e cognitive anche nei Pesci (Kaslin and Panula, 2001). Inoltre l'abbondanza di fibre istaminergiche nell'area preottica (POA) dei Teleostei suggerisce per HA un ruolo attivo nella modulazione delle attività circadiane (Coelho et al., 2001). Fatta eccezione per l'identificazione mediante tecniche autoradiografiche di un sottotipo H₃R-like in *Danio rerio* (Peitsaro et al. 2000) e di un sottotipo H₁R-like in *Tilapia nilotica* (Choich et al. 2004), non sono stati ad oggi riportati studi sulla caratterizzazione molecolare e farmacologica dei recettori istaminergici nei Vertebrati acquatici.

4. Recettori istaminergici

Le funzioni fisiologiche espletate da HA nei Vertebrati sono mediate da tre differenti sottotipi recettoriali H₁R, H₂R, H₃R, e solo di recente ne è stato scoperto un quarto H₄R (Hough et al., 2001). Tali recettori di membrana, associati a proteine leganti GTP e dunque appartengono alla famiglia dei *G-protein coupled receptors* (GPCRs) caratterizzati da sette domini transmembrana (TM) associati in modo alternato con domini intracellulari (*i1-i3*) o extracellulari (*e2-e4*) detti *loops* (Hill et al., 1997). La struttura generale di tali sottotipi possiede porzioni interne ed esterne alla membrana con funzioni differenti, in quanto i *loops* extracellulari sono coinvolti nell'interazione specifica con il ligando, mentre quelli intracellulari riconoscono la proteina G e contribuiscono alla sua attivazione (fig. 5).

Gli studi sulla distribuzione dei recettori istaminergici nei Mammiferi sono stati resi possibili grazie allo sviluppo di radioligandi selettivi per ciascun sottotipo recettoriale. Nel caso specifico del sottotipo H₁R, l'antagonista pirilamina è risultato selettivo per tale

recettore in una grande varietà di tessuti tra cui l'encefalo, muscolo liscio delle vie aeree, tratto gastrointestinale, sistema cardiovascolare, midollare del surrene, cellule endoteliali e linfociti. H₁R è una proteina con peso molecolare di 56 kDa ed una sequenza di 488 aa: *il* inizia in posizione 212, l'estremità amino-terminale della proteina è glicosilata e l'estremità carbossi-terminale è lunga 17 aa. La maggiore distribuzione di H₁R è caratteristica delle regioni encefaliche: alti livelli di densità si osservano infatti nella corteccia, talamo, in HTH posteriore, mentre una bassa densità recettoriale si riscontra nei gangli basali e nel cervelletto (Traiffort et al., 1994). L'attivazione di H₁R provoca inibizione, in particolare nei neuroni ippocampali, mentre in altre regioni cerebrali, quali HTH, l'attivazione di tale recettore provoca un processo di eccitazione in seguito al blocco della conduzione del Ca²⁺. Il recettore utilizza come meccanismo di trasduzione la via del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato, in quanto è associato intracellularmente alla proteina Gq11 ed alla fosfolipasi C.

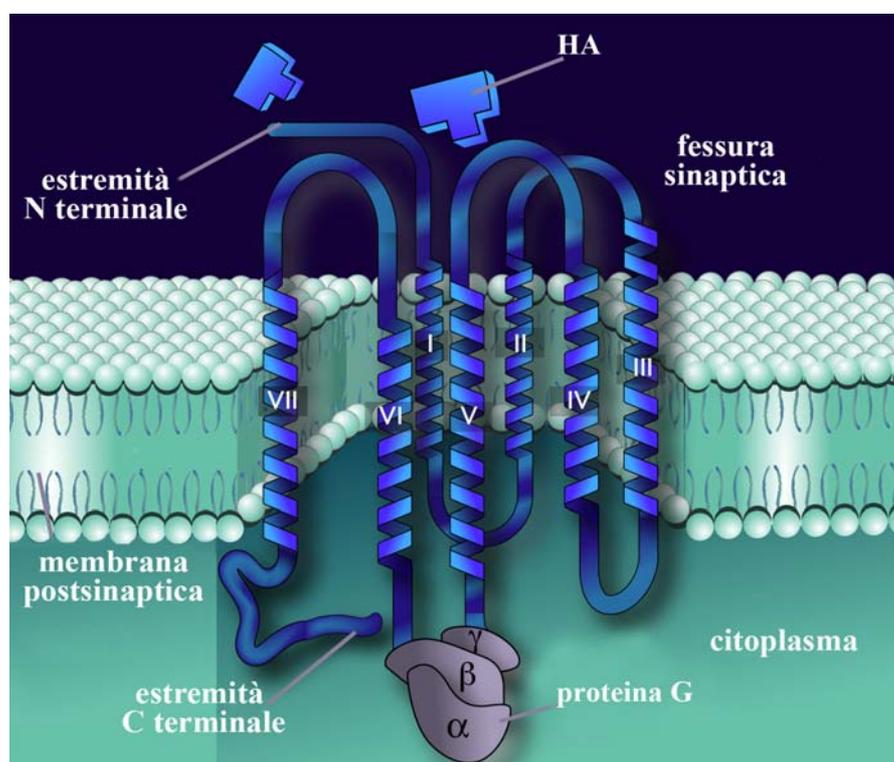


Fig.5 Organizzazione strutturale del recettore per HA, in cui sono evidenziati i siti di legame al ligando, alla proteina G ed i sette TM.

In alcuni casi l'attivazione di tale sottotipo induce meccanismi di traduzione tessuto-specifico: nelle cellule muscolari lisce può attivarsi difatti la via delle p42/p44 MAPKs (Robinson and Dickenson, 2001), mentre a livello nucleare la via di traduzione modulata da H₁R può indurre l'attivazione di fattori nucleari di trascrizione *NF-κB*, coinvolti nelle risposte infiammatorie (Bakker et al., 2006).

H₄R costituisce il sottotipo istaminergico scoperto più di recente, appartenente alla famiglia GPCRs e caratterizzato da un buon grado di omologia (58%) con H₃R, significativamente più basso con gli altri recettori (26% H₁R e 27% H₂R). Ciò lascia supporre che i recettori istaminergici possano essersi evoluti da geni ancestrali differenti ed in seguito, mediante evoluzione convergente, abbiano acquisito le caratteristiche di recettori specifici per HA (Hough, 2001). La sequenza proteica di tale recettore presenta residui molto conservati quali un residuo di Asparagina nel TMIII conservato (Liu et al., 2001; Zhu et al., 2001). La sua distribuzione tissutale è molto differente se messa a confronto con il recettore H₃R: H₄R è difatti distribuito principalmente nei tessuti periferici, leucociti, intestino e cuore (Nguyen et al., 2001) e scarsamente ritrovato nell'encefalo.

La determinazione strutturale e funzionale dei sottotipi recettoriali istaminergici ha raggiunto la massima completezza nei Mammiferi, mentre scarse ed in taluni casi inesistenti risultano le conoscenze nei Vertebrati non Mammiferi. Al momento, difatti, non è conosciuta alcuna sequenza genica per tali sottotipi in questi animali e gli unici studi riportati in letteratura sono relativi a caratterizzazioni farmacologiche o determinazioni immunostochimiche. Recentemente negli Uccelli sono stati caratterizzati da un punto di vista farmacologico i sottotipi H₁R, H₂R e H₃R (Zawilska et al., 2002), mentre nei Pesci le uniche evidenze sperimentali riportate sono fornite da tecniche autoradiografiche che hanno permesso, con l'utilizzo della pirilamina, di ritrovare H₁R in *Carassius auratus* (Choich et al., 2004). In questo Teleosteo, tale sottotipo avrebbe una funzione modulatrice di attività cognitive quali apprendimento e memoria, oltre che mostrare un'interazione funzionale con altri sistemi neuronali quale quello muscarinico (Spieler et al., 1999; Coelho et al., 2001). Inoltre studi autoradiografici condotti in *Danio rerio*, in presenza dell'antagonista tioperamide selettivo per H₃R, hanno dimostrato come l'attivazione di tale sottotipo sia accoppiata alla diretta stimolazione delle proteine Gi/Go (Peitsaro et al., 2000).

Il sottotipo H₂R

Struttura del gene nei Mammiferi. Il sottotipo H₂R, appartenente alla superfamiglia dei GPCRs (Del Valle and Gantz, 1997) in maniera analoga ad H₁R, è codificato da un gene caratterizzato da assenza di introni nella porzione codificante. L'analisi della sequenza nucleotidica del gene codificante per H₂R nell'uomo rivela infatti la presenza di un solo introne di circa 19 kb collocato a monte della regione codificante e che si ritrova anche in H₁R, suggerendo che la superfamiglia dei GPCRs presenta in maniera costante tale caratteristica (Murakami et al., 1999). Tale gene presenta un elevato grado di conservazione nelle specie in cui è stato clonato: nel topo è stato identificato un frammento di 1074 bp la

cui omologia è del 95% con il ratto e 85% e 80% con uomo e cane rispettivamente (Kobayashi et al., 1996).

Struttura della proteina. La proteina H₂R è un recettore proteico di 358-359 aminoacidi che presenta tre siti altamente conservati di N-glicosilazione (Asn-Xaa-Ser/Thr) in prossimità del tratto ammino-terminale ed in *e2*. In tale sottotipo risultano altamente conservati anche i siti di fosforilazione della proteina chinasi C (Ser/Thr-Xaa-Arg/Lys) ed i due residui di Cys in posizione 91 in *i1* e in posizione 173 in *i2*, implicati nella formazione di un ponte disolfuro necessario per la struttura terziaria del recettore (Kobayashi et al., 1996). La presenza di un residuo di Asp nel TMIII e di Asp e Thr in TMV risulta fondamentale per il legame con HA, mentre la proteina G interagisce con un residuo di Leu 124 in *i2* (Hill et al., 1997). HA si lega all'interno di una tasca formata dalle α -eliche dei TM, con la cooperazione anche del terminale carbossilico e di *i3* adiacenti a TM (Wang et al., 1997).

Meccanismo di trasduzione del segnale. Il meccanismo di trasduzione del segnale modulato da H₂R coinvolge la via dell'adenilato ciclasi mediante la proteina G_s legante il GTP, cui consegue la produzione e accumulo di cAMP nella cellula. In altri tessuti tra cui le cellule gastriche parietali, l'attivazione di tale recettore induce differenti meccanismi, in seguito ai quali si realizza un forte aumento della concentrazione degli ioni Ca²⁺ rilasciati dalle zone di accumulo intracellulare (Hill et al., 1997). Inoltre l'attivazione di H₂R è associata anche con la mobilitazione di fosfolipidi nei mastociti di ratto e con inibizione della conduzione di ioni Cl⁻ nelle cellule piramidali ippocampali (Raimond, 1995; Arai and Charo, 1996). In H₂R la porzione C-terminale svolge un ruolo predominante nei segnali di trasduzione e nella regolazione negativa del recettore, coinvolgendo la proteina chinasi A (Fitzsimons et al., 2001). A livello nucleare, l'attivazione di H₂R regola l'espressione dei geni *c-fos* e *c-jun* in maniera tempo-dipendente attraverso un meccanismo che coinvolge il cAMP e la proteina chinasi A, stimolando la proliferazione cellulare e la differenziazione (Wang et al., 1997).

Distribuzione e funzione di H₂R nel SNC. Nei Mammiferi, il recettore ha un'ampia espressione nel cervello e nel midollo spinale, con densità particolarmente alte nelle aree amigdalari ed ippocampali, mentre bassi livelli si riscontrano a livello dei nuclei ipotalamici e talamici. Negli strati corticali, H₂R presenta un'elevata densità negli strati più superficiali e preferibile localizzazione sui dendriti delle cellule piramidali. A livello centrale, la funzione principale di H₂R è quella di regolare la crescita e la differenziazione cellulare, mentre a livello periferico è coinvolto nelle risposte chemiotattiche dei basofili e nella regolazione della secrezione gastrica (Brown et al., 2001). In SNC, l'attivazione di H₂R induce inibizione neuronale e soprattutto riduzione della durata dell'iperpolarizzazione e sincronizzazione del *firing*, effetto che comporta un potenziamento dell'eccitazione nei Roditori. In particolare, la

trasmissione sinaptica risulta profondamente aumentata in HIP, potenziando il meccanismo di plasticità sinaptica (Hill et al., 1997).

Saggi funzionali condotti su H₂R. La prima molecola che dimostrò essere un ligando selettivo per H₂R fu la burimamide nel 1972; in seguito sono stati sintetizzati una serie di diversi ligandi, caratterizzati da maggiore affinità di legame, tra i quali la metilamide (K_B 0,8 μM) e la cimetidina (Cim, K_B 0,6 μM). In particolare, quest'ultima risulta l'antagonista più frequentemente usato negli studi farmacologici e mostra affinità quasi inesistente per H₁R (pK_B= 3.3) o H₃R (pK_B= 4.5). In seguito a trattamenti effettuati con Cim in cellule di ovario di criceto cinese (CHO), è stata rilevata una forte diminuzione dei livelli di produzione di cAMP, suggerendo una sovra-regolazione di tale sottotipo indotta da tale antagonista (van der Goot and Timmermann, 2000). La forma neutra di questo antagonista presenta, in soluzione acquosa a pH fisiologico, una serie di specie ioniche e due forme tautomeriche di anello imidazolico, oltre ad una grande flessibilità nella catena laterale che può portare alla formazione di molti legami idrogeno intramolecolari tra i due tratti terminali della molecola, fondamentali per il riconoscimento con il recettore (Giraldo et al., 1992).

Il sottotipo H₃R

Tra i sottotipi istaminergici, H₃R è considerato di particolare importanza non solo per la sua localizzazione neuronale che, a differenza degli altri sottotipi istaminergici esclusivamente postsinaptici, può essere anche presinaptica, ma soprattutto per la sua funzione di autorecettore controllando in tal modo il rilascio di HA. Sebbene tale sottotipo sia stato inizialmente definito esclusivamente quale autorecettore, più recentemente è stata dimostrata anche la sua natura di eterorecettore presinaptico localizzato in neuroni che non sintetizzano HA (Lovenberg et al., 1999).

Struttura del gene di H₃R nei Mammiferi. Il gene che codifica per H₃R è localizzato sul cromosoma umano 20 (20q13.32-20q13.33) ed è espresso in modo predominante a livello encefalico (Wellendorph et al., 2002; Hancock et al., 2003). Sebbene le caratteristiche molecolari e funzionali consentano di assegnare tale recettore alla superfamiglia dei GPCRs, a differenza di molti dei geni codificanti per tali recettori il gene di H₃R contiene introni. H₃R nell'uomo possiede infatti un introne di 1063 bp posizionato 250 nt a valle del codone di inizio (che corrisponde all'amminoacido 84), ed un secondo introne di 1564 bp in posizione 417 del gene (che corrisponde all'amminoacido 139): tali dati suggeriscono un gene per H₃R organizzato in tre esoni e due introni (Wiedemann et al., 2002). Sulla precisa organizzazione genica di tale recettore esistono attualmente pareri controversi, considerato che altri studiosi hanno proposto un gene con quattro esoni ed una regione codificante

interrotta da tre introni di 1062 bp, 1565 bp e 240 bp rispettivamente (Cogé et al., 2001). Il quarto esone aggiuntivo potrebbe corrispondere agli otto aminoacidi posti all'estremità carbossi-terminale della proteina, per cui il risultato definitivo sarebbe una proteina di 453 aminoacidi (Nakamura et al., 2000). La presenza di giunzioni esone-introne nel gene H₃R fornisce la possibilità di eventi di *splicing* alternativo, il cui risultato è la produzione di diverse varianti del recettore nell'uomo, nel ratto e nel maialino d'India che si differenziano dalla isoforma completa del recettore caratterizzata complessivamente da una sequenza di 445 aminoacidi (Wellendorph et al., 2002). Molte di queste forme recettoriali "corte" presentano una delezione dalla lunghezza variabile che spesso inizia in corrispondenza dell'amminoacido 274 o 275, all'interno di *i3* tra il TM5 ed il TM6 (Cassar, 2000; Coge et al., 2001). Ciascuna regione posta all'interfaccia esone-introne comprende un sito donatore ed un sito accettore di *splicing* (Blencowe, 2000) ed inoltre contiene un potenziale sito di attacco (CTRACT) localizzato a monte del sito accettore (Cogé et al., 2001). Il numero di isoforme è variabile nei Mammiferi: nell'uomo attualmente sono state individuate sei isoforme di H₃R (Wellendorph et al., 2002). Di esse, l'isoforma 1 non è sottoposta ad alcun evento di *splicing*; l'isoforma 2 è invece generata da siti di *splicing* localizzati a 3447 ed a 3687 nt dal codone di inizio, per cui il risultato finale consiste complessivamente di una delezione di 240 nt, codificanti per 20 aminoacidi localizzati all'interno di *i3*. L'isoforma 3 origina invece da una delezione più grande, in quanto la regione deleta inizia da 3447 nt dal codone di inizio e termina a 3879 nt da esso, per cui sono complessivamente persi 432 nt per un totale di 144 aminoacidi. Questa delezione determina la perdita dell'intero *i3* e parte dei domini TM6 e TM7 della proteina, ma mantiene comunque lo stesso modulo di lettura proteica, conservando i 27 aminoacidi in posizione carbossi-terminale. L'isoforma 4 presenta la stessa delezione caratterizzante l'isoforma 2, ma in aggiunta si osserva un'ulteriore delezione a partire da un sito posto a monte del codone di stop, cui consegue la rimozione del codone di stop e di circa 604 nt (3960-4564). L'isoforma 5 è generata da una delezione di 409 nt (3134-3543) responsabile dello spostamento del modulo di lettura che si realizza durante la traduzione del trascritto: il risultato è l'aggiunta di 30 nuovi aminoacidi all'estremità carbossi-terminale della proteina e la formazione di un recettore privo di TM4 e TM5 e di una porzione nuova di *i3*. Infine l'isoforma 6 deriva dallo stesso processo di *splicing* che porta alla formazione dell'isoforma 3 e dallo *splicing* al 3' che caratterizza l'isoforma 4. Tali eventi contribuiscono, nell'insieme, alla formazione di una proteina trunca dotata di 5 soli TM e distinguibile dall'isoforma 3 solo per gli 8 aminoacidi terminali. Numerosi studi su tale sottotipo sono stati condotti in altre specie di Mammiferi, al fine di caratterizzarne non solo la variabilità molecolare e funzionale, ma anche l'elevato grado di

conservazione. A tal proposito, nel ratto sono state identificate tre isoforme che costituiscono il risultato di eventi di *splicing* alternativo e presentano non solo un diverso pattern di espressione a livello del SNC, ma anche un diverso accoppiamento funzionale con i meccanismi di segnalazione cellulare che coinvolgono il cAMP e le MAPK (Drutel et al., 2000). Le tre sequenze nucleotidiche codificano rispettivamente per proteine di 445 (H_{3A}), 413 (H_{3B}), o 397 (H_{3C}) amminoacidi: le delezioni di 32 e di 48 amminoacidi delle isoforme H_{3B} ed H_{3C}, rispettivamente, sono localizzate interamente all'interno di *i3* e comportano la perdita di potenziali siti di fosforilazione per la proteina chinasi C e A nell'isoforma H_{3C}. In aggiunta a tali isoforme, è stata rilevata un'ulteriore delezione di 4 bp in TM2 che determina lo scivolamento del modulo di lettura e quindi la produzione di una proteina tronca detta H_{3T} di 94 amminoacidi (gli amminoacidi 1-83 ed 11 nuovi amminoacidi). Studi di omologia hanno rivelato che l'isoforma H_{3A} di ratto presenta un'omologia del 93% con la stessa isoforma nell'uomo (Lovenberg et al., 1999). I risultati ottenuti dalle più recenti analisi sulla struttura del gene per H_{3R} nel ratto riportano un gene organizzato in tre esoni e due introni, paragonabile a quello umano: l'esone 1 codifica per i primi 84 amminoacidi del recettore H₃ umano ed il primo introne di 1063 bp è localizzato in corrispondenza della posizione in cui si localizza la delezione di 4bp che caratterizza la forma tronca di H_{3R} di ratto. L'esone 2 codifica per gli amminoacidi 85-139 ed è separato dal terzo esone da un secondo introne di 1564 bp; l'esone 3 codifica per la parte restante del recettore che contiene gli amminoacidi 140-445. Nel 2003 è stato identificato l'ortologo murino di H_{3R}. Anche nel topo il recettore ha una lunghezza di 445 amminoacidi ed il confronto realizzato con la sequenza di H_{3R} di ratto, maialino d'India ed uomo evidenzia un'omologia del 98%, 95% e 94% rispettivamente (Chen et al., 2003). Il gene murino per H_{3R} è localizzato sul cromosoma 2 in corrispondenza della banda H4, comprende 4750 bp ed è organizzato in tre esoni e due introni. Il primo introne presenta una lunghezza di 1000 bp ed è localizzato in corrispondenza del 333 nt a livello di TMII; il secondo introne presenta una lunghezza di 1312 bp ed è localizzato in corrispondenza del 500 nt a livello di *i2*. In tal modo si descrivono due introni localizzati allo stesso livello degli introni presenti nel gene di ratto. Sia nel maialino d'India, che nel ratto e nell'uomo, lo *splicing* alternativo di uno pseudo-introne localizzato a livello di *i3* risulta essere responsabile della formazione delle isoforme recettoriali di H_{3R}. L'analisi della sequenza nucleotidica del gene murino mette in evidenza la presenza di un sito donatore di *splicing* e di due siti accettori di *splicing* che sono paragonabili ai siti di *splicing* coinvolti nella formazione delle isoforme recettoriali nel ratto, nel maialino d'India e nell'uomo. Sulla base di tali evidenze, Rouleau et al. (2004) hanno dimostrato l'esistenza di tre isoforme del recettore H_{3R} murino. E' possibile osservare come il tratto deleto nelle due isoforme

recettoriali più corte non sia fiancheggiato da introni; al contrario, si evidenziano lo stesso sito donatore di splicing (5'-GTATGGG-3') ed i due siti accettori di splicing (5'-CCTCCAG-3' e 5'-CTCAAAG-3' per H₃₍₄₁₃₎ ed H₃₍₃₉₇₎ rispettivamente) alle estremità 5' e 3' rispettivamente dei due tratti deleti. Le isoforme murine corrispondono a quelle di ratto aventi rispettivamente una lunghezza di 445, 413 e 397 aminoacidi. Le due isoforme recettoriali più corte nascono dalla delezione di un frammento di 96 bp e 144 bp: tale delezione comporta la perdita di un frammento di 32 e 48 aminoacidi, a livello di *i3* in tale recettore nel topo (Rouleau et al., 2004).

Per quanto concerne il maialino d'India, il recettore H_{3R} è stato identificato nel 2000 da Tardivel-Lacombe e sono state identificate due isoforme, indicate come H_{3L} ed H_{3S}, le quali differiscono tra loro per un tratto comprendente 30 aminoacidi, localizzato in *i3* che probabilmente originano da eventi di *splicing* alternativo. Il gene risulta essere altamente espresso in un discreto numero di popolazioni neuronali, quali le cellule piramidali della corteccia cerebellare o le cellule cerebellari del Purkinje (Tardivel-Lacombe et al., 2000).

Struttura della proteina H_{3R}. H_{3R} appartiene alla superfamiglia 1 dei GPCRs in quanto accoppiato ad una proteina Gi a carattere inibitorio che regola negativamente il messaggero intracellulare cAMP (Lovenberg et al., 1999). In maniera analoga a quanto riscontrato per gli altri GPCRs, anche H_{3R} comprende domini di sequenza unici, come il motivo Aspartato-Arginina-Tirosina (DRY) che per H_{3R} diventa Aspartato-Arginina-Fenilalanina (DRF; Leurs et al., 2000) o il motivo Glutammato-Arginina-Triptofano (ERW) collocato all'interfaccia del TM3 e di *i2*. Sono presenti inoltre residui di D conservati in posizione 80 a livello del TM2 ed in posizione 114 a livello del TM3 (Leurs et al., 2000), ed il motivo Asparagina-Prolina-X-X-Tirosina (NPXXY) nel TM7. Altre caratteristiche strutturali accomunano H_{3R} a molti GPCRs: specifici siti di ponti disolfuro si collocano tra il primo ed il secondo residuo di cisteina C107 e C188; i residui di triptofano conservati W174 e W371 nei TM4 e TM6 rispettivamente; i residui di prolina conservati P120 e P373 nei TM5 e TM6 rispettivamente; un residuo di asparagina conservato N404 nel TM7 (Leurs et al., 2000). Inoltre sono stati identificati un potenziale sito di palmitolazione (il residuo C428 vicino all'estremità C-terminale), un potenziale sito di glicosilazione prossimo all'estremità ammino-terminale (N11), più potenziali siti di fosforilazione in corrispondenza dei residui S310, S319, S341 ed S343 o dei residui T314 e T345 (*i3*), S63 o S64 (*i6*), S141 e T149.

Da un punto di vista evolutivo, l'analisi comparativa della sequenza amminoacidica di H_{3R} in cinque diverse specie di Mammiferi (uomo, scimmia, ratto, topo e maialino d'India) ha messo in evidenza un elevato grado di conservazione. Circa 410 dei 445 amminoacidi totali della proteina sono conservati tra le specie prese in esame per una percentuale di

similarità media del 92%. Al contrario, gli H₃R mostrano una bassa omologia di sequenza (21-22%, Lovenberg et al., 1999) con i recettori H₁R e H₂R ed, analogamente, una scarsa omologia (20-27%) con altri GPCRs di amine biogene e con H₄R (Hough, 2001). Recentemente sono nate ipotesi circa la possibile esistenza di polimorfismi all'interno del gene che codifica per H₃R. Confrontando i risultati conseguiti con l'analisi della sequenza amminoacidica di H₃R ottenuti da Hancock et al., (2003) con quelli ottenuti da Lovenberg et al., (1999), si osserva una corrispondenza perfetta tra le due proteine, ad eccezione del codone corrispondente alla posizione amminoacidica 19, ove al posto di un residuo D si trova acido glutammico (E). Un'ulteriore polimorfismo, rappresentato da una sostituzione nucleotidica in posizione 280, è stato ritrovato in un paziente affetto dalla sindrome di Shy-Drager (Wiedemann et al., 2002; Hancock et al., 2003), una malattia caratterizzata da degenerazione neuronale e danni autonomici. Un altro polimorfismo è stato identificato infine in posizione 197, con un residuo C che sostituisce un residuo F (Yao et al., 2003).

Analogamente sono state individuate singole sostituzioni amminoacidiche nella sequenza di H₃R del ratto e del topo. Nel ratto molte di queste sostituzioni sono localizzate all'interno di *i3* (Coge et al., 2001). Nel topo tali sostituzioni vengono identificate andando a confrontare la sequenza parziale di topo con quella completa (Morisset et al., 2000; Chen et al., 2003). I siti polimorfici riscontrati sono T201S (sequenza completa T, sequenza parziale S), T286A, G290A, H387R e V389I. Se corretti, questi polimorfismi del topo potrebbero differenziare la sequenza del topo da quella del ratto alle posizioni amminoacidiche 201, 286 e 290, nonostante la sequenza consenso del topo alle posizioni 387 e 389 sia identica a quella dell'uomo, mentre i cambiamenti polimorfici potrebbero rendere il recettore identico a quello del ratto in questi stessi loci.

Meccanismo di trasduzione del segnale. Il ruolo primario di H₃R è di autorecettore presinaptico, in grado di regolare negativamente il rilascio di HA. In un secondo momento è stato anche caratterizzato il suo ruolo di eterorecettore (fig. 6). La stimolazione di H₃R determina una riduzione dell'ingresso di Ca²⁺ extracellulare nei neuroni (Takeshita et al., 1998; Blandizzi et al., 2001), l'inibizione dell'adenilil ciclasi (Lovenberg et al., 1999) ed un incremento nella fosforilazione delle MAPK in cellule trasfettate con il recettore in questione (Drutel et al., 2001). L'attività costitutiva di H₃R determina inoltre una parziale autoinibizione dei neuroni istaminergici anche in assenza di HA (Morisset et al., 2000).

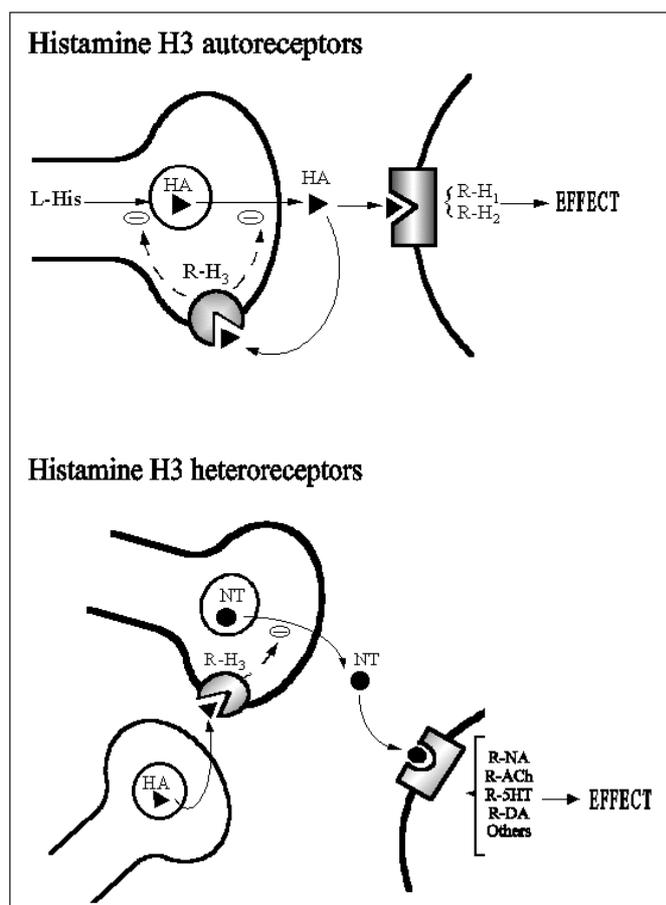


Fig. 6 Rappresentazione schematica delle funzioni di auto ed eterorecettore di H₃R.

Le vie attraverso le quali H₃R potrebbe realizzare la sua azione inibitoria sulla sintesi di HA sono state di recente caratterizzate (Torrent et al., 2005). La sintesi di HA ad opera di HDC può essere stimolata sia mediante l'attivazione della via dell'adenilil ciclasi/(PKA), sia attraverso la depolarizzazione indotta dagli ioni K⁺ in modo del tutto indipendente dalla via della PKA. Questa seconda via consiste nell'attivazione di determinati tipi di canali del Ca²⁺ voltaggio-sensibili (VACC), ed in particolare di tipo N ed, in minor misura, di tipo P, e nella conseguente attivazione della proteina chinasi Ca²⁺/calmodulina dipendente di tipo II (CaMKII). La CaMKII sembra agire direttamente a livello di HDC, che presenta diversi siti di fosforilazione, senza la presenza di altre proteine intermediarie come invece accade quando la CaMKII determina l'attivazione delle tirosina e triptofano idrossilasi. In entrambe le vie le chinasi attivate determinano quindi la fosforilazione di HDC e di conseguenza la sua attivazione, con il risultato di una maggiore produzione di HA (Torrent et al., 2005). In questo complesso quadro regolativo, la posizione di H₃R è quella di recettore inibitorio dell'adenilil ciclasi. Poiché gli agonisti di H₃R hanno la capacità di inibire gli effetti della

depolarizzazione, si è ipotizzato che tale sottotipo possa svolgere la propria funzione regolatoria anche attraverso una via diversa da quella dell'adenilil ciclasi. In tal caso l'ipotesi più accreditata è che H₃R agisca bloccando i VACC attraverso le subunità βγ della proteina G (Takeshita et al., 1998), nonostante un meccanismo indiretto attraverso la fosforilazione dei canali stessi non possa essere escluso (Seyedi et al., 2005). H₃R potrebbe dunque svolgere una regolazione negativa dei canali del Ca²⁺ mediante una via diversa da quella dell'adenilil ciclasi/PKA (Torrent et al., 2005). La completa descrizione del meccanismo alla base della regolazione della sintesi dell'HA mediata da H₃R è stata ottenuta recentemente grazie agli studi realizzati da Moreno-Delgado et al. (2006, fig. 7). In presenza di HA, H₃R è in grado di inibire la sintesi del neurotrasmettitore attraverso l'inibizione di entrambe le vie che portano all'attivazione di HDC. L'attivazione della G_i da parte di H₃R comporta da una parte l'inibizione dell'adenilil ciclasi e quindi la mancata attivazione della PKA. Contemporaneamente, a seguito dell'attivazione della proteina G_i, si ha l'inibizione dei canali di tipo N dei VACC, probabilmente attraverso le subunità βγ della proteina G_i; il mancato flusso di ioni Ca²⁺ all'interno del neurone non consente l'attivazione della CaMKII. In assenza di HA, l'attività costitutiva di H₃R sembra essere sufficiente per inibire la via della PKA ma non quella della CaMKII (Moreno-Delgado et al., 2006).

Un grande contributo alla comprensione delle azioni espletate da H₃R deriva dai risultati ottenuti dall'applicazione dell'agonista inverso tioperamide (Tio), la cui funzione è quella di inibire l'attività costitutiva di H₃R, cui consegue una maggiore produzione di HA. E' stato inoltre suggerito che l'attivazione dell'adenilil ciclasi indotta da Tio possa derivare dall'azione della Ca²⁺/calmodulina, che è in grado di incrementare la produzione di AMPc (Copper, 2003). In tal caso il Ca²⁺ e la proteina G_i agirebbero in sinergia, giustificando l'intenso effetto della tioperamide. Gli effetti più intensi indotti da Tio *in vitro* potrebbero anche essere dovuti all'amplificazione del segnale innescata dal rilascio delle subunità catalitiche della PKA dalle subunità regolatorie che legano l'AMPc, presentando così una chinasi attiva a lunga azione (Moreno-Delgado et al., 2006).

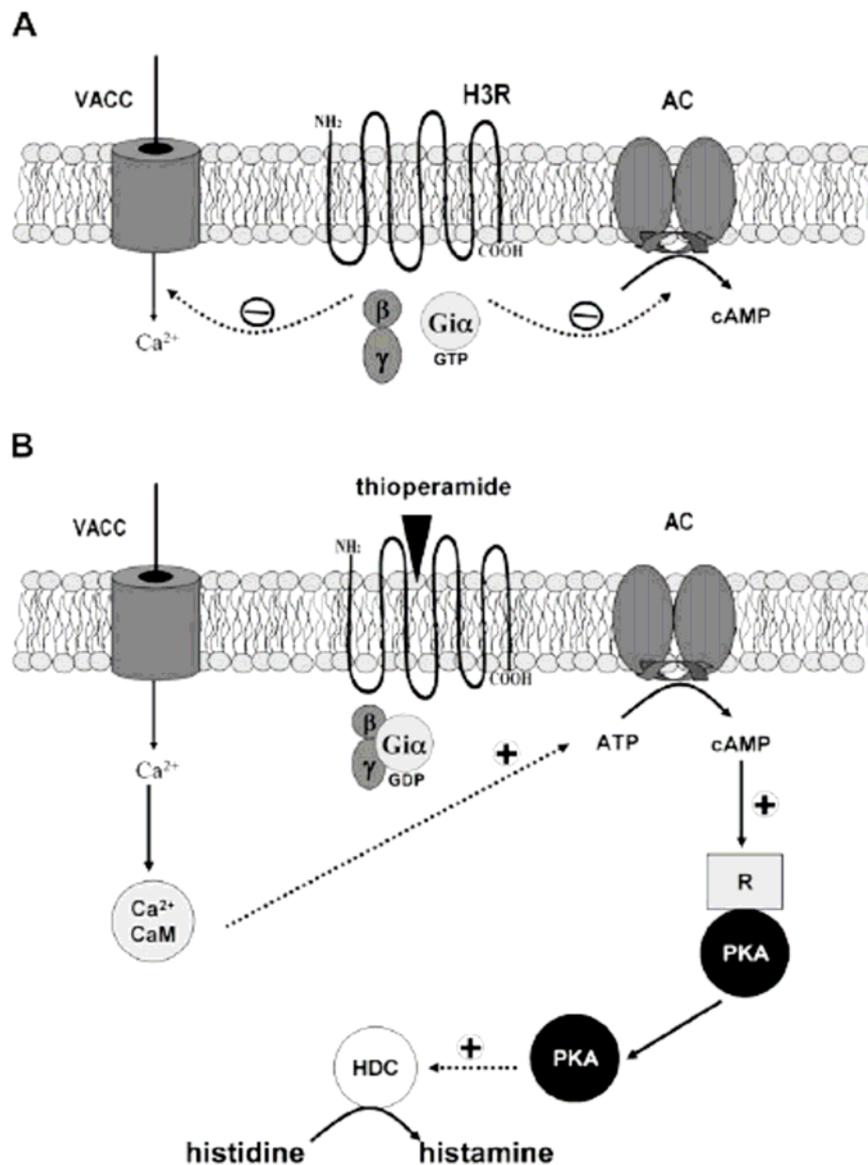


Fig. 7 Meccanismi regolatori della sintesi di HA mediata da H₃R. (A) In assenza di ligando, H₃R manifesta una leggera attività costitutiva responsabile dell'inibizione e dei canali del Ca²⁺ voltaggio-sensibili (VACC) e dell'adenilil ciclasti (AC). (B) In presenza di Tio si ha l'inibizione dell'attività di H₃R e l'attivazione di HDC. L'interazione dell'AMPc con le subunità regolatorie della PKA (R) determina il rilascio delle subunità catalitiche che possono amplificare l'intensità del segnale. Le linee tratteggiate indicano i meccanismi intracellulari che possono essere mediati direttamente od indirettamente.

Il rilascio di HA può essere anche regolato dall'azione di molti neurotrasmettitori. E' stato infatti dimostrato che la noradrenalina inibisce il rilascio di HA per mezzo del recettore α_2 , mentre la dopamina esercita un doppio effetto sulla secrezione di tale neuropeptide per mezzo del recettore D2 che ne stimola il rilascio e del recettore D3 che lo inibisce (Prast et al., 1999). Infine la serotonina incrementa il rilascio di HA attraverso i recettori 5HT_{2c/2a} e ne riduce il *turnover* attraverso il recettore 5-HT_{1a} (Hough, 2001).

Distribuzione e funzione di H₃R nel SNC. Numerosi studi sono stati condotti al fine di valutare l'esistenza di una corrispondenza tra la distribuzione encefalica dell'mRNA di H₃R e la reale localizzazione funzionale del recettore (Lovenberg et al., 1999). Uno studio realizzato da Pillot et al. (2002) conferma tale corrispondenza nel ratto, mentre tale caratteristica non appare essere mantenuta tra la distribuzione di H₃R ed il pattern di innervazione cui danno origine i neuroni istaminergici. Di recente è stato osservato come tale sottotipo nel cervello dei Roditori possieda un'attività costitutiva spontanea che giustificherebbe la distribuzione encefalica di H₃R (Morisset et al., 2000). Nell'uomo le aree in cui è possibile riscontrare un'elevata presenza di tale trascritto sono HIP, gangli basali, sostanza nigra, AMY ed HTH (Lovenberg et al., 1999; Wellendorph et al., 2002), mentre moderati livelli caratterizzano il talamo, il nucleo caudato e la corteccia. Una debole espressione si riscontra anche in alcuni tessuti periferici quali cuore, placenta, fegato, muscolo scheletrico, rene, pancreas, milza, timo, prostata, testicoli, ovari, piccolo intestino, colon, tiroide, trachea, midollo osseo, polmone e linfonodi (Lovenberg et al., 1999), oltre ad un'espressione più consistente nello stomaco e nei linfociti (Wellendorph et al., 2002). Anche nel cervello di ratto l'espressione di H₃R risulta essere abbondante soprattutto a livello della corteccia cerebrale, HIP, *tenia tecta*, caudato putamen (CPu), tubercoli olfattivi, AMY, talamo, alcuni nuclei ipotalamici, cervelletto e nuclei vestibolari (Pillot et al., 2002). Inoltre tecniche di ibridazione *in situ* hanno dimostrato un diverso pattern di espressione delle varie isoforme di H₃R nell'encefalo di tale roditore, con un'intensità del segnale che segue tale ordine: H_{3T}, H_{3C}, H_{3A} ed H_{3B} (Drutel et al., 2001). L'isoforma H_{3C} risulta essere maggiormente espressa nello striato, nel tubercolo olfattivo, negli strati V e VIb della corticale, negli strati piramidali dei campi ippocampali CA1 e CA2, nei nuclei talamici dorsali, nel *locus coeruleus*, in TMN, nel corpo trapezoide e nello strato delle cellule del Purkinje a livello cerebellare. H_{3A} risulta essere più debolmente espressa rispetto ad H_{3C}. A livello cerebellare, le cellule del Purkinje non esprimono in maniera significativa tale isoforma mentre nelle cellule dei granuli cerebellari essa risulta abbondante. L'espressione di tale isoforma nella parte dorsale del giro dentato ippocampale e nell'area CA1 risulta essere più prominente rispetto alle altre isoforme. In particolare l'elevata espressione di H_{3A} in HIP rende tale isoforma una potenziale candidata per la regolazione di alcune funzioni complesse modulate da tale area, quali memoria ed apprendimento (Drutel et al., 2001). Delle tre isoforme, H_{3B} risulta essere complessivamente quella meno espressa. La sua espressione è scarsa a livello delle cellule del Purkinje e delle cellule dei granuli cerebellari, è minima o comunque non rilevabile a livello del nucleo rosso ed è assente a livello del giro dentato. Nella corteccia l'espressione di H_{3B} è limitata agli strati V e VIb, mentre l'espressione non è

identificabile a livello dello strato II. Un pattern di espressione molto basso si ritrova a livello dello striato, del talamo e del *rafe* dorsale, mentre l'espressione più forte si rileva a livello dei TMNv (Drutel et al., 2001). Gli attuali risultati mettono in evidenza quindi una diversa espressione delle varie isoforme di H_{3R} in HIP. E' noto che tali isoforme nella formazione ippocampale sono localizzate principalmente sui neuroni piramidali dei campi CA1-3, nelle cellule dei granuli del dentato, ed in vie afferenti multiple lungo gli assoni. La bassa espressione delle isoforme dell'H_{3R} nell'area dorsale di CA3 è in contrasto con la forte espressione individuata nelle aree CA3 e CA1 ventrali. Ancora, negli esperimenti eseguiti con agonisti quali l'N α -metilHA, si è osservato come il segnale fornito da tale agonista sia basso a livello dell'ippocampo dorsale, mentre risulta essere moderato a livello di HIP ventrale. Queste osservazioni suggeriscono che HIP ventrale è regolato dai neuroni istaminergici del TMN principalmente attraverso le isoforme H_{3A} ed H_{3C} del recettore (Drutel et al., 2001). A livello della parte compatta della sostanza nigra non si evidenziano isoforme di H_{3R}. Tale condizione suggerisce che l'effetto inibitorio sul rilascio della dopamina mediato da tale sottotipo istaminergico ed osservato nel topo (Schlicker et al., 1993), potrebbe essere indiretto. Tale ipotesi è sostenuta dall'abbondante presenza dell'mRNA di H_{3R} nelle cellule striatali, le quali potrebbero così mediare l'effetto inibitorio nelle terminazioni dopaminergiche striatali. Una bassa espressione di tutte le isoforme di H_{3R} è stata inoltre evidenziata a livello del setto mediale, della banda diagonale e della sostanza innominata, aree nelle quali sono localizzati i neuroni dotati di proiezioni colinergiche. Anche la regolazione del rilascio di acetilcolina osservata *in vitro* (Clapham and Kilpatrick, 1992) od *in vivo* (Blandina et al., 1996) da parte di HA attraverso il suo recettore H_{3R} potrebbe coinvolgere meccanismi indiretti: in particolare, i neuroni corticali presenti in varie lamine della corteccia che esprimono H_{3R} potrebbero mediare tale effetto (Drutel et al., 2001). Le cellule del Purkinje cerebellari esprimono fortemente l'isoforma H_{3C} mentre l'isoforma H_{3A} è localizzata a livello delle cellule dei granuli. La presenza delle isoforme recettoriali H_{3C} ed H_{3A} su tali neuroni potrebbe indicare il coinvolgimento di HA nella regolazione delle funzioni cerebellari (Panula et al., 1993).

Come detto in precedenza le caratteristiche molecolari del recettore H_{3R} e la sua distribuzione encefalica sono state ampiamente approfondite nei Vertebrati terrestri, mentre frammentarie ed in alcune casi del tutto inesistenti risultano le informazioni relative a tale sottotipo nei Vertebrati acquatici. In particolare, la distribuzione di H_{3R} nell'encefalo dei Pesci è stata studiata principalmente in *Danio rerio* (Peitsaro et al., 2000), mediante saggi autoradiografici che riportano una maggiore densità di H_{3R} nel tetto ottico ed a livello della zona dorsale di HTH periventricolare, accanto a moderati livelli nelle altre regioni

ipotalamiche e nel nucleo centrale dei tori semicircolari. H₃R risulta distribuito inoltre nelle aree mesencefaliche e del tubercolo posteriore, nel *locus coeruleus*, nella commessura ventrale romboencefalica e nel nucleo del *rafe* superiore.

Negli ultimi anni sono state ottenute molte evidenze circa il ruolo di HA quale neuromodulatore di varie funzioni encefaliche, quali la formazione della memoria, l'emozione ed il *feeding* (Leurs et al., 1998) mediante l'attivazione del sottotipo H₃R. Allo scopo di comprendere il ruolo di H₃R nella regolazione del *feeding* sono stati creati topi *knockout* per H₃R (H₃R^{-/-}) e sono stati analizzati le proprietà chimico-fisiche e il comportamento (Tokita et al., 2006). In questi animali la mancata attivazione di H₃R determina un incremento nel rilascio di HA prevalentemente in alcune aree encefaliche come HTH, HIP, il cervelletto ed il peduncolo encefalico. L'assenza di H₃R in topi *knockout* non altera la fertilità e la vitalità e non provoca differenze nella taglia corporea rispetto ai topi *wild-type*. Al contrario, in essi si osserva una leggera iperfagia ed una forma di obesità a tarda comparsa; tale fenotipo si associa ad un eccessivo *feeding* e ad una ridotta efficienza energetica (Tokita et al., 2006). La manifestazione del fenotipo obeso rimane in realtà non ancora totalmente delucidata, in quanto contrapposta a quanto normalmente consegue in condizioni di inattivazione di H₃R. L'assenza di tale autorecettore presinaptico comporta infatti un maggiore rilascio di HA ed una maggiore stimolazione di H₁R con conseguente riduzione del *feeding* ed aumento del dispendio energetico (Kurose and Terashima, 1999). Tra le possibili interpretazioni, è stato suggerito che l'eccessivo rilascio di HA possa indurre la desensitizzazione e/o la *down-regulation* dei recettori post-sinaptici H₁R e H₂R attenuando in tal modo il tono istaminergico. Sulla base di tali evidenze appare chiaro che il ruolo di H₃R nella regolazione del *feeding* potrebbe essere sfruttato in farmacologia per la produzione di farmaci in grado di regolare l'assunzione di cibo. È stato riportato che farmaci bloccanti H₁R stimolano il consumo di cibo nell'uomo (Goudie et al, 2003): considerato che H₃R blocca il rilascio di HA, tale effetto potrebbe sopprimere l'appetito attraverso la stimolazione degli H₁Rs localizzati a livello postsinaptico.

Lo stato di ansia è una caratteristica di patologie quali AD, il cui decorso è strettamente correlato ad anomalie nei processi di neurotrasmissione che coinvolgono il sistema serotonergico, noradrenergico, dopaminergico ed istaminergico (Panula et al., 1998). Soggetti affetti da AD presentano livelli più bassi di HA a livello di HTH, HIP e della corteccia temporale. I caratteristici accumuli neurofibrillari associati a tale sindrome co-localizzano con i neuroni contenenti HA a livello dell'HTH posteriore (Airaksinen et al., 1991). Il coinvolgimento di HA nella regolazione dello stato di ansia è dimostrato da molti lavori sperimentali. In situazioni di stress acuto è infatti possibile rilevare elevati livelli di

HA in HTH di ratto ed allo stesso tempo in altre parti del diencefalo e del *nucleo accumbens* (van Meer and Raber, 2005). AMY e HIP costituiscono alcune delle principali regioni encefaliche coinvolte nella modulazione dell'ansietà (Alvarez et al., 2001), nelle quali è inoltre possibile riscontrare un'elevata densità di recettori H₁R ed H₂R (Brown et al., 2001; Haas and Panula, 2003). Tali osservazioni fanno ipotizzare che HA possa svolgere un effetto simil-ansigenico (Rostami et al., 2006), ipotesi in accordo con quanto dimostrato da Malmberg-Aiello et al. (2002) circa l'effetto ansigenico ottenuto a seguito dell'attivazione dell'H₁R. Ancora, la co-somministrazione di Tio e di un agonista di HA (beta-istidina) promuove l'induzione di stati di ansia (Imaizumi et al., 1996; Yuzurihara et al., 2000). Tali effetti ansigenici si osservano a seguito dell'iniezione di antagonisti di H₁R in HIP, nel grigio periacqueduttale e nel collicolo inferiore (Santos et al., 2003), mentre agonisti di H₂R manifestano un effetto ansiolitico. Considerata la variabilità di effetto che appare essere strettamente dipendente dall'area encefalica coinvolta, gli effetti del sistema istaminergico nella modulazione dei comportamenti correlati all'ansietà sono dunque regione-specifici. In particolare, il meccanismo attraverso il quale H₃R agisce nella modulazione dello stato di ansia non è stato ancora ben caratterizzato ma sono state suggerite delle potenziali vie coinvolte. E' noto che il fattore di rilascio delle corticotropine (CRF) e l'arginina vasopressina (AVP), fattori coinvolti nella regolazione dell'ansietà e della cognizione (Lee and Davis, 1997), mediano gli effetti di HA a livello ipotalamico e di altre regioni encefaliche, quale AMY. La stimolazione di H₃R determina l'inibizione del rilascio di HA ed una minore stimolazione di H₁R; in assenza di H₃R a livello di tale area, la maggiore produzione di HA e la maggiore stimolazione di H₁R potrebbero determinare il livello incrementato di AVP (Rizk et al., 2004). Gli effetti derivanti dalla deficienza di H₃R sull'ansietà differiscono da quelli registrati in caso di blocco di tale sottotipo. Tali differenze potrebbero essere causate da cambiamenti compensatori che si realizzano a livello uterino o nell'età adulta in risposta alla mancanza di H₃R. Attraverso la valutazione del comportamento esplorativo e degli stimoli che provocano ansia è stata infatti stimata un'ansietà sensibilmente incrementata in topi trattati in modo acuto con antagonisti di H₃R (Bongers et al., 2004), mentre in caso di costitutiva deficienza di tale recettore si osserva un decremento dell'ansietà (Rizk et al., 2004).

In uno studio condotto da Canonaco et al (2005) è stato analizzato il ruolo del sistema istaminergico nei processi neurodegenerativi scatenati dall'acido 3-nitropropionico (3-NP), un derivato vegetale che blocca la respirazione mitocondriale in un roditore ibernante. Le variazioni osservate in tali condizioni nell'espressione dei sottotipi H₁R ed H₃R suggeriscono un ruolo protettivo per il sistema istaminergico in particolari condizioni

stressorie. L'esposizione al 3-NP induce un incremento dei livelli di H₃R in corrispondenza del III e del V strato della corteccia e nella maggior parte delle aree amigdalari; tale alterazione si correla con una riduzione del livello di H₁R. L'*up-regulation* di H₃R è in accordo con le alterazioni motorie manifestate da pazienti affetti dalla malattia di Parkinson che esprimono livelli paragonabili di tale sottotipo recettoriale. D'altra parte, la somministrazione dell'antagonista Tio induce una *down-regulation* nell'espressione di H₃R, associata all'inibizione delle influenze di H₃R sui comportamenti motori anomali indotti da 3-NP, ed allo stesso tempo si assiste ad incrementi nell'espressione di H₁R. Questi risultati sembrano suggerire un ruolo neuroprotettivo del sistema istaminergico cerebrale in processi stato-fisiologici quali l'ibernazione (Canonaco et al., 2005).

Saggi funzionali condotti su H₃R. Le varie isoforme di H₃R umano sono state saggiate da un punto di vista funzionale attraverso la valutazione della risposta farmacologica in seguito al trattamento con molecole con proprietà agonista o antagonista. Per quanto concerne le prime cinque isoforme, la 3 e la 5 non sono in grado di generare una risposta biologica, mentre la 1, la 2 e la 4 manifestano una risposta variabile agli agonisti (Wellendorph et al., 2002). Sulla base di tali evidenze, si è concluso che una piccola sequenza all'estremità di *i3* che si estende nel dominio TMV potrebbe essere direttamente coinvolta nell'attività costitutiva di H₃R (Morisset et al., 2000). Questa sequenza nei recettori del ratto e del topo consiste di un motivo di 8-12 aminoacidi conservato anche nel recettore umano, che manifesta un'attività costitutiva *in vitro* (Rouleau et al., 2002). D'altra parte, l'incapacità delle isoforme 3 e 5 di generare una risposta biologica ha spinto ad un maggiore approfondimento circa il ruolo fisiologico che tali forme recettoriali possano svolgere. Bakker (2002) ha osservato che l'isoforma H_{3D} del ratto (rH₃ΔTM6-7, dove "r": ratto), che risulta essere inerte da un punto di vista funzionale e che non è in grado di legarsi al ligando, potrebbe essere tuttavia in grado di inibire il legame al ligando del recettore rH_{3A} (rH₃(445)), cioè dell'isoforma non sottoposta a *splicing* alternativo, attraverso un meccanismo ancora sconosciuto. Accanto alle isoforme di H₃R già da tempo caratterizzate rH_{3A}, rH_{3B}, rH_{3C} ed rH_{3T}, cui si aggiunge l'isoforma rH₃₍₄₁₀₎ di più recente scoperta, lo stesso autore riporta l'esistenza di altre isoforme del recettore H₃R del tutto inattive nei confronti dell'HA. Si tratta di tre isoforme identificate come rH_{3D}, rH_{3E} ed rH_{3F} che si differenziano dalle isoforme precedentemente identificate in quanto nascono dalla realizzazione di un evento di *splicing* alternativo aggiuntivo (Bakker et al., 2006). Tali isoforme recettoriali mancano del TMVII e contengono un'estremità C-terminale alternativa, probabilmente localizzata a livello extracellulare; per tali caratteristiche le isoforme suddette vengono comunemente indicate come isoforme "a sei TM" (isoforme 6TM-rH₃).

A livello delle isoforme 6TM-rH₃, i 53 amminoacidi C-terminali delle isoforme 7TM-rH₃ sono sostituite da una sequenza di 105 amminoacidi che non mostra nessuna omologia con i 53 amminoacidi suddetti. Numerosi studi funzionali hanno inoltre dimostrato l'incapacità delle isoforme 6TM-rH₃ di agire attraverso il *pathway* dell'adenilato ciclasi e di conseguenza l'incapacità di mediare le classiche funzioni di HA. Un ruolo importante sembra invece esistere per le isoforme 6TM-rH₃ nella regolazione dell'espressione delle isoforme 7TM-rH₃. Le isoforme 6TM-rH₃ riducono infatti l'espressione delle isoforme 7TM-rH₃ agendo in tal modo come isoforme dominanti negative. Il meccanismo attraverso il quale ciò potrebbe realizzarsi prevede un'interazione fisica tra i due tipi di isoforme: è noto infatti come durante la biosintesi e la maturazione dei GPCRs l'evento di oligomerizzazione rivesta un ruolo cruciale per un'appropriata esportazione del recettore a livello della membrana plasmatica (Bulenger et al., 2005). La co-espressione di varianti di GPCRs sottoposti allo *splicing* alternativo in alcuni casi favorisce l'espressione del recettore stesso a livello della membrana plasmatica, mentre in altri casi può ostacolare la sua espressione. Sulla base di tali conoscenze si ritiene molto probabile che le isoforme 6TM-rH₃ agiscano attraverso l'eterodimerizzazione per interferire con l'espressione funzionale delle isoforme 7TM-rH₃, ma al momento non sono ancora stati osservati eterodimeri tra le due specie di isoforme (Bakker et al., 2006). Molti studi dimostrano inoltre come i GPCRs interagiscano con molte proteine accessorie ritenute indispensabili per la loro biogenesi (Bermak and Zhou, 2001). In particolare tutti i GPCRs presentano, in corrispondenza dell'estremità C-terminale, un dominio ritenuto importante sia per un corretto ripiegamento proteico sia per un adeguato trasporto all'esterno del reticolo; tale dominio si è visto in seguito essere importante per l'interazione con una specifica proteina associata alla membrana del reticolo che regola il trasporto dei GPCRs. Il dominio in questione comprende nove amminoacidi (F(X)₆LL) ed è presente anche nelle isoforme 7TM-rH₃ di H₃R, mentre mancherebbe nelle isoforme 6TM-rH₃ dove risulta essere sostituito da un dominio diverso (RXR). Questa differenza tra le due specie di isoforme potrebbe essere responsabile della ritenzione delle isoforme 6TM-rH₃ a livello del reticolo. Sulla base di tali evidenze, le isoforme 6TM-rH₃ potrebbero quindi agire attraverso diversi meccanismi: potrebbero svolgere la funzione di *anti-chaperones*, ostacolando la maturazione ed il corretto avvolgimento del recettore, oppure potrebbero ostacolare l'interazione del recettore con specifiche proteine accessorie, cui consegue il mancato trasporto al di fuori del reticolo (Bakker et al., 2006). D'altra parte, la regolazione dello *splicing* alternativo dell'mRNA di H₃R costituisce un efficiente sistema di regolazione dell'attività di H₃R stesso. L'attività di H₃R, inclusa quella costitutiva, potrebbe essere difatti regolata da molteplici *pathways* e tra questi la via delle MAPK (Shin

and Manley, 2004). La capacità di H₃R di attivare la via delle MAPK (Drutel et al., 2001; Giovannini et al., 2003) ha fatto ipotizzare che da tale via possa derivare l'attivazione dei fattori dello *splicing*, suggerendo l'esistenza di un'attività autoregolativa (Bakker et al., 2006).

5. Ruolo fisiologico dell'istamina

Numerose evidenze sperimentali riportano il ruolo di HA quale neuromodulatore coinvolto in molteplici funzioni vitali tra cui la regolazione del ciclo sonno-veglia, i meccanismi omeostatici, la plasticità sinaptica e la memoria (Brown et al., 2001). Tra le aree principalmente coinvolte in tale *network* neuronale, il nucleo sovrachiasmatico (NSC) di molte specie contiene una fitta rete di fibre HA-immunoreattive (HA-ir), suggerendo in tal modo uno specifico ruolo per tale sistema nella modulazione dei ritmi circadiani (Abe et al., 2004). Studi di immunoistochimica hanno dimostrato che nei neuroni di NSC non è possibile rilevare mRNA codificante per HDC, che al contrario si ritroverebbe esclusivamente a livello dei neuroni di TMN: ciò suggerisce che la concentrazione di HA che caratterizza NSC sia in realtà il risultato di uno specifico meccanismo di trasporto di tale molecola dal suo sito di produzione. In generale, la forte innervazione istaminergica in HTH suggerisce per HA un ruolo chiave nella regolazione della sete, della fame, della temperatura corporea, dei ritmi circadiani e del rilascio ormonale. In particolare, l'attivazione di H₁R in alcune aree ipotalamiche quali il nucleo sopraottico (SO) in cui sono concentrati i neuroni che rilasciano la vasopressina, in NSC e nel nucleo ventromediale (VMN), regolerebbe in maniera specifica il comportamento alimentare. Inoltre, numerosi lavori riportano sia *in vitro* che *in vivo* l'effetto depolarizzante di HA in tali aree, associato ad un incremento sia del tasso di scarica neuronale che della durata dell'eccitazione. Tale meccanismo non è stato ancora definitivamente chiarito, ma la depolarizzazione potrebbe essere indotta dal blocco di una debole conduttanza al K⁺ o essere conseguenza dell'attivazione di una corrente cationica non specifica attivata dal Ca²⁺. Ad ulteriore conferma, la somministrazione di antagonisti specifici per H₁R incrementano l'assunzione del cibo e favoriscono la soppressione dei neuroni glucosio-sensitivi localizzati in VMN (Lecklin and Tuomisto, 1998). Inoltre, HA sarebbe anche in grado di sopprimere i processi anabolici diminuendo il rilascio dell'ormone della crescita (GH) e sopprimendo in generale la sensazione di sazietà (Monti, 1995).

La regione ipotalamica comprendente le diverse suddivisioni di TMN presenta numerose innervazioni con altre aree ipotalamiche e non: le porzioni TMNv e TMNd sono fortemente innervate dalla regione centrale dell'area preottica ventrolaterale (VLPO), area cerebrale particolarmente attiva durante il sonno REM (Sherin et al., 1998; Lu et al., 2000;

Steininger et al., 2001). Durante la veglia, i neuroni dei TMNv e TMNd attivano rapidamente una scarica di impulsi e l'elevata concentrazione di HA extracellulare contribuisce ad iniziare o mantenere lo stato di veglia. Anche le altre porzioni TMNv e TMNc mostrano differenti innervazioni dai neuroni dell'area VPLO durante la fase del sonno non-REM (NREM) (Sherin et al., 1998), ma considerando la stretta vicinanza anatomica esistente tra le porzioni TMNd e TMNc, è probabile che le due aree siano funzionalmente simili, sebbene l'attività dei neuroni di TMNd risulta in alcuni casi indipendente dalla fase circadiana (Ko et al., 2003). Un'ulteriore conferma del ruolo di HA nel mantenimento dello stato di veglia è fornita da studi in cui lesioni localizzate in HTH posteriore determinano l'instaurarsi di stati prolungati di sonno, mentre iniezioni intracerebroventricolari in tali area di agonisti del GABA condizionano gli stati di risveglio (Haas and Panula, 2003). Inoltre, deficit nella funzionalità di HDC determina l'instaurarsi di alterazioni delle funzioni di risveglio, attenzione e comportamento esplorativo di nuovi ambienti (Parmentier et al., 2002). Tali processi potrebbero essere modulati attraverso un meccanismo di *cross-talking* con il sistema dell'acetilcolina (Prast et al., 1999), in maniera simile a quanto riportato in studi che dimostrano un'azione positiva di HA nella stimolazione della memoria a breve termine come conseguenza del blocco di H₃R.

Nonostante la formazione ippocampale riceva solo una debole innervazione istaminergica, HA manifesta potenti effetti sull'eccitabilità di tale regione encefalica. Le principali cellule ippocampali piramidali e dei granuli esprimono prevalentemente il sottotipo H₂R, la cui attivazione induce depolarizzazione attraverso l'intensificazione dei canali cationici ed il blocco dei canali del K⁺ sensibili al Ca²⁺. Accanto all'azione esercitata su tali cellule in seguito all'attivazione di H₂R, HA agisce anche sull'eccitabilità degli interneuroni mediante l'induzione di un forte incremento nei potenziali postsinaptici inibitori (IPSPs) spontanei delle cellule piramidali della regione CA1 e delle cellule dei granuli nel giro dentato. Le azioni di HA nella regione ippocampale possono essere anche indirette, inducendo una forte depolarizzazione dei neuroni colinergici principalmente attraverso H₁R (Brown et al., 2001).

L'istamina e lo stress

Tra le funzioni autonome e neuroendocrine modulate da HA, l'attivazione dell'asse ipotalamo-pituitario-adrenocorticale (HPA) e la secrezione dell'ormone di rilascio delle corticotropine (CRH) costituiscono tra i più importanti processi fisiologici in condizioni di stress (Sakata et al., 1997; Ito, 2000). Fino a qualche anno fa non era ancora noto se differenti gruppi di cellule istaminergiche in TMN fossero implicati nella mediazione degli

effetti stressori; allo stesso modo non era stato ancora chiarito se il sistema istaminergico costituisca una parte del circuito centrale correlato allo stress o se diversi gruppi istaminergici di cellule fossero reclutati in modo dipendente dal tipo di agente stressorio. Recentemente alcuni studi hanno dimostrato la natura del coinvolgimento del sistema istaminergico nella risposta agli agenti stressori (Miklòs and Kovács, 2003; Canonaco et al., 2005). I neuroni istaminergici di TMN non appartengono infatti al circuito centrale correlato allo stress che viene attivato in modo stereotipato durante un evento stressorio, ma questa popolazione di cellule è reclutata in modo stress-specifico e contribuisce alla realizzazione delle risposte autonome e comportamentali ai diversi cambiamenti. I neuroni istaminergici reattivi allo stress sono inoltre coinvolti nel risveglio stress-indotto (Lin et al., 1994), nella locomozione (Parmentier et al., 2002), antinocicezione (Malmberg-Aiello et al., 1994) e nell'incrementato tono simpatico (Tsuda et al., 2002; Yoshimatsu et al., 2002). Queste evidenze suggeriscono un possibile ruolo del sistema istaminergico nella cascata neuroendocrina stress-indotta. I sottogruppi neuronali di TMN non si attivano tutti contemporaneamente in risposta allo stesso stimolo: condizioni di ipoglicemia indotta in ratti trattati con insulina determinano ad esempio l'attivazione dei sottogruppi rostrali (E3-E5) mentre l'immobilizzazione e la disidratazione determinano l'attivazione dei sottogruppi E4 ed E5 (Miklòs and Kovács, 2003).

Sulla base di tali considerazioni, studi recenti hanno iniziato a dimostrare il ruolo neuroprotettivo svolto da HA in risposta a svariate condizioni di stress di natura fisiologica o indotte da fattori ambientali e tossici. In particolare durante i vari stadi di ibernazione o in seguito a fenomeni neurodegenerativi indotti dall'azione di tossine mitocondriali, l'espressione di H₃R aumenta in alcune aree telencefaliche quali il nucleo caudato putamen (CP) e le aree corticali, mentre nelle aree ippocampali l'espressione di tale sottotipo diminuisce notevolmente ed aumenta quella di H₁R e H₂R (Sallmen et al., 2003; Canonaco et al., 2005). Notevoli modifiche nel contenuto totale di HA a livello cerebrale si realizzano anche negli stati ischemici: l'occlusione dell'arteria cerebrale determina infatti un incremento dei livelli di tale neurotrasmettitore nello striato e nella corteccia (Adachi, 2005), accanto a sensibili modifiche nell'espressione del sistema recettoriale con decrementi nell'espressione dell'mRNA per H₁R ed incrementi dei livelli di espressione per H₂R e H₃R (Lozada et al., 2005).

6. Le proteine dello stress (HSPs)

Le proteine dello *stress* (HSPs) sono una famiglia di proteine altamente conservate che partecipano alla sintesi e al *folding* delle proteine cellulari. Esse sono presenti nei diversi compartimenti subcellulari, quali il nucleo, i mitocondri, il reticolo endoplasmatico, il citosol e vengono suddivise in base al loro peso molecolare nelle cinque famiglie HSP 100, 90, 70, 60 e delle piccole HSP, con un peso molecolare tra 12 e 43 KDa, comprendenti l'ubiquitina o HSP8, HSP27, e HSP10. Molte situazioni di *stress* come ipertermia, infezioni virali, ischemia, anossia, stress ossidativo, esposizione ai metalli pesanti portano all'accumulo, all'interno della cellula, di proteine mal ripiegate innescando, quindi, la sintesi delle HSPs (fig. 8).

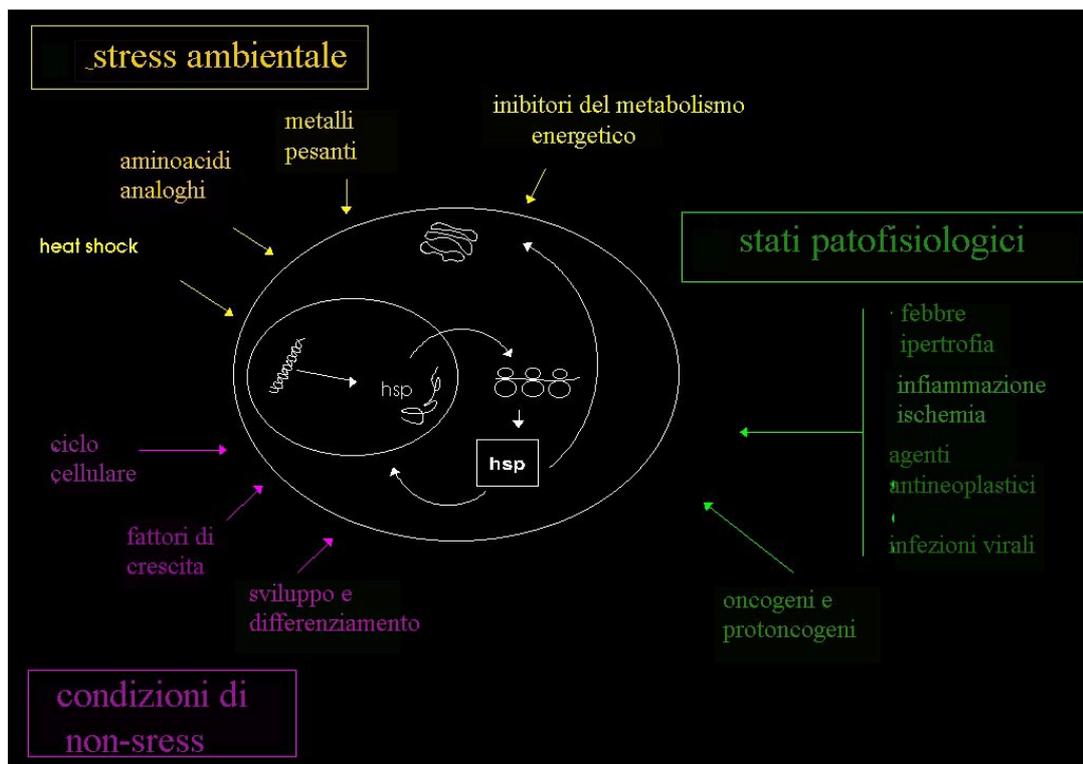


Fig.8 Fattori fisiologici e stressori in grado di indurre l'espressione delle HSPs.

Le HSPs sono molecole definite *chaperones*, in quanto legano e stabilizzano le proteine allo stato instabile non-nativo prevenendo la formazione di aggregati proteici troppo grandi e facilitando il normale *folding* delle proteine, la traslocazione attraverso la membrana e la degradazione e rimozione di proteine danneggiate (Agarraberes et al., 1997; Huang et al., 2001). In risposta ad una situazione di stress, la loro attività trascrizionale aumenta notevolmente nella fase iniziale per poi attenuarsi in proporzione all'intensità dello stimolo stressorio. La trascrizione dei geni per le HSPs richiede l'intervento dell'*heat shock factor*

(HSF), in grado di legare la sequenza promotore (HSE) del gene, caratterizzata da ripetizioni multiple e adiacenti del motivo pentanucleotidico 5'-nGAAn-3' (fig. 9).

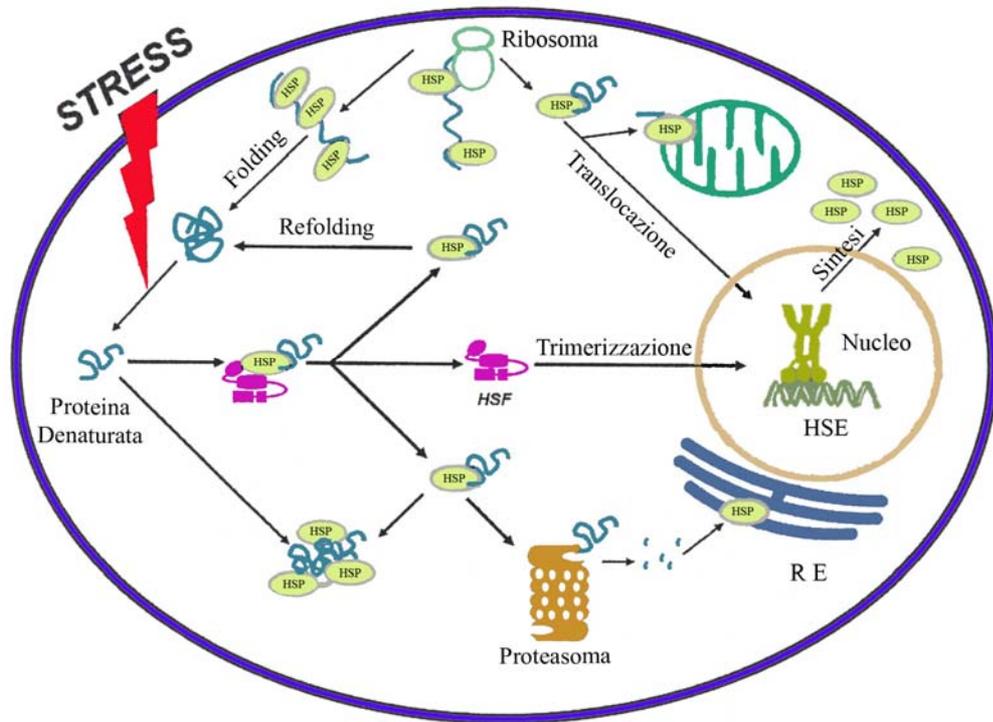


Fig. 9. Funzioni delle HSPs e la loro via d'induzione. Le HSPs si legano alla catena polipeptidica emergente dal ribosoma, partecipando al suo *folding* e assemblaggio. Inoltre, esse guidano alcune proteine *target* al nucleo, al mitocondrio e al reticolo endoplasmatico. La presenza di proteine denaturate, in condizioni di *stress*, fa sì che l'HSF1 venga rilasciato e subisca un processo di trimerizzazione, fosforilazione e traslocazione nel nucleo. Qui l'HSF1 si lega all'HSE nella regione del promotore del gene per le HSPs, determinando un sensibile aumento della sintesi delle HSPs (da Richter-Landsberg and Goldbaum, 2003).

La presenza di forme multiple di HSF (HSF1-4), sia nelle piante che negli animali (Nover and Shcarf, 1996; Nakai et al., 1997), testimonia la presenza di programmi specializzati nella risposta ai segnali di stress che controllano differentemente il grado di trascrizione dei geni per le HSPs e suggerisce, inoltre, la possibilità di nuove interazioni con altri fattori di regolazione, espandendo il numero e il tipo di associazione che esiste tra lo stress cellulare ed i *network* genetici. Nei Vertebrati HSF1 costituisce, in condizioni di stress, il principale regolatore dell'espressione delle HSPs, che in condizioni normali rimane inattivo sotto forma di monomero legato alle stesse HSPs (Zou et al., 1998). In seguito allo scatenarsi di un evento stressorio, HSF1 subisce un processo di fosforilazione che gli conferisce una

maggiore affinità per il DNA, riuscendo ad attivare il gene per le HSPs (Wu, 1995). La regolazione della sintesi delle HSPs costituisce dunque un processo importante che oltre a prevenire l'aggregazione proteica interviene nello sviluppo e nel differenziamento.

6.1 Ruolo delle HSPs in SNC

Nel SNC la sintesi delle HSPs non è indotta solo da variazioni di temperatura, ma anche da processi che causano un continuo cambiamento dello stato riduzionale dell'ambiente intracellulare (Calabrese et al., 2002). L'induzione della sintesi delle HSPs è importante per l'instaurarsi di specifici meccanismi di tolleranza e citoprotezione al danno molecolare causato da vari tipi di stress (Calabrese et al., 2000), quali possono essere rappresentati da disturbi metabolici, stati di ipossia, traumi cellulari e tissutali, disordini neurodegenerativi ed invecchiamento (Mayer, 2003). In particolare, le alterazioni del metabolismo energetico cellulare rappresentano fattori scatenanti la patogenesi di molti disordini neurodegenerativi (Calabrese et al., 2001), pertanto i mitocondri sono i bersagli prediletti dell'azione protettiva delle HSPs (Tsuchiya et al., 2003).

Di seguito verranno descritte le caratteristiche delle HSP90 e HSP70, scelte in tale lavoro per le particolari proprietà che esse possiedono: tra le HSPs, la HSP90 è la più costitutivamente espressa ed esercita un importante ruolo funzionale nel SNC, mentre la HSP70 rappresenta il principale *chaperone* coinvolto nei processi anti-apoptotici (Beere, 2005).

HSP90: struttura e meccanismo di azione

La HSP90 (90kDa *heat shock protein*) è una proteina citoplasmatica, costitutivamente espressa nel cervello dei Mammiferi (Brown, 1994), che svolge un'attività *chaperone*-simile e coopera con la HSP70 nella degradazione delle proteine *misfolded* (McClellan and Frydman, 2001). Inoltre, essa interagisce specificamente con elementi citoscheletrici, come l'actina e le proteine chinasi, e interviene in molte vie di trasduzione del segnale ormone-dipendenti e nel controllo del ciclo cellulare (Scheibel and Buchner, 1998; Yahara, 1998). La famiglia delle HSP90 comprende proteine altamente conservate e tutte mostrano un comune piano strutturale con un simile meccanismo d'azione. Tale famiglia include: 1) l'eponimo hsp90 del citosol eucariotico, di cui si conoscono 2 isoforme, HSP90 α e β , nell'uomo con un omologia del 86%; 2) HSP86 e HSP84 nel topo; 3) HSP83 in *Drosophila*; e 4) HSC82 (*heat shock chaperonin*) e HSP82 nel lievito (Argon and Simen, 1999; Felts et al., 2000). HSP90 è un omodimero costitutivamente espresso nel quale i principali contatti tra le diverse subunità sono localizzati in una regione di 190 aminoacidi all'estremità carbossi-terminale della

A differenza delle altre HSPs, HSP90 non è coinvolta nel *folding* delle proteine nascenti (Nathan et al., 1997) e ha come substrati le proteine di trasduzione del segnale. In condizioni fisiologiche normali, essa è presente ad una concentrazione pari all'1-2% del totale delle proteine citoplasmatiche, rivelandosi una delle più abbondanti proteine presenti nelle cellule non stressate. Questo suggerisce un suo ruolo costitutivo, essenziale per il mantenimento dell'attività di quasi cento proteine di segnale (Pratt and Toft, 2003). HSP90 è in grado di legare proteine allo stato quasi nativo e proteine ad un avanzato stato di *folding* (Jakob et al., 1995) ed interviene nei meccanismi di rinaturazione e di *refolding* delle proteine danneggiate, agendo insieme ad altri elementi con cui costituisce una grande "macchina operatrice", un *multichaperone* che comprende anche HSP70 ed altre *co-chaperones* (Bose et al., 1996). Anomalie nel funzionamento di tale complesso di degradazione proteica generano inclusioni cellulari ed aggregati proteici tipici di alcune patologie neurodegenerative (Kopito et al, 2000).

Nei meccanismi di trasduzione del segnale, HSP90 interviene in particolare nel processo di maturazione dei recettori dei glucocorticoidi (GR; Pratt and Toft, 1997), oltre che di tiroxine e serine/treonine chinasi, ossido nitrico sintasi (NOS) e calcineurina (Garcia-Cardena et al., 1998; Imai and Yahara, 2000). Il *pathway* di segnale HSP90-dipendente più ampiamente caratterizzato è quello del recettore dell'ormone steroideo (Young and Hartl, 2000). Il recettore monomero GR è legato alla HSP90 con un meccanismo HSP70-dipendente e raggiunge la corretta conformazione solo dopo l'interazione con HSP90. Il meccanismo attraverso cui il complesso HSP70/90 regola la configurazione del dominio per il legame dello steroide necessita di un meccanismo ATP-dipendente. Nell'ultimo stadio del processo interviene un'altra categoria di proteine, le immunofiline e le proteine ad esse associate che presentano domini di interazione proteina-proteina, tramite cui legano il recettore steroideo indirizzandolo dal citoplasma al nucleo (Pratt and Toft, 1997). In seguito a trattamenti farmacologici con GA, è stato osservato nel SNC che il movimento rapido di tale complesso cessa ed i recettori si accumulano densamente nel nucleo sia di cellule non-neuronali (Galigniana et al., 2001) che nei neuroni (Galigniana et al., 2004). L'osservazione che la GA blocca il movimento di GR nei neuriti suggerisce, inoltre, che il complesso HSP90-dipendente è essenziale per il trasporto dei recettori lungo assoni e dendriti (Workman et al., 2003).

HSP90 è considerata anche un target tumorale, dal momento che risulta sovra-espressa nelle cellule cancerogene (Chiosis et al., 2003) ed è in grado di stabilizzare molti prodotti oncogenici quali *Raf-1*, recettori estrogenici ed androgenici e p53 (Neckers, 2002). L'inibizione di HSP90 porta alla degradazione simultanea di queste proteine oncogeniche e

per tale motivo gli inibitori di HSP90 sono potenzialmente utili nella terapia del cancro (Prodromou and Pearl, 2000).

Ruolo della HSP90 nel SNC. La HSP90 è presente in quantità abbondante sia nelle terminazioni presinaptiche che postsinaptiche (Tobaben et al., 2001) ed è in grado di controllare il rilascio di molti neurotrasmettitori (Sakisaka et al., 2002). Numerosi studi hanno dimostrato come tale *chaperone* svolge un ruolo importante nella trasmissione sinaptica, sia a livello presinaptico che postsinaptico, necessario per un efficiente rilascio di neurotrasmettitore nelle terminazioni presinaptiche glutaminergiche mediante l'interazione con una proteina contenente un dominio TPR (Gerges et al., 2004) o con proteine motrici, intervenendo nei meccanismi di movimento assonico (Pratt and Toft, 2003).

Durante lo sviluppo del SNC dei Mammiferi, HSP90 è altamente espressa nella fase G₀ del ciclo cellulare durante la differenziazione neuro-ectodermica e contribuisce al mantenimento delle cellule in questa fase (Walsh et al., 1997). Studi immunologici hanno dimostrato che HSP90 non è espressa solo nel citoplasma ma è presente anche sulla superficie delle cellule neuronali (Cid et al., 2004) dove parteciperebbe ai processi di migrazione cellulare in SNC (Sidera et al., 2004). Un ulteriore dato che conferma la partecipazione di HSP90 in questi processi viene da studi condotti con anticorpi policlonali anti-HSP90 in cellule migratorie di Schwann nelle quali è stata ritrovata una riduzione della formazione delle lamelle, suggerendo associazione HSP90-actina. Il ruolo di HSP90 potrebbe essere quello di mantenere la corretta conformazione dei recettori di membrana, contribuendo al successo del legame ligando-recettore, in seguito al quale si attiva una cascata di segnali trasduzionali che portano al riarrangiamento del citoscheletro essenziale per la motilità cellulare.

HSP70: struttura e meccanismo di azione

HSP70 è una delle più diffuse HSPs, presente in tutte le cellule viventi ed indotta in risposta a *stress* ossidativi, a ipossia-ischemia, a stimoli apoptotici e a danni neuronali. Appartiene ad una famiglia che include alcune forme costitutivamente espresse, altre moderatamente inducibili, una proteina HSC70 *cognate* con un apparente peso molecolare di 73KDa e, infine, una proteina glucosio-regolata, come la Grp78, che è localizzata nel lume del reticolo endoplasmatico. Inoltre, tutti i membri di questa famiglia legano ATP e svolgono, così, un'attività *chaperone*-simile (fig. 11). In SNC la forma inducibile di HSP70 non è costitutivamente espressa, ma viene sintetizzata in seguito ad un trauma neuronale, danno tissutale e stati ischemici (Brown, 1994). Nel citoplasma e nel nucleo HSP70, riconosce e

lega le catene polipeptidiche nascenti, gli intermedi parzialmente ripiegati di proteine e previene, così, la loro aggregazione (Tavaria et al., 1996).

TPR domains of Hop

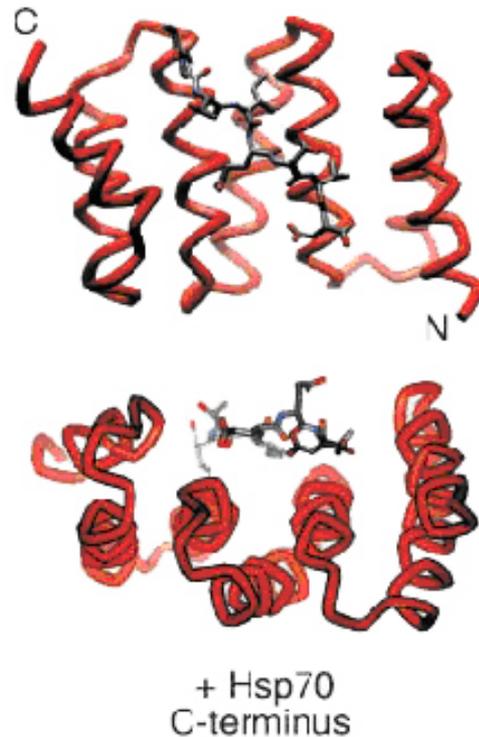


Fig. 11 Rappresentazione a cristallo di HSP70 che lega l'NH₂-terminale TPR dominio di Hop complessato con il peptide GPTIEEVD COOH-terminale della proteina stessa.

Alcuni studi hanno rilevato che in SNC HSP70 possiede un'alta espressione costitutiva al pari di quella di altri organi e tessuti (Tanguay et al., 1993). La sintesi basale di tale proteina è aumentata, però, da diverse condizioni di *stress*, con una risposta che varia nelle differenti regioni cerebrali (Manzerra and Brown, 1992). Tale proteina è espressa sia nei neuroni che nelle cellule della glia (Nowak et al., 1990), sebbene gli astrociti mostrano una differente risposta allo stress rispetto ai neuroni (Marcuccilli et al., 1996). Nel SNC di ratto dal primo periodo postnatale sino alla maturità, l'espressione costitutiva di HSP70 risulta molto più bassa rispetto all'espressione costitutiva di HSC70. Nei ratti di due anni di età, invece, è stata riscontrata in alcune aree cerebrali una maggiore concentrazione di HSP70 costitutiva rispetto a quella che, normalmente, si ha nei ratti di sei mesi. Ciò ha confermato che HSP70 gioca un ruolo importante nei processi di invecchiamento, ostacolando la denaturazione proteica (Unno et al., 2000).

Recenti studi condotti da Bechtold e Brown (2003), nel cervello dei Mammiferi, hanno evidenziato che HSP70 è sovraregolata durante la risposta allo *shock* termico (Sharp et al., 1999) in particolar modo ad alti livelli di *stress* termici (43.5 °C; Leoni et al., 2000), oltre ad intervenire quale meccanismo neuroprotettivo anche in stati ischemici ed altri traumi cerebrali (Yenari et al., 1999).

6.2 HSPs nei Pesci

Le principali famiglie di HSP individuate nei Pesci sinora studiati sono tre: HSP90 (85-90kDa), HSP70 (68-73kDa), e molecole a basso peso molecolare (16-47kDa), ognuna di esse coinvolta in un differente meccanismo cellulare. In particolare, è stato dimostrato che anche in tali Vertebrati acquatici, HSP90 interagisce con vari elementi del citoscheletro e con il recettore steroideo (Young et al., 2001); HSP70 è coinvolta nel *foldings* delle proteine nascenti e media la riparazione e degradazione di proteine alterate o denaturate (Kiang and Tsokos, 1998); HSPs a basso peso molecolare svolgono funzioni specie-specifiche e non sono costitutivamente espresse ma indotte solo in seguito a stress (Ciocca et al., 1993). I Pesci, in maniera analoga agli altri Vertebrati, reagiscono di fronte ad una situazione stressante attivando dunque un sistema di risposta cellulare rappresentato principalmente dall'azione delle HSPs (Goligorsky, 2001): molti studi dimostrano, difatti, una correlazione tra l'esposizione ad agenti stressori e un aumento dei livelli di tali proteine nei Pesci. Attualmente, comunque, la caratterizzazione delle sequenze geniche codificanti per le HSPs nei Pesci è scarsa ed i pochi dati disponibili in letteratura riguardano soprattutto la HSP70 (Basu et al., 2002).

I geni delle HSPs e fattori regolanti la loro espressione nei Pesci

L'analisi dei geni delle HSPs e la comparazione delle loro sequenze promotore con quelle di diversi organismi hanno portato all'identificazione di una sequenza palindromica HSE legante il fattore di trascrizione HSF, che nei Pesci mostra elevata omologia con quella dell'uomo e del ratto. Tale similarità suggerisce che i geni di HSF nei Pesci si siano evoluti in seguito ad un processo di divergenza oppure, in alternativa, che il genoma di tali animali contenga geni multipli di HSF (Rabergh et al., 2000). In *Danio rerio* sono stati individuati due trascritti relativi ad HSF1 tra di loro molto simili, ad eccezione di una inserzione/delezione di 78bp dovuta probabilmente a varianti derivate da *splicing*. Nella stessa specie sono state identificate le due isoforme α e β di HSP90, caratterizzate da meccanismi regolatori indipendenti tra di loro durante lo sviluppo embrionale; inoltre la

sequenza completa di HSP90 α è stata ottenuta anche in *Oncorhynchus tshawytscha* (Palsimano et al., 2000).

L'espressione delle HSPs nei Pesci è influenzata da una serie di fattori biotici e abiotici. Nella prima categoria rientrano lo stress da calore, che induce l'espressione delle HSPs in determinate linee cellulari, in colture cellulari primarie (Sathiyaa et al., 2001) e nei tessuti (Ackerman et al., 2000), e lo stress osmotico che in *Oncorhynchus tshawytscha* (Palmisano et al., 2000) e in *Salmo salar* (Pan et al., 2000) induce un'elevata espressione dell'mRNA per HSP90. Numerosi studi hanno, inoltre, dimostrato che elevati livelli di tale proteina sono osservabili in Pesci esposti a contaminanti ambientali, come metalli pesanti (Williams et al., 1996; Duffy et al., 1999), residui industriali (Vijiayan et al., 1998) e pesticidi (Hassanein et al., 1999). Per quanto concerne i fattori biotici che influenzano l'attività di HSP90, anche nei Pesci è stato osservato un aumento dell'espressione di tale proteina in seguito all'infezione di cellule con il virus necrotico ematopoietico (Cho et al., 1997). Nei Pesci, inoltre, l'infiammazione causata dall'esposizione ad agenti patogeni può alterare processi fisiologici a livello cellulare ed, in particolar modo, il bilancio acido-base e la regolazione ionica. Inoltre in tali animali, le HSPs potrebbero essere una componente integrale del complesso di assemblaggio del sistema di maggiore istocompatibilità di classe I I (MHC-classe I I; Basu et al., 2002) coinvolta nella presentazione dell'antigene ai componenti competenti del sistema immunitario.

Numerosi studi comparativi condotti su modelli animali, quali *Xenopus laevis* e *Drosophila melanogaster*, hanno dimostrato che le HSPs svolgono una specifica funzione cellulare durante l'embriogenesi e nelle varie fasi di sviluppo (Morange, 1997). In *Danio rerio* la HSP90 α è scarsamente espressa durante lo sviluppo, ma in seguito ad uno stress indotto da calore, l'espressione di tale proteina aumenta notevolmente. Dall'altra parte, i livelli di HSP90 β sono alti in condizioni normali e solo poco incrementati rispetto a HSP90 α in seguito ad esposizione a calore (Krone and Sass, 1994), a dimostrazione che le due isoforme sono regolate in maniera differente e probabilmente svolgono ruoli differenti durante lo sviluppo embrionale. Gli studi più numerosi sono stati condotti sulla HSP70, la cui espressione è finemente regolata a livello trascrizionale. Attualmente, sono state caratterizzate le sequenze geniche codificanti per HSP70 in *Onchorhynchus mykiss* (Kothary et al., 1984), *Oryzia latipes* (Arai et al., 1995), *Danio rerio* (Lele et al., 1997) e *Oreochromis mossambicus* (Molina et al., 2000).

Nei Pesci i livelli delle HSPs possono essere regolati da alcuni ormoni (Sathiyaa et al., 2001) e tra questi il cortisolo, che in quantità elevata è in grado di sopprimere l'induzione di varie HSPs ed in particolare: 1) HSP30 nei tessuti branchiali di *Oncorhynchus clarki*

(Ackerman et al., 2000); 2) HSP70 nelle branchie e nel fegato di *Oncorhyncus mykiss* (Basu et al., 2001); 3) HSP90 nelle colture primarie di epatociti di *Oncorhyncus mykiss* (Sathiyaa et al., 2001). Questi dati suggeriscono una potenziale interazione tra le HSPs e processi fisiologici mediati dagli ormoni, soprattutto quelli che risultano implicati nelle risposte cellulari allo stress come cortisolo e adrenalina. E' stato osservato che, nonostante l'emivita relativamente breve, i livelli delle HSPs rimangono alti nei Pesci anche dopo la rimozione dell'agente che ha causato lo stress. Sulla base di tali evidenze, è ragionevole supporre che tali proteine giochino un ruolo fondamentale nell'adattamento a lungo termine degli animali in relazione all'ambiente in cui vivono (Morimoto and Santoro, 1998), coadiuvando gli organismi acquatici nella risposta a cambiamenti ambientali cui sono continuamente esposti.

In generale, considerata l'estrema sensibilità delle HSPs alle diverse condizioni di stress, tali proteine si offrono come eccellenti biomarkers nelle indagini di tossicità ambientale, poiché la loro induzione è un indice di inibizione della crescita in particolar modo per gli organismi aquatici. L'uso delle HSPs in tale tipo di indagini si estende ai Rotiferi (Cockrane et al., 1991), Policheti (Ruffin et al., 1994) Molluschi (Steinert and Pickwell, 1998) e Pesci (Ryan and Hightower, 1994). In tale tipo di approccio, lo studio delle HSPs negli ambienti acquatici costantemente soggetti a condizioni variabili, può costituire un utile strumento di monitoraggio stressore-dipendente e specie-specifico.

Materiali e Metodi

Parte I: Organizzazione anatomica dell'encefalo di *Thalassoma pavo*

Lo studio neurocomportamentale e molecolare necessita di una completa comprensione delle caratteristiche morfologiche dell'encefalo preso in esame, al fine di delinere le complesse interazioni funzionali tra le diverse regioni e comprendere le caratteristiche evolutive ed adattative messe in atto da determinati sistemi neuronali. A tal proposito tale lavoro sperimentale si avvale di una prima parte atta alla determinazione delle caratteristiche strutturali dell'encefalo di *Thalassoma pavo*.

1.1 Metodo di Nissl

Al fine di caratterizzare le principali regioni neuroendocrine dell'encefalo di *Thalassoma pavo*, è stata condotta un'analisi morfometrica e citoarchitettica, mediante la quale sono stati identificati, dalla porzione rostrale alla caudale i più importanti gruppi cellulari neuronali. Per tale studio animale (n=5) di *Thalassoma pavo*, il cui peso oscilla tra i 15-20g, sono stati sacrificati per il prelievo dell'encefalo, congelato rapidamente in ghiaccio secco e conservato a -20°C. Le misure lineari dell'encefalo di tale Teleosteo e delle singole porzioni cerebrali sono state effettuate al fine di ricavare i seguenti parametri: lunghezza totale dell'encefalo (BL) dall'estremità rostrale del bulbo olfattivo all'estremità caudale del cervelletto (Cb); larghezza dell'encefalo (BW) misurata alle estremità degli emisferi; larghezza dei bulbi olfattivi (Wb); lunghezza dei bulbi olfattivi (BulbL); lunghezza dell'area ipotalamica (LHp); lunghezza del cervelletto (CbL); altezza dell'encefalo (BH), dei bulbi (BHb) e di Cb (BHCb). La misurazione di altezza, lunghezza e larghezza ha consentito la successiva determinazione dei volumi delle aree encefaliche. Per realizzare l'analisi citoarchitettica è stata condotta una colorazione istologica con il metodo di Nissl su sezioni encefaliche dello spessore di 14 µm realizzate al criostato, mediante la quale sono stati messi in rilievo i principali nuclei cerebrali e le caratteristiche fondamentali di ogni area encefalica.

Protocollo della colorazione di Nissl

-Fase di idratazione

15' in EtOH 100%; 2' in EtOH 95%; 2' in EtOH 80%; 2' in EtOH 70%; 2' in EtOH 60%; 2' in EtOH 30%.

-Colorazione in cresil violetto (0,4% per 25').

-Lavaggi post-colorazione

Immersione in H₂O; 30'' in EtOH 95%; 1,5' in EtOH 95% con acido acetico glaciale.

-Disidratazione

30'' in EtOH 95%; 30'' in EtOH 100% (4 volte);

-Chiarificazione

30" in xilene (4volte);

Montaggio e osservazione al microscopio ottico.

In seguito alla colorazione le sezioni encefaliche di *Thalassoma pavo* sono state analizzate al microscopio ottico ad un ingrandimento di 10X e 20X al fine di determinare e la localizzazione e l'organizzazione citoarchitettonica dei più importanti nuclei encefalici. L'analisi morfologica dei nuclei in *Thalassoma pavo* è stata effettuata confrontando la loro localizzazione citoarchitettonica con quella degli schemi riportati nell'atlante di Cerda-Reverter et al. (2001a,b).

Parte II: Studio comportamentale ed analisi neurodegenerative

Gli inquinanti ambientali quali metalli, pesticidi e altri composti organici costituiscono seri fattori di rischio per la maggior parte degli organismi acquatici, per cui sempre più numerose sono le ricerche atte ad investigare gli effetti di tali composti tossici sulla fisiologia e la sopravvivenza di questi animali (Wood, 2001). In generale, negli studi tossicologici il modello sperimentale viene sottoposto a varie concentrazioni dell'agente chimico contaminante per un periodo relativamente lungo, al fine di mimare condizioni di esposizione cronica. Analisi preliminari atte alla determinazione della *dose letale* di uno specifico contaminante, definita come 96-h LC50 (concentrazione alla quale il 50% degli animali esposti muore nelle 96 ore) sono indispensabili per la scelta del range di concentrazione da utilizzare, che generalmente oscilla all'incirca tra 1/10 (dose subletale definita "low observable acute effects level: LOAEL") ed 1/2 (definita "maximum acceptable toxicity: MAT") della stessa dose letale per gli studi di tipo cronico. In questa parte del lavoro è stata condotta la determinazione di una precisa correlazione funzionale tra anomalie nel comportamento e fenomeni di degenerazione neuronale in *Thalassoma pavo*, attraverso l'applicazione di specifiche analisi comportamentali che si avvalgono del software "Etholog 2.2.5" e tecniche istologiche specifiche per l'individuazione dei neuroni degenerati.

L'uso delle tecniche di colorazione istologica nello studio delle alterazioni degenerative in SNC ha subito un significativo incremento negli ultimi anni. Tali procedure consentono di identificare e valutare l'entità dei danni neuronali poichè i coloranti utilizzati sono in grado di legare in maniera specifica i neuroni degenerati. In particolare, ACS è una specifica tecnica istochimica che mette in evidenza le caratteristiche morfologiche e strutturali dei neuroni degenerati consentendo il riconoscimento degli effetti indotti da diversi tipi di traumi come quelli neurotossici, fisici o provocati da uno stato di ipossia (Poirier et al., 2000). La validità di un simile approccio sperimentale è stata recentemente utilizzata in diversi

contesti: nella degenerazione acuta e subacuta neuronale indotta dalla privazione del sonno (Eiland et al., 2002), nella narcolessia (Siegel et al., 1999), nei traumi ischemici ed ipossici e nella somministrazione di sostanze neurotossiche (de Olmos et al., 1994). Tale tecnica si basa sulla capacità dei neuroni degenerati di reagire con i sali d'argento che, depositandosi sui loro corpi cellulari, dendriti ed assoni, vengono poi ridotti ad argento metallico (proprietà di argirofilia-argentofilia). L'innesco della reazione di impregnazione può manifestarsi entro pochi minuti dal trauma e può persistere per diversi giorni o settimane (Jensen, 1995). Recentemente le classiche tecniche istologiche di degenerazione neuronale sono affiancate da tecniche che sfruttano specifici coloranti fluorescenti quale il Fluoro-Jade B, la cui applicazione consente una sensibile localizzazione della degenerazione neuronale indotta da stati epilettici o da altri tipi di insulto cerebrale (Hopkins et al., 2000). Essa rappresenta una tecnica istochimica più rapida e più adatta di altri metodi meno recenti, per gli inequivocabili vantaggi nell'analisi quantitativa e qualitativa (Schmued and Hopkins, 2000).

In questo lavoro è stato condotto uno studio delle alterazioni comportamentali indotte dal trattamento con contaminanti ambientali quali i metalli pesanti Cd^{2+} e Pb^{2+} e dai pesticidi Ed e Atr nel Teleosteo *Thalassoma pavo*, monitorando in particolare le attività motorie e alimentari. I risultati ottenuti dallo studio comportamentale sono stati correlati all'analisi di degenerazione neuronale in aree encefaliche critiche per il loro ruolo nella regolazione delle risposte comportamentali. Tale analisi neurodegenerativa è stata realizzata ricorrendo a due diverse tecniche, il metodo dell'ACS ed il metodo del Fluoro-Jade B, entrambi specifici per i neuroni degenerati (Eiland et al., 2002; Anderson et al., 2005).

2.1 Animali e trattamenti

Le donzelle pavonine (*Thalassoma pavo*) sono state prelevate dal mar Tirreno e sistemate nel laboratorio di Neuroanatomia Comparata in acquari della capacità di 150 L, ad una temperatura di 20-22° C ed a pH 8 e alimentati con gamberetti due volte al giorno. L'acqua di mare, prelevata dallo stesso sito di provenienza in cui le donzelle sono state pescate, è stata sottoposta a periodici cambi allo scopo di mantenere costante la concentrazione di nitriti ed impedire lo sviluppo di infezioni. Dopo una settimana di acclimatazione, gli animali sono stati separati in gruppi sperimentali e sottoposti ai diversi trattamenti. In particolare sono stati organizzati cinque gruppi sperimentali tra i quali un primo gruppo consiste di un acquario controllo (Ctrl; n=6), costituito da animali mantenuti alle suddette condizioni senza l'aggiunta di alcun contaminante. I quattro gruppi sperimentali sono stati invece trattati per la durata di sette giorni con i metalli pesanti Cd^{2+} (n=4) e Pb^{2+} (n=4) e con i pesticidi Ed (n=4) ed Atr (n=4). Per ciascuno dei contaminanti testati sono state utilizzate

due concentrazioni significative: dose subletale (LOAEL) e di massima tossicità accettabile (MAT), calcolate sulla base dei valori di dose letale (LC_{50}) determinate durante secondo il metodo di Klassen et al. (1991; fig. 12) in uno screening preliminare.

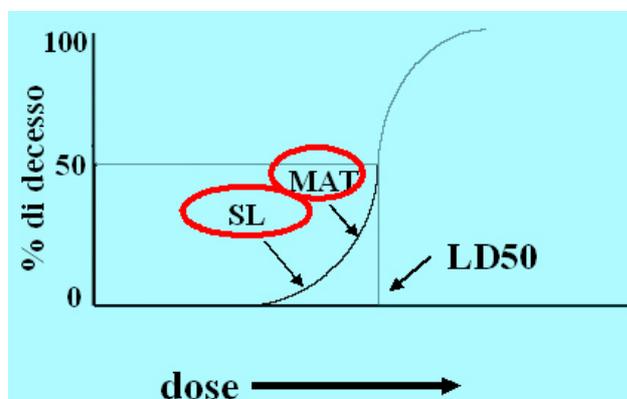


Fig.12 Curva logaritmica che rappresenta il metodo di determinazione delle dosi LOAEL e MAT per i metalli pesanti e pesticidi presi in considerazione in questo studio. La LC_{50} rappresenta la concentrazione alla quale il 50 % degli animali muore.

Le concentrazioni utilizzate in tale lavoro sia dei metalli pesanti che dei pesticidi sono riportate in tabella (fig. 13).

Agente tossico	LOAEL	MAT
Cadmio (Cd^{2+})	2.26 mg/L	11.32 mg/L
Piombo (Pb^{2+})	0.4 mg/L	1.6 mg/L
Endosulfan (Ed)	0.2 μ g/L	1.3 μ g/L
Atrazina (Atr)	100 μ g/L	400 μ g/L

Fig.13 Concentrazioni dei contaminanti ambientali testate nel lavoro.

In tutti i trattamenti le soluzioni contenenti i metalli e pesticidi sono state preparate disciogliendo $CdCl_2$, $Pb(NO_3)_2$, Ed e Atr (Sigma) direttamente nell'acqua sostituendo giornalmente tali soluzioni negli acquari. Durante la settimana di trattamento, ogni gruppo sperimentale è stato costantemente monitorato per lo studio comportamentale ed al termine di tale periodo gli animali sono stati sacrificati ed è stato eseguito il prelievo del tessuto

encefalico. Dopo il prelievo, alcuni encefali sono stati conservati a -20 °C per il taglio al criostato. Di questi, alcuni (n=4) sono stati tagliati in sezioni seriali di 30 µm utilizzate per l'analisi neurodegenerativa condotta con ACS e Fluoro-Jade B.

Il mantenimento degli animali e tutte le procedure sperimentali sono stati condotti in accordo con 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). Gli esperimenti sono stati effettuati cercando di ridurre al minimo la sofferenza e il numero dei campioni usati.

2.2 Studio comportamentale

Lo studio comportamentale è stato condotto realizzando, per ciascuno dei trattamenti eseguiti, tre osservazioni giornaliere della durata di 45 minuti cadauno mediante utilizzo di videocamera (Panasonic NV7). Le immagini digitali sono state successivamente analizzate da uno specifico *software* (Etholog 2.2.5) ampiamente utilizzato negli studi comportamentali (Ottoni, 2005), in grado di calcolare i tempi relativi a ciascuna delle categorie comportamentali prese in esame:

- *Nuoto*: l'animale si muove manifestando un atteggiamento esplorativo dello spazio a disposizione all'interno dell'acquario;
- *Inattività*: l'animale è quasi completamente immobile;
- *Movimento in superficie*: l'animale compie movimenti repentini verso l'alto cercando un maggiore apporto di ossigeno;
- *Alimentazione*: l'animale si muove manifestando un atteggiamento di cattura del cibo;
- *Iperventilazione*: l'animale rimane fermo sul fondo dell'acquario ed accelera il ritmo della respirazione;
- *Guizzi ed Iperattività*: l'animale compie movimenti bruschi durante il nuoto manifestando un'iperattività.

2.3 ACS: protocollo sperimentale

Il protocollo sperimentale si basa sul metodo di de Olmos et al., (1994) applicato nei Mammiferi con opportune modifiche relative al tessuto encefalico dei Pesci. L'intero encefalo di *Thalassoma pavo* è stato congelato e conservato a -20°C, fino al momento del taglio al criostato in sezioni seriali dello spessore di 30 µm. La prima fase dell'ACS è detta di **preimpregnazione (P)**: le sezioni sono ricoperte di una soluzione P (AgNO₃; acido dl-α-ammino-n-butirrico; dl-alanina; Cu(NO₃)₂ 0,5%; Cd(NO₃)₂ 0,5%; La(NO₃)₂ 0,5%; rosso

neutro 0,5%; piridina; trietanolammina; isopropanolo) precedentemente filtrata; i vetrini permangono in stufa a 50°C per 50 minuti. Successivamente le sezioni vengono raffreddate a temperatura ambiente per circa tre ore, al termine delle quali assumono un colore marroncino. La seconda fase è detta di **impregnazione argentica (I)**: le sezioni subiscono due passaggi in acetone, in continua agitazione per 30 secondi e successivamente vengono immerse nella soluzione I (AgNO₃; etanolo 100%; acetone 0,5%; LiOH; NH₄OH). Le sezioni permangono in questa soluzione per 50 minuti, a temperatura ambiente e sempre in continua agitazione. La terza fase è detta di **riduzione (R)**: le sezioni vengono trasferite nella soluzione R per 25 minuti a 32°C (formalina 10%; acido citrico monoidrato 1%; etanolo 100%). Dopo i primi 5 minuti vengono addizionati per ogni 100 ml di soluzione totale circa 1,2 ml di soluzione I, suddivisa in 4 aggiunte di 0,3 ml ognuna a intervalli di 5 minuti. Quando le sezioni assumono un colorito marrone scuro, vengono trasferite in acqua distillata per due minuti ed infine in acido acetico glaciale 0,5% per 1-2 minuti al fine di bloccare la reazione. Le sezioni vengono mantenute in acqua distillata *overnight*, in modo che l'impregnazione argentica abbia il tempo di stabilizzarsi. La colorazione si completa il giorno successivo con la fase di **chiarificazione**, che consiste in tre passaggi consecutivi: immersione delle sezioni nella soluzione C₁ (ferrocianuro di potassio 6% in soluzione con il clorato di potassio 4%; acido lattico) per 90 secondi a temperatura ambiente, sciacquo in acqua distillata, ed immersione nella soluzione C₂ (permanganato di potassio 0,06%, acido solforico 5%) per circa 60 secondi a temperatura ambiente. Infine, nella fase di stabilizzazione le sezioni vengono trasferite in soluzione acquosa di tiosolfato di sodio 2%, in agitazione, per 2 minuti, con successivo trasferimento in acqua distillata per 2-5 minuti. Successivamente vengono immerse in soluzione Rapid Fixer (Kodak, soluzione concentrata di Rapid Fixer A:B in proporzione 35:1) al massimo per 5 minuti e, dopo un rapido passaggio in acqua distillata, le sezioni vengono immerse per 20 minuti in rosso neutro 0,5%. Infine si procede alla differenziazione attraverso passaggi successivi in concentrazioni crescenti di etanolo (50%, 70%, 95% e 100%), alcool-xylene (1:1) e xylene puro, ed infine le soluzioni vengono montate con DPX ed osservate al microscopio ottico.

2.4 Fluoro-Jade B: protocollo sperimentale

L'applicazione della tecnica istologica che si avvale del colorante Fluoro-Jade B consente una rapida e precisa identificazione del danno neuronale in specifiche aree cerebrali, considerata l'elevata specificità che tale composto possiede nei confronti dei neuroni degenerati (Anderson et al., 2005). Il Fluoro-Jade B è un derivato polianionico della

fluoresceina con iridiscenza verde, picco di assorbimento a 480 nm e picco di emissione a 525 nm. Il filtro usato per la visualizzazione è quello per la fluoresceina/FITC.

Prima della colorazione le sezioni encefaliche di 30 µm vengono trattate nel modo seguente:

- Immersione in etanolo (EtOH) 100% per 3 min;
- Immersione in etanolo (EtOH) 70% per 3 min;
- Immersione in acqua distillata per 1 min.

In seguito i vetrini sono posti in soluzione di permanganato di potassio 0,06% per 15 min, in continua agitazione, con un successivo risciacquo in acqua distillata, per 1 min. Da qui in avanti i passaggi vengono effettuati in camera buia ed i vetrini sono immersi nel colorante Fluoro-Jade B (Chemicon) 0,001% per 30 min, sotto costante agitazione e successivamente in 3 passaggi in acqua distillata di 1 min ciascuno. Prima di passare alle ultime fasi (3 passaggi in xylene di 2 min ciascuno), i vetrini sono stati adagiati su appositi lettini a temperatura ambiente per almeno 20 min, in modo da completare la fase di asciugatura. Infine le sezioni sono lasciati ad asciugare *overnight* e conservati al buio ed a temperatura ambiente, fino all'osservazione al microscopio a fluorescenza (Leica, 10x, 20x). La disponibilità di encefali interi, dall'estremità rostrale alla caudale, ha consentito di realizzare nei vari gruppi sperimentali un'analisi quantitativa del danno neuronale indotto dal trattamento, sulla base della metodologia riportata in altri studi (Anderson et al., 2005). In dettaglio, tutte le sezioni seriali di intere porzioni cerebrali (telencefalo, HTH, mesencefalo) sono state elaborate all'analizzatore di immagine (Scion Image 2.0) per calcolare il volume di riferimento di tali aree (V_{ref}). Nelle stesse aree, con un ingrandimento 20x, è stato possibile riconoscere le singole cellule neuronali e stimare il numero totale di neuroni degenerati mediante applicazione della seguente formula:

$$N_v = [\sum(N/V_{sezione})/n] \times V_{ref}$$

dove N_v : numero di neuroni sensibili al Fluoro-Jade B (degenerati), calcolati in una porzione cerebrale; N : è il numero di neuroni sensibili al Fluoro-Jade B in una singola sezione appartenente a tale porzione; $V_{sezione}$: volume di una singola sezione; n : numero di sezioni analizzate per ogni porzione; V_{ref} : volume totale della porzione considerata.

Parte III: Ruolo neuroprotettivo del sistema istaminergico e HSPs

Per la determinazione delle caratteristiche neurotossiche indotte dai contaminanti ambientali nel modello sperimentale *Thalassoma pavo* in questo lavoro sono stati prescelti due markers neuronali di caratteristiche diverse ma in grado di integrarsi finemente per l'espletarsi di complesse risposte adattative allo stress. In tale contesto è stato analizzato il ruolo

neuroprotettivo del sistema istaminergico, per il quale in tale specie sono state indagate le caratteristiche molecolari, farmacologiche e fisiologiche dei suoi principali sottotipi mediante autoradiografia recettoriale, RT-PCR, ibridazione *in situ* e saggi farmacologici, e la risposta trascrizionale delle HSP90 e HSP70.

3.1 Animali e trattamenti

In maniera paragonabile a quanto riportato nella seconda parte per lo studio comportamentale e neurodegenerativo, anche per tale parte le donzelle pavonine (*Thalassoma pavo*) sono state prelevate dal mar Tirreno e sistemate nel laboratorio di Neuroanatomia Comparata in acquari della capacità di 150 L, ad una temperatura di 20-22° C ed a pH 8 e alimentati con gamberetti due volte al giorno. Dopo una settimana di acclimatazione, gli animali sono stati separati in gruppi sperimentali e sottoposti ai diversi trattamenti. Al fine di determinare gli effetti indotti dai contaminanti ambientali, utilizzati nella seconda parte di questo lavoro, sull'espressione del sistema istaminergico e delle HSPs, sono stati organizzati cinque gruppi sperimentali tra i quali un primo gruppo consisteva di un acquario controllo (Ctrl; n=6), costituito da animali mantenuti alle suddette condizioni senza l'aggiunta di alcun contaminante. In parallelo, l'encefalo di alcuni animali (n=3) appartenenti a tale gruppo è stato utilizzato per condurre un'analisi preliminare mediante autoradiografia recettoriale, al fine di verificare la presenza del sistema istaminergico in *Thalassoma pavo* e caratterizzare i principali sottotipi recettoriali. Per quanto concerne i trattamenti con i contaminanti ambientali, quattro gruppi sperimentali sono stati invece trattati per la durata di 7 giorni con i metalli pesanti Cd²⁺ (n=5) e Pb²⁺ (n=5) e con i pesticidi Ed (n=5) ed Atr (n=5). Per ciascuno dei contaminanti testati sono state utilizzate le due concentrazioni LOAEL e MAT, riportate in fig. 13.

Successivamente, per valutare le caratteristiche funzionali dei recettori istaminergici altri Pesci sono stati suddivisi in diversi gruppi sperimentali e sottoposti a diversi trattamenti intraperitoneali (i.p.) condotti con antagonisti per i recettori istaminergici Cimetidina (Cim; n=3 per ciascuna concentrazione testata) e Tioperamide (Tio; n=3 per ciascuna concentrazione testata), specifici per H₂R e H₃R rispettivamente. Al fine di determinare quale sia la concentrazione di tali composti in grado di indurre una variazione significativa di un parametro biologico quale il peso corporeo, è stato necessario effettuare uno screening di concentrazioni, come di seguito riportato:

- Cim (50, 150, 200, 250 mg/kg peso corporeo);
- Tio (1, 5, 10, 20 mg/kg peso corporeo).

I due antagonisti sono stati disciolti in una soluzione salina preparata con NaCl 0.9%, ed allo stesso tempo alcuni animali (n=3) sono stati sottoposti a trattamento i.p. con la sola soluzione salina 0.9%, in assenza di alcun agonista/antagonista, al fine di ottenere il cosiddetto *sham-operated*, ovvero un animale di controllo nel quale sia possibile osservare l'assenza di significative variazioni di parametri biologici e molecolari rispetto agli animali intatti (n=3). La determinazione di uno *sham* è fondamentale per stimare nell'analisi dei dati quale siano le variazioni realmente indotte dal trattamento.

Una volta valutate le concentrazioni ottimali di Cim e Tio, queste stesse concentrazioni sono state utilizzate per effettuare doppi trattamenti che hanno previsto in *Thalassoma pavo* la somministrazione i.p dei due antagonisti a tale dose e l'esposizione ai contaminanti ambientali (Cd²⁺, Pb²⁺, Ed, Atr) alla concentrazione MAT. Lo schema di tali trattamenti prevede dunque: Cim+Cd²⁺ (n=4); Cim+Pb²⁺ (n=4); Cim+Ed (n=4); Cim+Atr (n=4); Tio+Cd²⁺ (n=4); Tio+Pb²⁺ (n=4); Tio+Ed (n=4); Tio+Atr (n=4). Al termine dei trattamenti, tutti della durata di una settimana, gli animali sono stati sacrificati e l'encefalo è stato velocemente prelevato per le diverse analisi di tipo molecolare e neurodegenerativo. Le analisi comportamentali e neurodegenerative sono state condotte secondo le metodiche illustrate nella seconda parte per quanto concerne gli effetti indotti dagli antagonisti istaminergici e dai trattamenti combinati antagonisti/contaminanti ambientali. Per l'analisi molecolare, l'encefalo di alcuni animali appartenenti al gruppo dei controlli è stato conservato a -80°C per la successiva estrazione dell'RNA totale e per l'analisi molecolare. Gli altri encefali sono stati invece conservati a -20°C e sottoposti al taglio con il criostato. Le sezioni di spessore variabile (14 µm e 30 µm) sono state utilizzate, rispettivamente, per l'ISH e per lo studio neurodegenerativo condotto con colorazione Fluoro-Jade B.

3.2 Autoradiografia recettoriale

L'autoradiografia quantitativa è una tecnica molto sensibile che richiede la coesistenza di una serie di parametri: un'alta risoluzione spaziale che consente un'efficace misurazione di strutture anatomiche adiacenti; un'alta efficacia di rilevamento in modo da ridurre i tempi di esposizione ed aumentare l'accuratezza statistica; una bassa soglia di rilevamento (associata ad un rumore di fondo sempre presente), al fine di rilevare anche bassi livelli di espressione in tempi di esposizione minimi (Charon et al., 1998). In questa tecnica i radioleganti devono essere caratterizzati da elevata attività specifica ed affinità verso il recettore e una struttura tridimensionale molto affine alla sostanza endogena normalmente presente a livello cellulare e la distribuzione neuroanatomica dei recettori può essere visualizzata proprio grazie alle radiazioni emesse dai siti radioattivi, mediante l'utilizzo di opportune lastre fotografiche. La

densità dell'immagine può essere quantizzata mediante analizzatore d'immagine con l'utilizzo di standard specifici.

Le caratteristiche biochimiche dei recettori vengono evidenziate mediante l'esecuzione dell'analisi di *Scatchard* su concentrazioni diverse di sostanza marcata. Dalla curva ottenuta mediante questa analisi statistica si risale al numero massimo di siti recettoriali disponibili nel sistema (β_{max}) ed alla concentrazione ottimale di radiolegante (K_d). Per lo studio di saturazione il tessuto viene incubato con diverse concentrazioni del legante radioattivo che agisce da agonista o antagonista del recettore, in presenza (NSB, non specific binding) o in assenza (TB, total binding) del cosiddetto legante freddo, in concentrazione da 1000 a 10.000 volte maggiore del legante marcato; i valore del legame specifico si ricavano secondo la seguente: $SB = TB - NSB$. Accanto a tale analisi, il metodo dell'inibizione competitiva permette la rilevazione ed il confronto della distribuzione neuroanatomica dei sottotipi recettoriali di un sistema neurotrasmettitoriale nelle diverse aree encefaliche. L'incubazione viene effettuata utilizzando la concentrazione ideale del radioligando, in presenza di diverse concentrazioni di agonisti o antagonisti non marcati, individuando per essi il valore di concentrazione che inibisce al 50% il legame (IC_{50}).

Farmacologia per lo studio recettoriale *in vitro*. Lo studio di competizione è stato condotto mediante l'ausilio di sostanze antagoniste per HA, quali Pir, Cim e Tio, rispettivamente selettivi per H_1R , H_2R e H_3R (fig. 14). Per H_1R in studi realizzati nei Mammiferi l'antagonista che mostra la maggiore specificità è risultata Pir (K_B 0.4 nM), che a dosi terapeutiche è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica causando effetti sedativi (Hill et al. 1997). Pir viene impiegata come sedativo a dosaggi terapeutici e come anafilattico nelle riniti allergiche, congiuntiviti e dermatiti. Inoltre il sistema istaminergico modula gli stati di ansietà mediante attivazione di H_1R , cui consegue un effetto ansiogenico che viene abolito mediante pretrattamento con Pir (Lecklin and Toumisto, 1998; Malmberg-Aiello et al., 2002). Cim risulta l'antagonista più frequentemente usato negli studi condotti su H_2R e mostra affinità quasi nulla per H_1R ($pK_B = 3.3$) o H_3R ($pK_B = 4.5$).

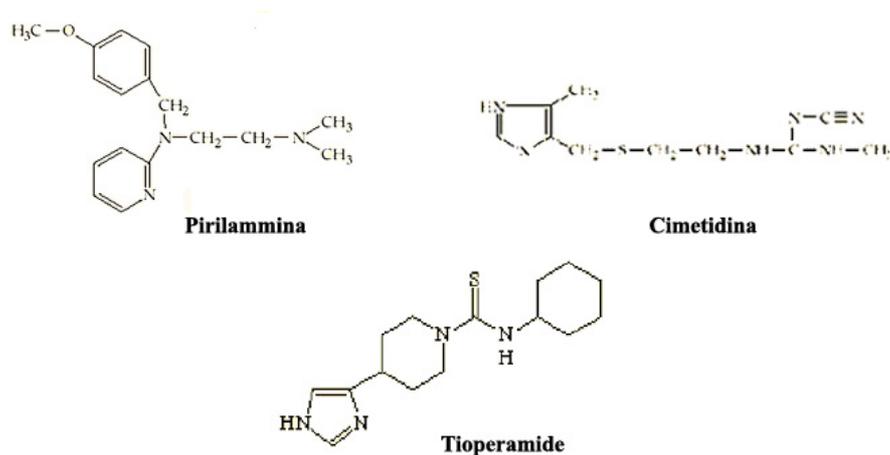


Fig. 14 Struttura chimica dei principali antagonisti istaminergici

La forma neutra di questo antagonista presenta, in soluzione acquosa a pH fisiologico, due forme tautomeriche di anello imidazolico ed una grande flessibilità nella catena laterale che può portare alla formazione di molti legami idrogeno intramolecolari tra i due tratti terminali della molecola, in particolare a livello dei gruppi guanidinico e dell'anello tiazolico, fondamentali per il riconoscimento con il recettore (Giraldo et al., 1992). Dal punto di vista fisiologico, Cim è in grado di indurre effetti convulsivi, stimolanti ed ansiogenici (van der Goot and Timmermann 2000). Per quanto concerne H₃R, Tio costituisce il più potente e selettivo antagonista, in grado di promuovere il rilascio di HA cerebrale, coinvolto anche nella cura dell'obesità ed epilessia (Leurs et al., 1998). Tale antagonista agisce interferendo con l'azione autoinibitoria di H₃R, causando quindi un aumento del rilascio di HA, cui conseguono livelli elevati di cAMP nella cellula (Wieland et al., 2001).

Protocollo Sperimentale. Il protocollo sperimentale utilizzato è stato ricavato da Peitsaro et al., (2000) con alcune modifiche nei tempi dei postlavaggi e nella durata di incubazione (Giusi et al., 2004, 2005a). Le sezioni encefaliche di *Thalassoma pavo* sono state sottoposte ad incubazione per un periodo di 45 minuti con il buffer (PBS 150mM pH 7,5; MgCl₂ 2mM) con aggiunta di DTT 100μM (1μl/50 μl di tampone). La concentrazione del radiolegante da aggiungere a tale buffer è stata scelta in seguito a prove seriali di concentrazione, il cui risultato prevede l'utilizzo del radiolegante [³H]-N-α-metilHA (NAMH) a 25 nM (PerkinElmer Life Science; attività specifica 82 Ci/mmol). Tale agonista di HA è dotato di affinità verso i tre sottotipi recettoriali presi in esame. Gli antagonisti specifici per H₁R, H₂R e H₃R sono stati aggiunti al buffer di incubazione in varie concentrazioni (1μM-1nM) al fine

di rilevare la specificità del segnale per ogni sottotipo. Per ottenere NSB è stata utilizzata Pyr 500mM. Successivamente all'incubazione con il tampone marcato, la cui durata complessiva è di 45 minuti, si è proceduto ad un primo lavaggio con buffer ghiacciato al fine di stabilizzare il legame con il radiolegante, seguito da 4 passaggi di due minuti cadauno in buffer fresco. Infine si effettua un lavaggio in acqua distillata ghiacciata seguito da asciugatura *overnight*. Successivamente i vetrini marcati sono stati sottoposti a pellicole fotografiche (Hyperfilm, Amersham), al buio ed a temperatura ambiente per 6 settimane fino al momento dello sviluppo e la successiva valutazione quantitativa dell'attività neuronale mediante analizzatore di immagine (Scion Image 2.0, NIH-Image).

3.3 Estrazione dell'RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale è una particolare tecnica sperimentale che necessita di massima sterilità e del mantenimento di una temperatura ottimale quale quella cui vengono congelati gli encefali destinati a tale trattamento (-80 °C) per l'inattivazione dell'RNAsi. Il protocollo utilizzato in tale lavoro si basa sul metodo di Chomczynski and Sacchi (1987). Encefali di *Thalassoma pavo* (n=3) mantenuti alle suddette condizioni, sono stati polverizzati con mortaio e pestello in azoto liquido e trasferiti in una eppendorf sterile. Stimato il peso del campione in esame, per ogni 100 mg di tessuto è stato aggiunto 1 ml di buffer di estrazione "TRIreagent" (Sigma), una soluzione costituita da fenolo e da guanidina isotiocianato 4M che denatura le proteine. Al tessuto omogeneizzato è stato aggiunto cloroformio e, mediante centrifugazione a 14.000 rpm (4°C), la fase acquosa contenente l'RNA è stata così separata da quella organica. L'aggiunta di isopropanolo alla fase acquosa ha consentito di precipitare l'RNA in modo che nel campione, al termine della centrifugazione, fosse eliminato il sovrante. Il pellet rimanente è stato quindi lavato con etanolo 75%, asciugato al flusso per 30 min e disciolto in H₂O contenente dietilpirocarbonato (DEPC), un agente alchilante che agisce sui residui di istidina, fondamentali per l'attività catalitica dell'RNAsi. L'RNA estratto è conservato a -20°C.

Analisi qualitativa e quantitativa del RNA estratto. Per valutare l'integrità dell'RNA estratto, il campione è stato fatto correre su gel d'agarosio (1%): il risultato della corsa ha evidenziato due bande strette relative alle due subunità, maggiore (28s) e minore (18s) dell'RNA ribosomiale. Per valutare la quantità di RNA estratto sono state effettuate, inoltre, le misurazioni spettrofotometriche della densità ottica (OD) di un'aliquota di campione diluita in rapporto 1:200 (3,5µl di RNA in 696,5 µl di H₂O sterile) a due lunghezze d'onda, 260 nm e 280 nm. La concentrazione di RNA estratto è stata misurata in µg/µl in base alla formula:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = (40 \times \text{dil} \times \text{OD}_{260})/1000$$

in cui 40 rappresenta il fattore di conversione espresso in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; dil è il fattore di diluizione; 1000 rappresenta l'unità numerica per ottenere $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a partire da $\mu\text{g}/\text{ml}$. Il rapporto dei due valori di OD ottenuti (OD_{260}/OD_{280}) fornisce anche le indicazioni necessarie per valutare la qualità del materiale estratto. Un campione è considerato puro se tale rapporto ha valori compresi tra 1.6 e 2.2; il nostro campione è risultato puro.

3.4 Trascrizione inversa

La trascrizione inversa (RT) permette di ottenere una doppia elica di DNA (cDNA) da uno stampo di RNA per azione dell'enzima trascrittasi inversa. In questa reazione viene usato come *primer* un oligo dT (deossitimina) che si appaia in maniera complementare all'estremità 3' dell'mRNA, caratterizzato in tutti gli mRNA eucariotici da una coda di poliA. La trascrittasi inversa più comunemente usata è quella del virus della leucemia murina di Moloney (M-MuL V), che catalizza la reazione portando alla formazione di un temporaneo eteroduplex mRNA-cDNA. L'mRNA viene successivamente allontanato o mediante l'utilizzo di un'RNasi H che digerisce in modo specifico l'RNA legato al DNA nell'ibrido mRNA-DNA, oppure sottoponendo l'RNA a trattamento alcalino al fine di ottenere un singolo filamento di cDNA. In questo lavoro, per la reazione di RT è stato utilizzato il Kit RETROscript (CELBIO). Sono stati prelevati $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ di RNA totale estratto dall'encefalo di *Thalassoma pavo* a cui sono stati aggiunti $2\mu\text{l}$ di Oligo dT ($50\mu\text{M}$) e acqua nucleas-free fino a raggiungere un volume di $12\mu\text{l}$; a questo punto la miscela è stata posta a 75°C per 3 minuti. Successivamente, sono stati aggiunti $2\mu\text{l}$ di RT buffer 10X (TRIS-HCl 500 mM , $\text{pH}=8,3$; KCl 750 mM , MgCl_2 30mM , DTT 50mM); $4\mu\text{l}$ di dNTP mix ($2,5\text{ mM}$ per dNTP); $1\mu\text{l}$ di RNase Inhibitor ($10\text{ unità}/\mu\text{l}$) e $1\mu\text{l}$ dell'enzima M-MLV ($100\text{ unità}/\mu\text{l}$) per un volume totale di $20\mu\text{l}$. I campioni sono stati posti a due step successivi, 1 ora a 44°C e 10 min a 92°C . Il cDNA ottenuto è conservato a -20°C .

3.5 La reazione a catena della DNA polimerasi

La reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) è una reazione di amplificazione del DNA a partire da piccole quantità di uno specifico stampo e consta di una serie di cicli di amplificazione, ognuno dei quali si svolge attraverso tre fasi principali:

- **denaturazione** del DNA al calore, che apre la doppia elica fornendo lo stampo singolo per la reazione;
- appaiamento dei *primers* (**ibridazione**);
- sintesi di DNA (**polimerizzazione**).

Ciascun ciclo di PCR raddoppia la sequenza bersaglio, per cui l'amplificazione è da considerarsi esponenziale, permettendo di ottenere in 30 cicli 10^5 - 10^6 volte la sequenza bersaglio. Un maggior numero di cicli non aumenta, tuttavia, la quantità di prodotto finale in quanto si raggiunge un *plateau* con amplificazione sempre meno efficiente. Con l'impiego di DNA polimerasi ottenute da batteri termofili (Taq polimerasi da *Thermophilus aquaticus*) si è potuto automatizzare il processo di PCR; infatti, la resistenza al calore dell'enzima ha impedito che durante i vari cicli di denaturazione, appaiamento dei *primers* e polimerizzazione, la DNA polimerasi perdesse la sua funzionalità. Inoltre, alle alte temperature cui l'enzima risulta attivo, l'*annealing* dei primers è più specifico. L'azione della Taq polimerasi dipende dalla concentrazione di ione magnesio (Mg^{2+}) che ne potenziano la reattività, per cui occorre evitare elevate concentrazioni di questo ione che possono determinare l'amplificazione di frammenti aspecifici.

Scelta dei primers. Uno dei requisiti fondamentali per la buona riuscita della reazione è ovviamente la scelta dei *primers* che devono essere complementari al frammento di cDNA da amplificare ed avere caratteristiche specifiche e selettive. A tale proposito, nel disegno dei *primers* bisogna tener conto di alcuni parametri fondamentali: in primo luogo, la lunghezza dei *primers* non deve essere superiore ai 25 nucleotidi per sequenze bersaglio di DNA appartenenti a genomi complessi, al fine di diminuire la probabilità di appaiamento con regioni che presentano una sequenza simile ma non di interesse (inefficienza dell'*annealing*); secondariamente, vanno evitate le unità ripetute in tandem di uno o più nucleotidi perché ciò potrebbe comportare la formazione di amplificati aspecifici; infine, la concentrazione in CG deve essere tra il 50-60% per dare maggiore stabilità. Un altro importante parametro da tenere in considerazione è la temperatura di *melting* (T_m ; valore di temperatura cui il DNA è parzialmente svolto) che deve essere simile per la coppia di *primers* e consente di fissare la temperatura di ibridazione inferiore di 5°C rispetto ad essa. Inoltre, va evitata la complementarità tra le estremità 3' dei due *primers*, per impedire la formazione di dimeri di *primers* che riduce l'efficienza dell'amplificazione.

In questo lavoro, si è proceduto alla caratterizzazione molecolare in *Thalassoma pavo* di parziali cds codificanti per due sottotipi istaminergici (H₂R e H₃R) e due HSPs (HSP70 e HSP90). Le coppie di primers per ogni gene sono state disegnate sulle rispettive sequenze geniche di *Rattus norvegicus* in regioni conservate e considerata la potenziale distanza filogenetica tra le due specie in esame, tali *primers* sono stati degenerati, in maniera tale da innalzare la probabilità di appaiamento tra la sequenza che funge da innesco e la sequenza incognita. La sequenza di tutti i *primers* utilizzati è riportata nella fig. 15:

GENI	PRIMERS	SEQ. n°	Lungh. primer
H₂R	for 5'TCACCTATCCTTCCTCTCNATHCA	440	25
	rev 5'GCATAGCCCAANCATAGNACAAT	833	23
H₃R	for 5'CGCCCTTCCTCAGNGTNAC	626	19
	rev 5'CCCACAGNAGCCARAAGGA	1207	19
HSP90	for 5'AAGTCTGGTACAAARGCNTTYA	319	22
	rev 5'TCAAAGAGGTCAAANGGNGC	1034	20
HSP70	for 5'ACCGTGCCCGCCTAYTTYA	610	19
	rev 5'ACGACAGCGTCCTYTTNGC	1003	19

Fig. 15 Sequenze dei *primers* utilizzati, disegnati sulla base di regioni conservate delle sequenze di *Rattus norvegicus*.

Il programma di amplificazione è stato messo a punto dopo una serie di tentativi atti a trovare le condizioni ottimali e che sono risultate essere le seguenti per ogni singolo gene testato. H₂R (denaturazione 94°C per 2 min, seguito da 35 cicli a 94°C per 40 sec, 53°C per 50 sec, 72°C per 40 sec ed infine l'estensione finale a 72°C per 5 min) frammento atteso 394 bp; H₃R (denaturazione 94°C per 2 min, seguito da 35 cicli a 94°C per 50 sec, 55°C per 50 sec, 72°C per 35 sec ed infine l'estensione finale a 72°C per 5 min) frammento atteso 582 bp; HSP90 (denaturazione 94°C per 2 min, seguito da 35 cicli a 94°C per 1 min, 55°C per 1 min, 72°C per 1 min ed infine l'estensione finale a 72°C per 5 min) frammento atteso 716 bp; HSP70 (denaturazione 94°C per 2 min, seguito da 35 cicli a 94°C per 1 min, 56°C per 40 sec, 72°C per 1 min ed infine l'estensione finale a 72°C per 5 min) frammento atteso 394 bp. Tutti gli amplificati sono stati conservati a -20°C. Per verificare l'avvenuta reazione di amplificazione del frammento atteso, un'aliquota di prodotto di PCR è stata sottoposta a corsa elettroforetica su gel d'agarosio (2%), stimando in tal modo lunghezza e purezza del frammento.

Purificazione del prodotto di PCR

Per la purificazione del frammento genico di PCR è stato utilizzato il kit *Wizard SV gel and PCR clean up system* che permette di estrarre e purificare frammenti di DNA della lunghezza compresa tra 100bp e 10kb da gel d'agarosio mediante l'azione di tris-acetato (TAE) o di tris-borato (TBE) o, in alternativa, di purificare prodotti di PCR direttamente rimuovendo in ambedue i casi l'eccesso di nucleotidi e di *primers*. Completata la corsa elettroforetica, la banda è stata prelevata dal gel, trasferita in eppendorf e disciolta in presenza di guanidina isotiocianato (*membrane binding solution*), 10 µl ogni 10 mg di gel d'agarosio, sciolti a

50°C. La miscela di gel disciolto è stata trasferita in una SV minicolonnina ed il campione è stato sottoposto a lavaggi successivi con una soluzione di *membrane wash solution*, precedentemente diluita con etanolo 95% per favorire la rimozione dei sali. Al termine di una serie di centrifugazioni, il DNA purificato è stato diluito in 50 µl di H₂O *nuclease-free* e conservato a -20°C. In seguito, è stato possibile effettuare anche la precipitazione di tale campione aggiungendo 1/10 di volume di sodio acetato (concentrazione finale 0.3M) e due volumi di etanolo 100% freddo. Dopo tre centrifugazioni, seguite ognuna dalla rimozione del sovrantante, in fase finale il pellet di DNA è stato risospeso in H₂O *nuclease-free* ed il prodotto ottenuto è stato inviato per il servizio di sequenziamento (GeneLab-ROMA).

3.6 Ibridazione *in situ*

L'ibridazione *in situ* (ISH) è una tecnica molecolare che consiste nel legame tra una sonda di acido nucleico a sequenza nota (*probe*) e l'mRNA endogeno presente nel tessuto e codificante per la proteina di interesse, mediante formazione di nuovi legami idrogeno tra le basi complementari. Per realizzare la fase di ibridazione vera e propria è necessario preliminarmente marcare la sonda oligonucleotidica mediante terminal deossinucleotidil transferasi (TdT), un enzima che catalizza l'aggiunta di nucleotidi marcati all'estremità 3'-OH libera del filamento. In questo lavoro, per la reazione di marcatura è stata utilizzata la digossigenina (DIG), un aptene derivato da un alcaloide vegetale e legato mediante un braccio spaziatore di 11 atomi di carbonio alla posizione C-5 del nucleotide uridina. Ottenuti i cds parziali per i quattro geni di interessi che sono stati considerati in questo lavoro, sono state disegnate sonde complementari all'mRNA codificante per tali proteine in *Thalassoma pavo*. La presenza del *probe* è rilevabile nell'ibrido sonda-bersaglio in seguito a reazione con uno specifico anticorpo (1:100) coniugato alla fosfatasi alcalina, enzima che, in presenza di un opportuno substrato colorimetrico (NBT/BCIP), produce un precipitato colorato che si deposita stabilmente nel sito di localizzazione dell'enzima. Il protocollo sperimentale consta di una serie di step condotti tutti in condizioni RNAsi-*free* e per tale motivo le soluzioni e tutto il materiale da laboratorio sono stati autoclavati e sterilizzati prima dell'uso.

- **Preparazione del tessuto:** le sezioni encefaliche trasversali (14 µm) tagliate al criostato sono state montate su vetrini polilisinati.

- **Reazione di marcatura della sonda e Dot Blot:** per tale reazione ad 1 µl di oligonucleotide 100pmol sono stati aggiunti 4 µl di buffer TdT (potassio cacodilato 1M, Tris-HCl 125 mM pH 6.6), 4 µl di CoCl₂, 2µl di DIG 1 µl di TdT e acqua distillata, fino ad un volume di 20 µl. Successivamente, l'oligo è stato incubato per 30 min a 37°C e per bloccare la reazione, sono stati aggiunti 2 µl di EDTA 0.2 M pH 8.0. Per verificare

l'avvenuta reazione di marcatura della sonda è stato effettuato un Dot Blot mediante la 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 due lavaggi nel buffer 1 per 5 min. La pellicola è stata poi trasferita nel 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 della *detection* sciolti nel buffer 3; tali reagenti sono: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, 4 toluidina (BCIP, 4 toluidina) e Nitroblu tetrazolo cloruro (NBT). La piastra è stata lasciata al buio affinché potesse verificarsi un pieno sviluppo della colorazione: la visualizzazione di un colore "rosa-violetto" indica la corretta marcatura.

- **Preibridazione:** portati i vetrini a temperatura ambiente, sono stati lavati in SSC2X per 30 min e fissati in paraformaldeide 4% per 10 min allo scopo di preservare l'integrità del tessuto; sono stati sottoposti a tre lavaggi in PBS 1X (NaCl 1.3 M, NaH₂PO₄ 70 mM e 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 disidratate con passaggi di 30 sec in etanolo a diverse concentrazioni (30, 60, 70, 80, 95 e 100%). Infine, i vetrini sono stati ricoperti con 300µl di buffer di preibridazione (formammide deionizzata, SSC5X, destrano solfato e DDT 50 mM in un rapporto 1:50) per 2 h a 50°C.

- **Ibridazione:** le sezioni sono state incubate con il buffer di ibridazione, ottenuto aggiungendo 100 µl di probe ibridato nel buffer di preibridazione (2.5 µl di oligo/50 µl di buffer), e quindi incubate in camera umida *overnight* a 50°C.

- **Postibridazione:** 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 due 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 che consiste nell'immersione dei vetrini per 50 min in *Blocking Reagent* 0.5% sciolto in Tris-HCl 100 mM pH 7.5 e NaCl 50mM; la fase di blocco consente di prevenire un elevato effetto *background*.

- **Rilevazione immunologica:** dopo due lavaggi in buffer 1 per 2 min a temperatura ambiente i vetrini sono stati ricoperti con 200 µl di buffer 1 in cui sono 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) diluito nello stesso buffer e quindi sottoposti a tre lavaggi di 15 min in buffer 1 ed un lavaggio di 2 min in buffer 3 (Tris-HCl 100mM pH 9.5, NaCl 100mM). Le sezioni sono state così incubate per 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 100mM pH 8.5, EDTA 1 mM) per 15 min e le sezioni sono state disidratate nuovamente in etanolo alle diverse concentrazioni. A questo punto, è stato possibile osservare la reazione immunologica al microscopio ottico. I segnali di ibridazione sono stati osservati al microscopio Dialux EB 20 (Leitz) con obiettivo a contrasto di fase 16X.

3.7 Analisi Statistica

Per l'analisi del legame recettoriale condotto mediante applicazione dell'autoradiografia recettoriale, l'analisi dello Scatchard per i dati di saturazione recettoriale, ottenuti mediante l'applicazione del programma LIGAND (Munson and Rodbard, 1980), ha fornito i valori di affinità recettoriale ed una stima statistica dei massimi livelli di legame (Kd). Nella valutazione dei dati comportamentali, neurodegenerativi (Fluoro-Jade B) e trascrizionali (ibridazione *in situ*) è stata condotta un'analisi quantitativa dei valori di densità ottica (OD) mediante analizzatore di immagine (Scion-Image 2.0) e successivamente analisi statistica (one way ANOVA seguita da Neuman-Keul's test o da Student *t* test).

Risultati

Parte I: Organizzazione anatomica dell'encefalo di *Thalassoma pavo*

Nella parte iniziale di questo lavoro sperimentale, l'applicazione di colorazioni morfologiche classiche quali la tecnica di Nissl ha consentito di delineare le caratteristiche microscopiche delle diverse aree cerebrali di *Thalassoma pavo*, i confini tra le diverse porzioni anatomiche e la determinazione delle misure di lunghezza e volume (fig. 16). Di seguito vengono descritte le caratteristiche generali delle diverse regioni encefaliche del nostro modello sperimentale *Thalassoma pavo* (fig. 17).

AREA ENCEFALICA	LUNGHEZZA (mm)	LARGHEZZA (mm)	ALTEZZA (mm)	VOLUME (mm ³)
Telencefalo	1.8 ± 0.4	4.5 ± 0.5	2.5 ± 0.42	36 ± 5
Tetto Ottico	2.2 ± 0.3	6 ± 0.45	3 ± 0.23	72.2 ± 6
Area Preottica	1.13 ± 0.21	1.2 ± 0.45	0.7 ± 0.05	2.06 ± 0.3
Ipotalamo	2.7 ± 0.12	4 ± 0.34	3.3 ± 0.2	51 ± 6
Corpo Cervelletto	2.02 ± 0.4	3.2 ± 0.32	2,2 ± 0.1	18.75 ± 2
Valvole Cervelletto	3.2 ± 0.3	5.8 ± 0.5	1.9 ± 0.1	46.23 ± 4

Fig. 16 Risultati ottenuti dall'analisi morfometrica dell'encefalo di *Thalassoma pavo*. Lunghezza, larghezza, altezza e volume rappresentano la media dei valori ottenuti su tutti gli encefali analizzati (n=3).

1.1 Il Telencefalo

Nei Vertebrati, il telencefalo mostra un alto grado di adattamento e modificazioni morfologiche in relazione alle specie. In particolare, il telencefalo dei Teleostei consiste di una porzione dorsale chiamata pallio ed una ventrale chiamata subpallio: la considerazione funzionale più interessante risiede nell'evidenza neuroanatomica per la quale nei Pesci il telencefalo è omologo a diverse aree palliali degli Amnioti (Rodriguez et al., 2002).

Dal punto di vista funzionale la porzione dorsale del telencefalo risulta omologa a HIP nei Mammiferi ed è uno dei principali costituenti del sistema limbico, insieme ai nuclei del setto, AMY, lo striato ed alcune parti di HTH. La maggior parte delle informazioni sensoriali arrivano al pallio dorsale, per subire successivamente un processo di integrazione in seguito al quale vengono infine inviate proiezioni efferenti al tronco cerebrale attraverso lo striato, regione cerebrale deputata alla regolazione del movimento in tutti i Vertebrati. Il sistema limbico nei Pesci presenta molte similarità con i Mammiferi, per cui sono state avanzate analogie nel comportamento emotivo e motivazionale quali la nutrizione, assunzione di liquidi, combattimento, fuga, riproduzione e cure parentali.

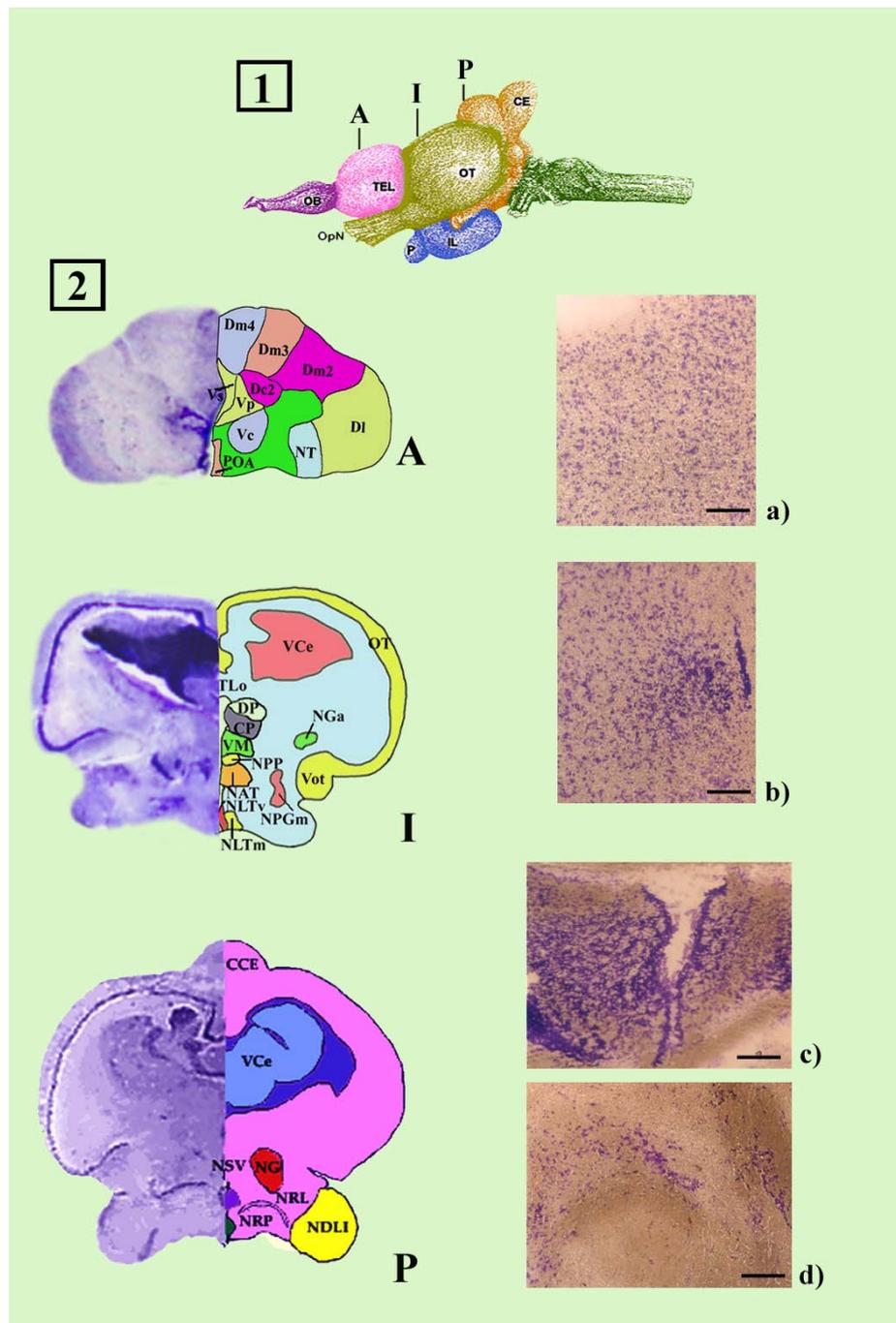


Fig.17 (1) Encefalo di *Thalassoma pavo* e relativi piani di taglio a livello delle aree anteriore (A), intermedia (I) e posteriore (P). (2) Sezioni trasversali dell'encefalo; A: area anteriore e particolare di Dm (a); I: area intermedia con particolare di NAT (b) e Tlo (c); P: area posteriore con particolare di NRL (d). ABBREVIAZIONI: OB: bulbi olfattivi; TEL: telencefalo; OT: tetto ottico; CE: cervelletto; OpN: nervo ottico; P: ipofisi; IL: lobo inferiore dell'ipotalamo; Dm2, Dm3, Dm4: seconda, terza e quarta parte mediale del telencefalo dorsale; DI: parte laterale del telencefalo dorsale; NT: nucleo tenia; Dc2: seconda parte centrale del telencefalo dorsale; Vc: nucleo centrale; Vp: nucleo postcommissurale; Vs: nucleo sopracommissurale; POA: area preottica; Vce: valvola del cervelletto; TLo: toro longitudinale; DP: nucleo talamico dorsale posteriore; CP: nucleo talamico centrale posteriore; VM: nucleo talamico ventromediale; NPP: nucleo posteriore periventricolare; NPGm: nucleo preglomerulare mediale; NAT: nucleo anteriore periventricolare; NLTv: parte ventrale del nucleo puberale laterale; NLTm: parte mediale del nucleo laterale puberale; CCe: corpo del cervelletto; NG: nucleo glomeruloso; NSV: nucleo del sacco vascoloso; NRL: nucleo del recesso laterale; NRP: nucleo del recesso posteriore; NDLI: nucleo del lobo inferiore.

Dal punto di vista anatomico, i bulbi olfattivi sessili di *Thalassoma pavo* mostrano una chiara organizzazione in lamine concentriche con orientazione dall'esterno verso l'interno: fibre dei nervi olfattivi primari (ON); strato glomerulare (GL); strato cellulare esterno (ECL); fibre olfattive secondarie (SOF); strato cellulare interno (ICL); strato endimale. Lo strato ON è molto sottile lungo la superficie laterale e ventrale dei bulbi ed assieme a GL normalmente scompare lungo la superficie dorsale e mediale, dove i bulbi vengono sostituiti dal subpallio. Lo strato ECL contiene larghe cellule mitrali che inviano i loro dendriti apicali verso l'esterno a formare GL, costituito da elementi cellulari più piccoli. Lo strato SOF si amplia caudalmente grazie alle continue giunte di assoni provenienti dalle cellule bulbari che formano i tratti olfattivi laterali e mediali. Caudalmente l'organizzazione concentrica dei bulbi è meno evidente e le cellule dello strato interno si uniscono al telencefalo ventrale.

La funzione del telencefalo dei Teleostei e la sua omologia con i Mammiferi rappresentano attualmente uno dei più interessanti oggetti di studio comparativo. In *Thalassoma pavo*, tale porzione encefalica consiste di due grandi divisioni: area dorsale e ventrale, entrambe mostranti caratteristiche simili al pallio o area subpalliale dei Tetrapodi. Le funzioni del telencefalo dei Teleostei sono assimilabili a centri integrativi di molti sistemi sensoriali, in opposizione alle ipotesi primitive, in cui si riteneva che le informazioni olfattive erano ritenute dominanti su molti centri (Butler and Hodos, 2000).

L'analisi istologica di tale area telencefalica nel nostro modello comprende il nucleo dorsale (Vd), localizzato nella porzione ventrale del ventricolo mediale caratterizzato da cellule allungate di media dimensione. Il nucleo ventrale del telencefalo ventrale (Vv) è localizzato in posizione caudale a Vd lungo la superficie periventricolare ventromediale ed è caratterizzato da cellule piccole ed arrangiate in lamine verticali. In posizione rostrale alla commissura anteriore, si differenzia il nucleo ventrale subcommissurale (Vs) dalle cellule di piccole dimensioni. In posizione ancora più caudale si ritrova il nucleo postcommissurale (Vp) che delimita la transizione tra il telencefalo ed il diencefalo. Si riscontrano due masse cellulari poste nella regione laterale del telencefalo ventrale: in posizione rostrale si denota il nucleo laterale del telencefalo ventrale (Vl) costituito da neuroni di piccole dimensioni; in posizione caudale e dorsolaterale a Vl, si identifica il nucleo centrale del telencefalo ventrale (Vc) che contiene cellule grandi e molto colorate, ed è riscontrabile in genere solo nei Telostei. A livello postcommissurale ritroviamo il nucleo entopeduncolare (E) costituito da neuroni molto piccoli e profondamente colorati. L'osservazione microscopica rivela nel telencefalo dorsale di *Thalassoma pavo* la presenza di tre regioni palliali chiamate pallio mediale (Dm), dorsale (Dd) e laterale (Dl) che sono visibilmente distinte le une dalle altre per la precisa geometria dei neuroni di forma allungata organizzati in cluster definiti. Dm

consiste di cellule rotondeggianti collocate in posizione laterale, in seguito a migrazione dei neuroni lontano dalla superficie periventricolare, per cui le regioni subpalliali vengono distinte in un setto mediale e uno striato laterale. Dl costituisce il centro olfattivo primario, in quanto riceve afferenze dai bulbi olfattivi mediante i tratti olfattivi ed invia le informazioni ad altre regioni palliali: le sue cellule sono organizzate in colonne perpendicolari alla superficie ependimale, con neuropilo evidente. Dd costituisce invece la porzione minore con piccole cellule organizzate in una lamina. La porzione mediale risulta divisa in 4 frazioni chiamate Dm₁, Dm₂, Dm₃, Dm₄, mentre la parte laterale si estende attraverso il tratto rostro-caudale nella regione dorsolaterale e ventrolaterale degli emisferi cerebrali. In quest'ultima si riscontrano 3 grandi divisioni: divisione ventrale (Dlv); divisione dorsale (Dld); divisione posteriore (Dlp). La parte centrale (Dc) riempie la regione centrale del telencefalo dorsale tra le porzioni mediale, dorsale e laterale e sono riscontrabili due divisioni Dc1 e Dc2.

Sulla base della forte conservazione strutturale che si è mantenuta durante l'evoluzione, è stato ipotizzato come nei Pesci Vv sia comparabile al nucleo accumbens ed al setto nei Tetrapodi, mentre i nuclei Vd, Vs, Vp mostrano caratteristiche in comune allo striato dei Vertebrati terrestri, ed E è omologabile alla regione amigdalare. In alcuni Teleostei che riportano lesioni a livello di E si sono manifestate risposte paragonabili a comportamenti di fuga, suggerendo che tale area nei Pesci possa costituire un centro emotivo critico per la paura (Portavella et al., 2004).

1.2 Il Mesencefalo

Nei Pesci il pavimento o tegmento del mesencefalo è una porzione del tronco cerebrale, contenente la porzione mesencefalica della formazione reticolare, parte del nucleo trigemino ed i nervi oculomotore e trocleare. I nuclei mesencefalici coordinano in tali animali funzioni motorie, generando sequenze coordinate e finalizzate di movimenti delle pinne pari inviate ai centri motori del midollo spinale. Nel tegmento di alcuni Pesci è presente un nucleo rosso che riceve proiezioni dal cervelletto, si connette al midollo spinale mediante il tratto rubrospinale e rappresenta in tal modo una via di controllo cerebellare del movimento. In *Thalassoma pavo* il tetto mesencefalico forma due grandi protuberanze denominate lobi ottici o tetto ottico (OT). Caudalmente, OT contiene centri cerebrali situati in profondità detti tori semicirculari (Tlo) che costituiscono il tetto acustico. Tlo riceve fibre ascendenti dai recettori uditivi, linea laterale ed elettrocettori e costituisce nei Pesci un importante centro di integrazione, paragonabile agli emisferi cerebrali negli Amnioti. In OT la colorazione istologica con il metodo di Nissl mostra in *Thalassoma pavo* un'organizzazione in strati cellulari fortemente colorati e di forma differenziata. In particolare si riconoscono tre grandi

zone o strati: superficiale, centrale e paraventricolare, che vengono suddivisi a loro volta in strato marginale (SM), strato ottico (SO), strato fibroso e grigio superficiale (SFGS), strato grigio centrale (SGC), strato albuminoso centrale (SAC) e strato periventricolare (SPV).

SM è costituito da una grande quantità di assoni demielinizzati conosciuti come fibre marginali che originano in Tlo come strutture pari cilindriche e che si estendono longitudinalmente sopra la commissura intertettale decorrendo in fasci paralleli. Questo strato contiene l'arborizzazione di lunghi processi sottili di neuroni piriformi di SGC e nella regione più profonda tratti dendritici orizzontali che originano dai corpi del SAC. SO risulta suddiviso in tre ulteriori strati: *pars superficialis*, *pars intermedia* e *pars profunda*. La *pars superficialis* è ricca di assoni mielinizzati tra cui sono comprese anche le afferenze retinotettali. Lungo SO decorrono assoni più larghi che originano in OT oppure dagli assoni tettofugali. La *pars intermedia* contiene prevalentemente assoni demielinizzati di cui alcuni nascono da soma localizzati nel profondo SGC, SAC ed SPV. SFGS è caratterizzato da assoni mielinizzati e grandi corpi cellulari neuronali vivamente colorati di tipo piramidale, il cui soma è localizzato nella parte più profonda dello strato e presenta una forma piriforme. Un sottile dendrite apicale si estende attraverso la superficie tettale e si divide in due tratti che giungono in SM dove assumono la forma di un albero dendritico avente la forma di un cono invertito. Tale strato contiene anche piccoli neuroni con rami verticali bipolari e cellule orizzontali con un soma sferoidale debolmente colorato, ritenute in un primo tempo oligodendrociti ma nelle quali successive analisi hanno rivelato un numero ridotto di sinapsi superficiali. SGC è costituito da due porzioni, lo strato superiore detto plessiforme interno o ipl e lo strato inferiore detto grigio interno di Leghissa. L'ipl si estende dallo strato profondo di SFGS nel punto in cui l'assone ed il ramo basale dei neuroni piramidali si sviluppano. In tale strato si riscontrano molti soma di diversi tipi cellulari di forma larga e fusiforme, piccoli neuroni piriformi e neuroni multipolari che si ritrovano sia in SGC che in SAC. SAC è caratterizzato da grandi fasci di assoni mielinizzati cui sono frammisti fasci di assoni non mielinizzati, alcuni dei quali originano dalla retina controlaterale, altri dal telencefalo ipsilaterale e pochi da efferenze tettali e fibre commissurali. I larghi neuroni piriformi presentano il loro soma vicino questo strato, ma robusti rami dendritici si estendono verticalmente attraverso SO, oltrepassano trasversalmente OT e si biforcano per espandersi in SFGS. SPV è costituito da cellule sferiche strettamente impaccate, il cui soma contiene un nucleo circolare sormontato da un sottile citoplasma, caratterizzate da un singolo processo che ascende attraverso OT, forma dei fasci sottili, e arriva a SFGS e SO dove si ramifica.

Dal punto di vista funzionale il mesencefalo dei Teleostei costituisce un centro multisensoriale poiché gli strati profondi ricevono fibre dai sistemi uditivi, somatosensitivo

ed elettrocettivo, mentre le fibre discendenti da OT raggiungono i centri motori del tegmento e la formazione reticolare. Tra le funzioni principali di OT si annovera la localizzazione di uno stimolo nello spazio e l'orientamento dell'animale in risposta allo stimolo mediante movimenti oculari. Nei Teleostei è presente in OT un tipo cellulare non neurale chiamato ependimogliale o taniocita, il cui soma è presente nello strato ependimale con un lungo dendrite apicale che si estende sulla superficie tectale ed è dotato di piccoli processi. OT riceve stimoli sensitivi dai Tlo, strutture uniche nei Pesci radiati, che ricevono proiezioni da diverse fonti, incluso un nucleo laterale della valvola del cervelletto (VCE) e neuroni oculomotori. Gli assoni provenienti da tali regioni decorrono negli strati più esterni di OT e formano sinapsi con i dendriti distali dei neuroni piramidali tectali. Tlo insieme ad OT regola funzioni vasomotorie e di orientazione nello spazio in risposta a precisi stimoli da diversi punti dello spazio visivo. Può inoltre partecipare al sistema motorio discendente essendo coinvolto in un meccanismo integrato che coinvolge anche centri cerebellari.

1.3 Il Diencefalo

Nei Teleostei il diencefalo rappresenta l'area cerebrale più complessa e comprende centri di integrazione di informazioni gustative, olfattive e visive. In *Thalassoma pavo* esso si può suddividere in varie zone quali POA, HTH, tubercolo posteriore, talamo ventrale e dorsale, epitalamo, sinencefalo includente parte del pretetto ed infine la porzione rimanente del pretetto comprendenti i nuclei ottici.

POA è una regione di congiunzione tra telencefalo e diencefalo e gioca un ruolo predominante nell'attività di entrambe le suddivisioni, in quanto è strettamente correlata sia a HTH che al sistema limbico. Dal punto di vista funzionale è implicata nei processi riproduttivi, in relazione alla presenza di abbondanti recettori estrogenici ed androgenici per gli ormoni sessuali. Inoltre, insieme ad HTH e AMY, presenta dimorfismo sessuale cioè differenze strutturali tra maschi e femmine cui consegue una specializzazione funzionale sesso-specifica. In *Thalassoma pavo* tale area costituisce la porzione della parete prosencefalica che circonda il recesso del terzo ventricolo, i cui corpi neuronali sono dislocati prevalentemente in posizione periventricolare. Rostralmente si identificano due grossi nuclei, la porzione anteroventrale del nucleo preottico parvocellulare (NPOav) e la porzione parvocellulare del nucleo preottico parvocellulare (NPOpc). La parte parvocellulare del nucleo preottico magnocellulare (PMpc) è composta da cellule larghe e molto più colorate di NPOpc. Questo nucleo è situato dorsalmente e le sue cellule sono organizzate in lamine, costituite da quattro a cinque cellule cadauna, delimitanti la regione ventrale del recesso preottico. La parte magnocellulare del nucleo preottico magnocellulare (PMmc) si

ritrova dorsalmente a PMpc e contiene cellule larghe densamente impaccate in tre-quattro cellule per lamina. Caudalmente PMmc è sostituito dal nucleo periventricolare anteriore (NAPv), costituito da piccole cellule disposte in lamine parallele, ventralmente delimitato dal nucleo sovrachiasmatico (NSC) che occupa il bordo ventrale del ventricolo. Dal punto di vista funzionale, POA è intimamente connessa con HTH, principale centro di coordinamento delle informazioni viscerali e delle attività mediate dal sistema nervoso autonomo e dalle ghiandole endocrine. Sebbene HTH presenti connessioni con tutte le vie sensoriali, le principali afferenze sensitive sono rappresentate da stimoli gustativi e viscerali trasmessi dalla formazione reticolare e da segnali somatosensitivi olfattivi trasmessi dalle regioni telencefaliche. Interagendo in maniera specifica col sistema limbico, HTH influenza i comportamenti fisiologici essenziali per la sopravvivenza dell'individuo, quali la ricerca di acqua e cibo, la regolazione dei movimenti gastroenterici e processi digestivi, i livelli plasmatici di glucosio ed equilibrio idrosalino. Questa porzione cerebrale svolge funzioni stimolatrici oltre che inibitorie, mediante sistemi neuronali efferenti che proiettano ai centri motori del talamo e midollo spinale. Altre funzioni vengono controllate in modo indiretto attraverso la regolazione della secrezione degli ormoni ipofisari (Godwin et al., 2000).

Dal punto di vista anatomico HTH situato in posizione ventrale al polo caudale di POA, risulta costituito in *Thalassoma pavo* da un lobo tuberale mediale e due lobi inferiori. Il lobo tuberale è adiacente al terzo ventricolo, il quale si espande lateralmente creando un diverticolo noto come recesso laterale, mentre la porzione caudale del ventricolo ipotalamico forma il recesso posteriore. La zona tuberale mediale è costituita dal nucleo tuberale laterale diviso in nucleo tuberale anteriore, nucleo del recesso posteriore e nucleo del sacco vascoloso. Due masse cellulari delimitano la zona mediana del recesso laterale e sono la parte ventrale e dorsale (rispettivamente NRLv e NRLd) del nucleo del recesso laterale. Il gruppo di cellule più rostrale di HTH è la parte laterale del nucleo tuberale laterale (NLTl), localizzato in posizione rostrolaterale al ventricolo ipotalamico ed è costituito da cellule larghe ed intensamente colorate giacenti in posizione ventrolaterale alla commissura orizzontale (HCo) sulla superficie ventrale dell'encefalo. La parte mediale di NLT è localizzata lateralmente alla suddivisione ventrale del nucleo, mentre la porzione dorsale del nucleo circonda il ventricolo ipotalamico dorsale. Questo nucleo giace in posizione caudale a POA e dorsale alla porzione ventrale di NLT. In posizione laterale si ritrova il nucleo tuberale anteriore (NAT) dalla caratteristica forma triangolare; caudalmente il ventricolo ipotalamico mostra i solchi dorsali e ventrali associati ad NLTv e NLTl rispettivamente, che rappresentano l'inizio dell'estensione diretta mediolateralmente del recesso laterale. Il nucleo del recesso posteriore (NRP) si erge come un ispessimento dello strato cellulare

ependimale caratterizzato dalla presenza di cellule piccole fortemente associate in posizione ventromediale organizzate a delimitare un lume. La porzione dorsale del ventricolo ipotalamico appare rivestita dalle cellule del sacco vascoloso (NSV), costituito da cellule impacchettate a costituire il rigonfiamento dello strato di cellule ependimali. Rostralmente, i lobi inferiori sono occupati dalle cellule del nucleo diffuso del lobo inferiore (NDLI), mentre l'ascensione del recesso laterale determina l'inizio delle due masse cellulari dei lobi inferiori, cioè la parte mediale del nucleo diffuso (NDLIm), oltre ad un gruppo cellulare che circonda l'estensione laterale del recesso laterale (NRLI). In *Thalassoma pavo* il nucleo centrale del lobo inferiore (NCLI) si solleva caudalmente in posizione ventromediale rispetto a Tlo. Infine, nel punto in cui il lobo inferiore appare separato dal resto dell'encefalo si ritrova una regione libera da cellule, nella porzione dorsale del lobo inferiore, che rappresenta la porzione caudale del nucleo diffuso (NDLIc), costituito da cellule piccole giacenti in posizione dorsale al nucleo centrale del lobo inferiore. La parte laterale del terzo ventricolo si trova strettamente associata alla formazione del talamo, costituita principalmente dai nuclei talamici dorsali e da un subtalamo connesso ad un centro motorio cerebrale. Nei Teleostei i nuclei talamici dorsali sono in genere un punto di collegamento per informazioni somatosensoriali, visive, uditive e provenienti dalla linea laterale, dirette al telencefalo con cui stabilisce comunicazioni reciproche. Nei Pesci sono presenti nuclei diencefalici peculiari con funzione di collegamento con il telencefalo per informazioni sensitive ascendenti: questi nuclei comprendono le parti ventrali del talamo e di HTH ed una porzione caudale chiamata tubercolo posteriore. Nel corso dell'evoluzione il talamo dorsale si ritrova strettamente correlato alle strutture telencefaliche, con la formazione di vie sensorie ascendenti che costituiscono un punto di collegamento cruciale tra il mondo esterno e le esperienze sensoriali integrate dagli organismi. In *Thalassoma pavo* all'interno del talamo dorsale sono riconoscibili tre nuclei: il nucleo talamico anteriore (A), il nucleo talamico dorsale posteriore (Dp) ed il nucleo talamico centrale posteriore (Cp). Rostralmente A si ritrova disposto in posizione ventrocaudale all'abenula ed è costituito da cellule piccole rotondeggianti associate in una posizione periventricolare nel suo polo rostrale. In posizione caudale A viene sostituito lateralmente da Dp e Cp, perdendo la sua struttura bilaminare. Il talamo ventrale è delimitato centralmente da POA, dorsalmente dal talamo dorsale e caudalmente dal tubercolo posteriore. In essi vengono individuati quattro nuclei: nucleo dell'eminenza talamica (NTe), nucleo talamico ventromediale (VM), nucleo talamico ventrolaterale (VL) e nucleo talamico intermedio (I). VM è costituito da colonne di cellule che si estendono dalla regione caudale ad NTe fino al livello del polo rostrale degli organi periventricolari. Caudalmente VM perde la sua conformazione laminare per poi addensarsi nuovamente

vicino al ventricolo. Un piccolo gruppo di cellule formano il VL situato lateralmente a VM, mentre I è costituito da un gruppo cellulare che circonda centralmente l'abenula epitalamica e dorsalmente VM.

1.4 Il Cervelletto

Nei Pesci il cervelletto costituisce una regione all'interno della quale si possono distinguere un corpo in posizione mediana ed un paio di auricole cerebellari in posizione laterale. Quest'ultime ricevono impulsi dalla parte vestibolare dell'orecchio e dalla linea laterale, mentre il corpo riceve afferenze da tutti i sistemi sensoriali del corpo tranne i recettori olfattivi e gustativi, oltre ad essere collegato ai centri visivi ed uditivi. La sostanza grigia della corteccia cerebellare è costituita da tre strati in stretta comunicazione funzionale. Le fibre efferenti dalla corteccia raggiungono dapprima i neuroni nei nuclei più profondi per poi connettersi con la formazione reticolare che, a sua volta, invia informazioni ai centri motori del tronco encefalico e midollo spinale. In tal modo le connessioni cerebellari permettono di controllare la posizione, i movimenti del corpo e l'attività muscolare, oltre a coordinare informazioni visive, uditive e spaziali. Nei Pesci il cervelletto svolge un ruolo fondamentale nella coordinazione dell'attività motoria mediante un controllo di intensità, durata e sequenza temporale delle contrazioni muscolari in relazione a posizione e movimenti dell'animale nell'acqua.

In *Thalassoma pavo* dal punto di vista strutturale nella corteccia cerebellare si riconoscono uno strato molecolare, uno strato granulare e lo strato delle cellule del Purkinje. Lo strato molecolare è costituito dai dendriti delle cellule del Purkinje, assoni amielinici delle cellule granulose, afferenze extracerebellari delle cellule del Purkinje ed altri tipi cellulari. Le componenti cellulari di questo strato sono rappresentate dalle cellule stellate e dalle cellule a canestro. Le prime sono localizzate negli strati superficiali e nel loro decorso si estendono in lunghi fasci, inviando fibre collaterali che terminano sui dendriti delle cellule del Purkinje. Le cellule a canestro si ritrovano negli strati più profondi, con gli assoni che si estendono in lunghi fasci e le cui fibre collaterali terminano sui corpi delle vicine cellule del Purkinje dove si raggruppano a formare una struttura a canestro. Lo strato granulare è costituito da cellule fortemente addossate tra loro e caratterizzate da un piccolo soma. In esse sono presenti un numero limitato di dendriti, da quattro a cinque per soma, aventi una limitata estensione e struttura finale a tenaglia, rappresentante il sito di terminazione delle fibre muschiose. In questo strato si ritrovano anche gli assoni delle cellule del Golgi, dall'assone amielinico ascendente attraverso lo strato granuloso fino allo strato molecolare, dove si biforca in due rami che viaggiano ad angolo retto a costituire le fibre parallele. Tali

fibre parallele prendono contatto non solo con i dendriti delle cellule del Purkinje, ma anche con le cellule stellate e a canestro dello strato molecolare.

Lo strato delle cellule del Purkinje si ritrova in tutti i Vertebrati eccetto gli Agnati. Sono considerate le cellule eccitatorie più potenti in SNC la cui funzione principale è di decodificare le informazioni nella corteccia cerebellare (Saab and Willis, 2003). Hanno un soma dalla forma piriforme, localizzati al confine tra lo strato molecolare e lo strato granuloso della corteccia cerebellare. Le cellule del Purkinje hanno alberi dendritici ricchi ed elaborati che si estendono fin dentro lo strato molecolare e si ramificano. Gli assoni discendono attraverso lo strato granulare e lasciano la corteccia cerebellare, ma facilmente prendono contatti collaterali ascendenti fino a corpi e dendriti delle cellule del Golgi e delle cellule a canestro. Nei Pesci radiati gli assoni delle cellule del Purkinje non costituiscono efferenze, ma rimangono delimitati nella corteccia cerebellare dove terminano o su altre cellule del Purkinje o sulle cellule stellate più profonde. Le principali vie efferenti riscontrabili nel cervelletto dei Pesci partono dalle cellule euridendroidi ed arrivano direttamente ai nuclei vestibolari, midollo spinale, formazione reticolare e nucleo rosso, senza dover attraversare i nuclei profondi del cervelletto (nucleo interposito, nucleo del fastigio, nucleo dentato). Nei Pesci ritroviamo due caratteristici gruppi di strutture: i nuclei precerebellari e le strutture cerebelloidi. I nuclei precerebellari sono popolazioni neuronali che inviano i loro assoni efferenti al cervelletto. Tra questi ritroviamo le cellule del midollo spinale, nuclei funicolari, nucleo solitario, nucleo del nervo trigemino, locus coeruleus, l'oliva inferiore, nucleo pontino e, specifico dei Pesci radiati, il nucleo della valvola laterale, localizzato nel tegmento dell'encefalo mediale. Le strutture cerebelloidi sono rappresentate dalla cresta cerebellare, toro longitudinale e lobo della linea laterale elettrocettiva. La cresta cerebellare è localizzata dorsalmente all'area sensoria della linea laterale, costituita da uno strato di cellule parallele i cui corpi giacciono nell'eminenza granulare. Il toro longitudinale, situato sul tetto del ventricolo tettale nell'encefalo mediale, dorsalmente alla valvola, è costituito da una colonna di cellule granulose che ricevono le sue afferenze dal nucleo laterale della valvola. Infine il lobo della linea laterale elettrocettiva, proprio dei Pesci elettrici, presenta forti associazioni con la valvola, mostrando un forte somiglianza con la corteccia cerebellare. Le auricole sono strutture disposte ventrolateralmente rispetto al corpo cerebellare. Spesso presentano una conformazione fortemente ripiegata e possono essere suddivisi in due lobi: strato superiore e inferiore. Oltre alla ricezione di informazioni provenienti dal sistema vestibolare, da questa regione si dipartono proiezioni anche su neuroni motori che controllano in particolare i movimenti oculari. Alcune evidenze sperimentali evidenziano una connessione diretta tra il cervelletto ed il telencefalo che, in

Carassius auratus, è realizzata mediante il nucleo dorsale tegmentale, nucleo preglomeruloso e nucleo paracommissurale, la cui funzione fondamentale è quella di memoria localizzativa (Vonderschen et al., 2002).

Parte II: Studio comportamentale ed analisi neurodegenerative

2.1 Studio comportamentale

Per la determinazione degli effetti indotti dai trattamenti con i contaminanti ambientali presi in esame in tale lavoro sulle principali attività comportamentali di *Thalassoma pavo*, è stato necessario condurre un'analisi preliminare comportamentale nel gruppo dei ctrl al fine di determinare un etogramma rappresentativo delle principali attività giornaliere di tale Teleosteo in condizioni fisiologiche. I dati ottenuti riportano come gli animali trascorrono la maggior parte del loro tempo nel nuoto (58%), interrotto da brevi stati di inattività (16%) e di ricerca del cibo (10%; fig. 18)

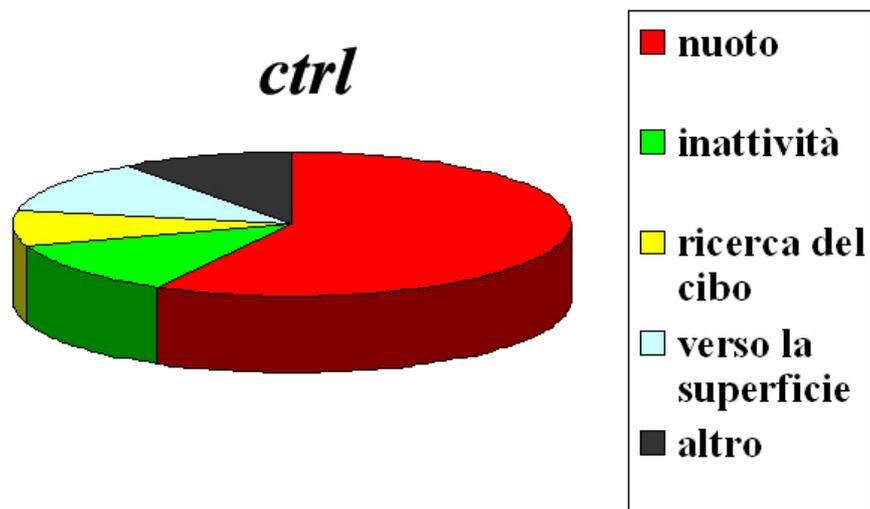


Fig.18 Etogramma rappresentativo delle principali attività comportamentali monitorate in animali appartenenti al gruppo ctrl. Le misure, in doppio, sono state ripetute almeno 3 volte al giorno per tutta la durata del trattamento e per ogni categoria comportamentale considerata e i dati vengono riportati come valori medi del tempo relativo (%) impiegato dall'animale a svolgere una determinata attività rispetto al totale del tempo monitorato (45 min).

Successivamente, quando sono stati valutati gli effetti indotti dai quattro contaminanti presi in esame sulle attività comportamentali di *Thalassoma pavo*, si è potuto evidenziare come l'applicazione delle concentrazioni LOAEL più basse non influenzino significativamente il

pattern comportamentale di tale specie, mentre le MAT risultano le dosi in grado di indurre le principali alterazioni. In particolare, i metalli pesanti alle alte concentrazioni promuovono l'insorgere di stati di iperattività, che risulta elevata (+77%, $p < 0.01$) per effetto del Pb^{2+} e moderata (+50%, $P < 0.05$) dopo trattamento con Cd^{2+} (fig. 19a).

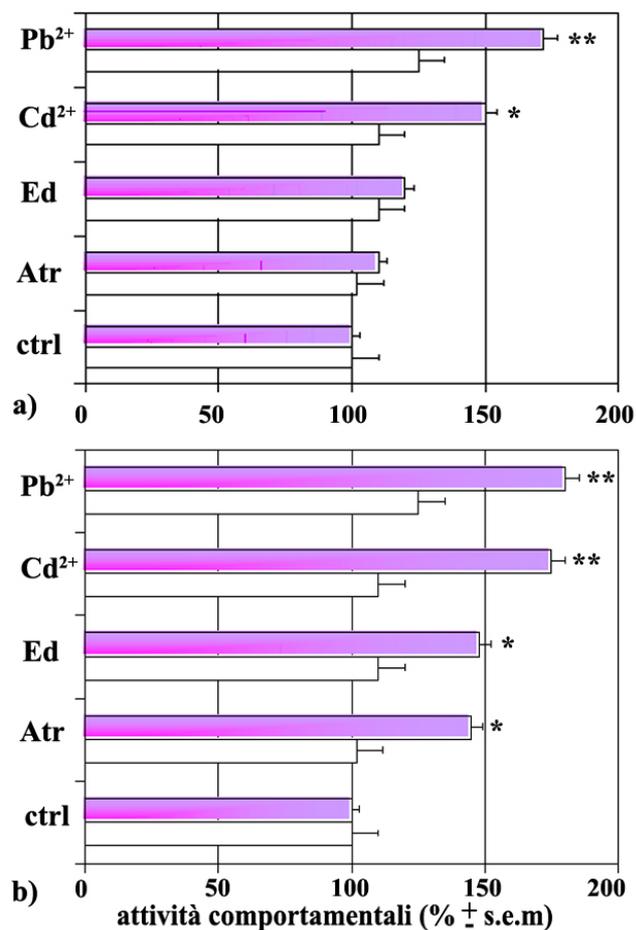


Fig. 19 Variazioni comportamentali della categoria nuoto (a) e guizzi (b) osservate in *Thalassoma pavo* dopo una settimana di trattamento sulla base dei valori medi giornalieri. Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test. I dati sono riferiti al controllo (100%); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Abbreviazioni= ctrl: controlli; Atr: atrazina; Ed: endosulfan; Cd^{2+} : cadmio; Pb^{2+} : piombo. Gli istogrammi in bianco indicano le concentrazioni LOAEL e quelle in viola le MAT per ogni singolo contaminante, riportate nella fig. 13.

Inoltre tutti i contaminanti presi in esame inducono alle concentrazioni MAT l'insorgere di guizzi che si traducono in movimenti anomali e privi di coordinazione del pesce: tali atteggiamenti sono moderatamente incrementati per effetto dei pesticidi (Atr: +46%; Ed: +49%), incrementi che diventano elevati dopo esposizione ai metalli pesanti (Pb^{2+} : +82%; Cd^{2+} : +78%; fig. 19b).

L'effetto dei metalli pesanti e dei pesticidi sulla categoria comportamentale "iperventilazione" risulta essere paragonabile, con incrementi elevati per le concentrazioni MAT di Ed (+72%), Atr (+80%) e Cd²⁺ (+75%) e moderati nel trattamento con Pb²⁺ (+48%; fig. 20a).

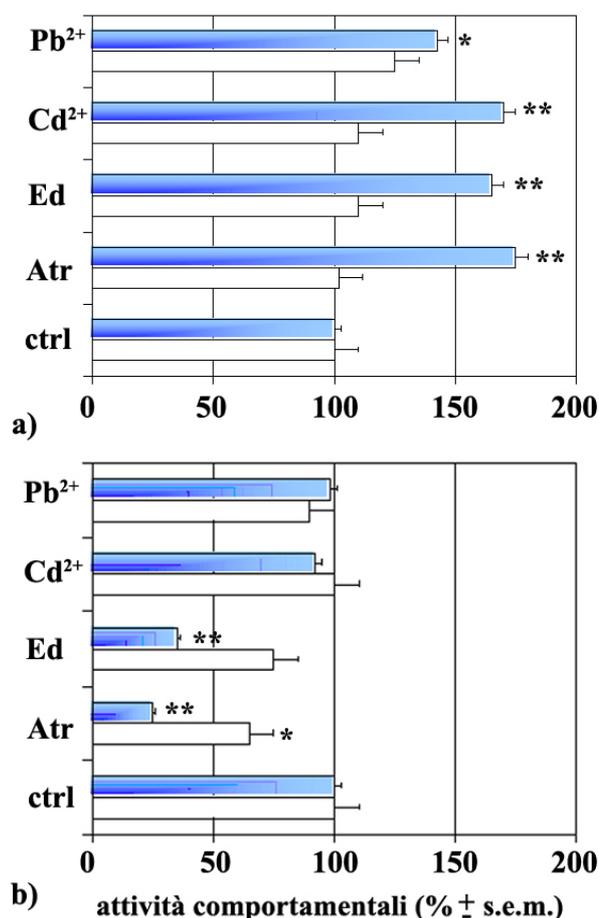


Fig. 20 Variazioni comportamentali della categoria iperventilazione (a) e ricerca del cibo (b) osservate in *Thalassoma pavo* dopo una settimana di trattamento sulla base dei valori medi giornalieri. Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test. I dati sono riferiti al controllo (100%); *p<0.05; **p<0.01. Abbreviazioni= ctrl: controlli; Atr: atrazina; Ed: endosulfan; Cd²⁺: cadmio; Pb²⁺: piombo. Gli istogrammi in bianco indicano le concentrazioni LOAEL e quelle in azzurro le MAT per ogni singolo contaminante, riportate nella fig. 13.

Per quanto concerne gli effetti sulla ricerca del cibo, variazioni di tale atteggiamento si riscontrano solo dopo trattamento con i pesticidi, come è dimostrato dagli elevati decrementi indotti dalle concentrazioni MAT di Ed (-68%) e di Atr (-78%). Nel caso di quest'ultimo xenoestrogeno, moderati decrementi si osservano anche alle basse concentrazioni LOAEL (-48%; fig. 20b).

2.2 Analisi neurodegenerative

L'analisi degli effetti neurodegenerativi indotti dal trattamento con i metalli pesanti ed i pesticidi alle concentrazioni utilizzate nello studio comportamentale è stata condotta mediante due differenti approcci metodologici, ACS e Fluoro-Jade B, entrambi altamente specifici per la rilevazione dei neuroni degenerati. Inoltre mediante quest'ultima metodica, è stato possibile effettuare non solo un'analisi qualitativa ma anche quantitativa del danno neuronale, mediante la metodica riportata da Anderson et al. (2005). In primo luogo, tali analisi hanno permesso di evidenziare che le alterazioni comportamentali riportate in tale studio sono correlabili a danni neuronali indotti prevalentemente dalle concentrazioni MAT dei contaminanti considerati. In particolare, è possibile evidenziare un effetto selettivo regione-specifico indotto dai metalli pesanti e dai pesticidi in specifiche aree cerebrali. Nel caso dei metalli, gli effetti neurodegenerativi sono riscontrabili nelle aree extra-diencefaliche sia nel caso del trattamento con le concentrazioni MAT di Cd^{2+} e Pb^{2+} , come dimostrato dalle microfotografie dell'ACS (fig. 21 a-d) e del Fluoro-Jade B (fig. 21 e-f) a livello di OT e del telencefalo in *Thalassoma pavo*. La stima quantitativa del danno neuronale nelle suddette aree cerebrali riporta che Cd^{2+} è in grado di indurre un elevato ($p < 0.01$) e molto elevato ($p < 0.001$) incremento del numero dei neuroni danneggiati nel tetto ottico e nel telencefalo dorsale (fig. 21 i) accanto agli effetti del Pb^{2+} che si traducono in incrementi molto elevati ($p < 0.001$) nelle suddette aree.

Nel caso degli effetti indotti dai pesticidi Ed ed Atr, è stato possibile evidenziare come i principali danni neuronali siano stati indotti principalmente a carico delle aree diencefaliche ed in maniera prevalente alle alte concentrazioni di tali contaminanti. I pesticidi inducono i principali effetti neurodegenerativi nelle aree diencefaliche, come dimostrato dalle microfotografie dell'ACS (fig. 22 a-d) e del Fluoro-Jade B (fig. 22 e-f) a livello di POA e HTH in *Thalassoma pavo*. La stima quantitativa (fig. 22 i) del danno neuronale mostra che Atr induce in ambedue le aree un moderato ($p < 0.05$) incremento del numero di neuroni degenerati alla concentrazione più bassa, che diventano elevati ($p < 0.01$) alle concentrazioni MAT di tale contaminante. Nel caso di Ed, tale pesticida induce un incremento molto elevato ($p < 0.001$) sia in POA che HTH solo alla più alta concentrazione.

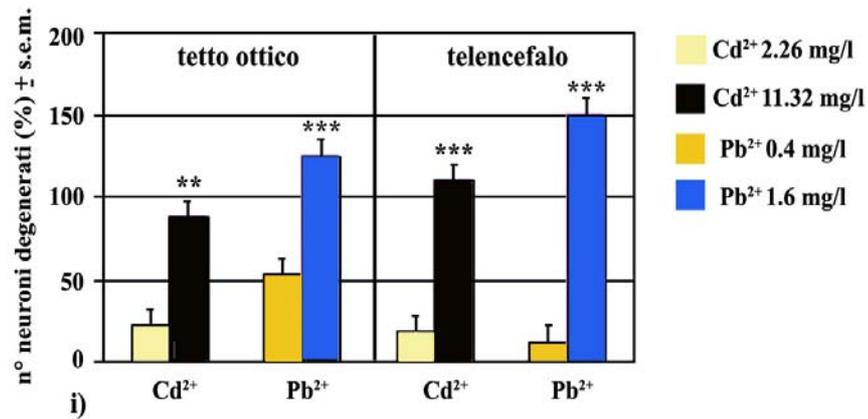
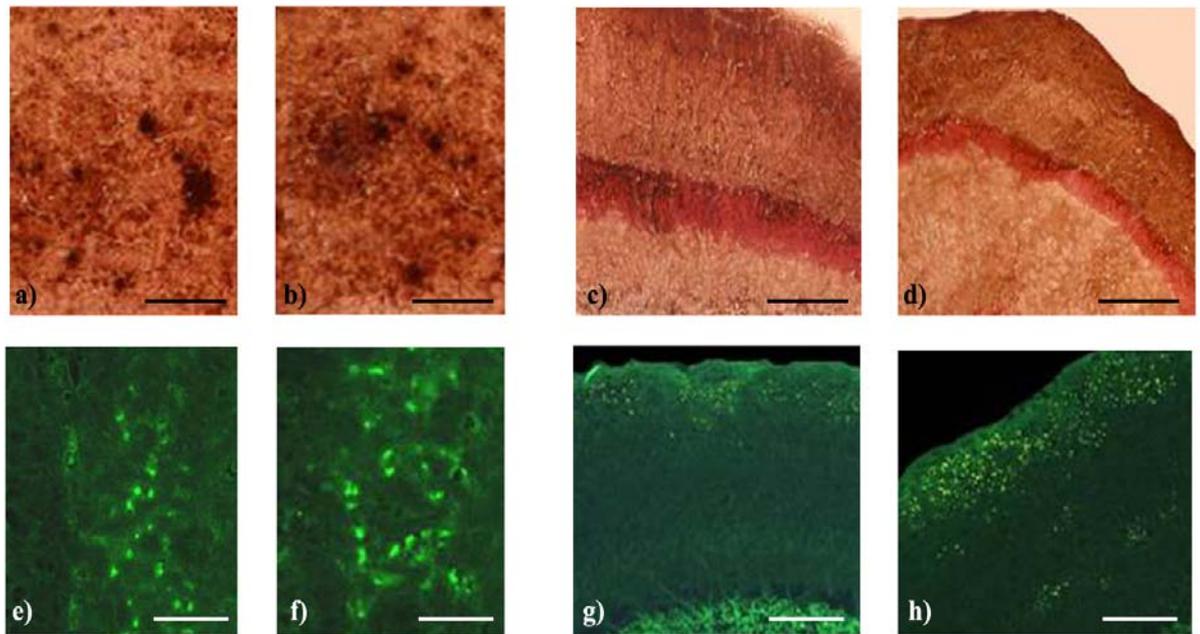


Fig. 21 Le analisi neurodegenerative mostrano evidenti danni neuronali nel tetto ottico (a,b,e,f) e telencefalo dorsale (c,d,g,h) in seguito ad esposizione ai metalli pesanti Cd²⁺ (a,c,e,g) e Pb²⁺ (b,d,f,h) alle concentrazioni MAT (11.32 mg/L e 1.6 mg/L, rispettivamente) nel Teleosteo *Thalassoma pavo*. Tali analisi sono state condotte attraverso l'applicazione di due diversi metodi istologici i.e. ACS (a-d) and Fluoro-Jade B (e-h). L'analisi quantitativa (i) riporta il numero di neuroni degenerati (%) nel tetto ottico e nel telencefalo dorsale di tale Teleosteo, in seguito ad esposizione alle due concentrazioni di Cd²⁺ (2.26 mg/L = giallo; 11.32 mg/L = nero) e Pb²⁺ (0.4 mg/L = arancio; 1.6 mg/L = azzurro). I dati rappresentano la media di cinque prove condotte separatamente e sono riportati come il numero dei neuroni degenerati (% ± s.e.m.) di tutti i gruppi di trattamento rispetto al gruppo dei controlli. Analisi statistica: ANOVA plus *post-hoc* test (Newman-Keul's test), * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001. Scale bars: (a,b,e,f) = 60µm; (c,d,g,h) = 80µm.

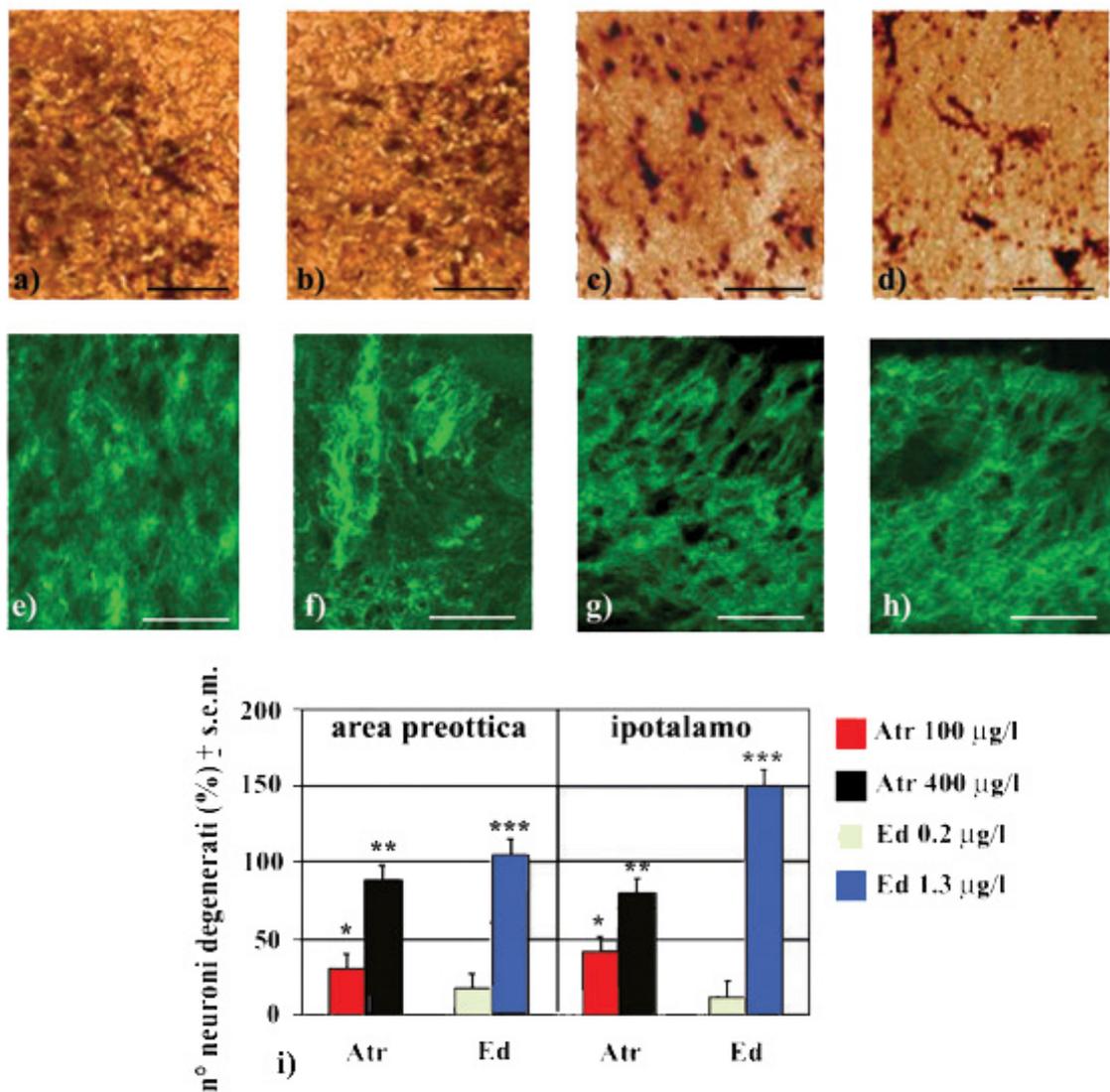


Fig. 22 Le analisi neurodegenerative mostrano evidenti danni neuronali nell'area preottica (a,b,e,f) e nell'ipotalamo (c,d,g,h) in seguito ad esposizione ai pesticidi Ed (a,c,e,g) e Atr (b,d,f,h) alle concentrazioni MAT (0.2 µg/L e 400 µg/L, rispettivamente) nel Teleosteo *Thalassoma pavo*. Tali analisi sono state condotte attraverso l'applicazione di due diversi metodi istologici i.e. ACS (a-d) and Fluoro-Jade B (e-h). L'analisi quantitativa (i) riporta il numero di neuroni degenerati (%) nell'area preottica e nell'ipotalamo di tale Teleosteo, in seguito ad esposizione alle due concentrazioni di Atr (100 µg/L = rosso; 400 µg/L = nero) e Ed (0.2 µg/L = verde chiaro; 1.3 µg/L = azzurro). I dati rappresentano la media di cinque prove condotte separatamente e sono riportati come il numero dei neuroni degenerati (% ± s.e.m.) di tutti i gruppi di trattamento rispetto al gruppo dei controlli. Analisi statistica: ANOVA plus *post-hoc* test (Newman-Keul's test), * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001. Scale bars: (a,b,e,f) = 60µm; (c,d,g,h) = 50µm.

Parte III: Ruolo neuroprotettivo del sistema istaminergico e HSPs

3.1 Distribuzione autoradiografica del sistema istaminergico

In una specie quale *Thalassoma pavo*, le cui conoscenze neurofisiologiche risultano relativamente scarse, la determinazione e distribuzione del sistema istaminergico è stata effettuata per la prima volta mediante l'utilizzo di [^3H]-NAMH, radiolegante che mostra spiccata attività agonistica verso tutti i sottotipi recettoriali istaminergici. La concentrazione ottimale saturante di tale agonista è stata dimostrata essere 10 nM, considerato il valore del legame totale TB rispetto a NSB che mediante l'analisi di Scatchard riporta valori di β_{max} pari a 155 fmol/mg tessuto e K_d di 2 nM (fig. 23).

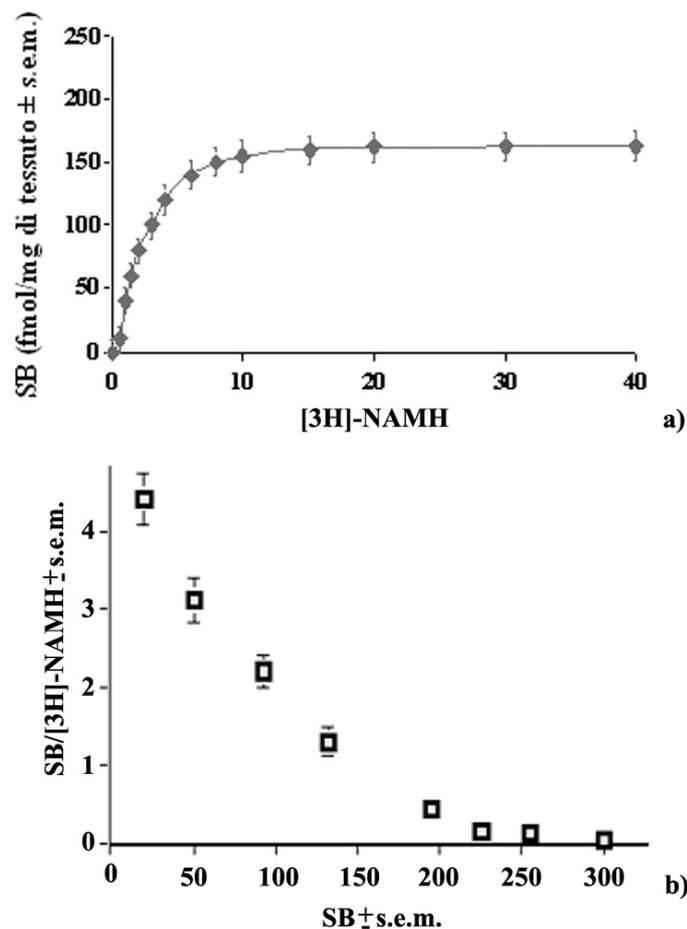


Fig. 23 Curva di saturazione (a) e Scatchard (b) del legame dell'agonista [^3H]-NAMH (fmol/mg tessuto \pm s.e.m.) determinati nell'area preottica di *Thalassoma pavo*. Dal grafico lineare di Scatchard, il valore della pendenza è stato calcolato per determinare la costante di dissociazione media (nM), mentre l'intercetta all'asse x fornisce il numero massimo di siti legati. I dati ottenuti sono la media di cinque prove separate.

La valutazione della distribuzione del sistema istaminergico nell'encefalo di *Thalassoma pavo* rivela un'elevata eterogeneità nelle diverse porzioni encefaliche dall'estremità rostrale alla caudale (fig. 24).

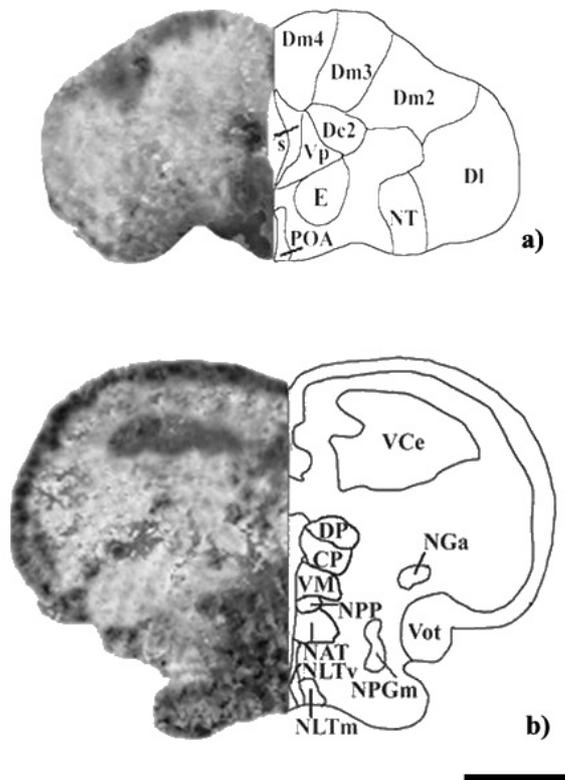


Fig. 24 Autoradiogrammi rappresentativi del legame totale di [3H]-NAMH (emissione di sinistra) in aree anteriori (a) e posteriori (b) dell'encefalo di *Thalassoma pavo*. A destra è riportato uno schema dei principali nuclei cerebrali. Abbreviazioni: Dm2, Dm3, Dm4: seconda, terza e quarta parte mediale del telencefalo dorsale; DI: parte laterale del telencefalo dorsale; NT: nucleo tenia; Dc2: seconda parte centrale del telencefalo dorsale; Vp: nucleo postcommissurale; Vs: nucleo sopracommissurale; POA: area preottica; VCe: valvola del cervelletto; DP: nucleo talamico dorsale posteriore; CP: nucleo talamico centrale posteriore; VM: nucleo talamico ventromediale; NPP: nucleo posteriore periventricolare; NPGm: nucleo preglomerulare mediale; NAT: nucleo anteriore periventricolare; NLTv: parte ventrale del nucleo tuberale laterale; NLTm: parte mediale del nucleo laterale tuberale; NGa: nucleo glomeruloso anteriore. Scale bar: 1.6 mm.

Dalla valutazione dei livelli di legame dell'agonista nelle diverse aree (fig. 25), è possibile osservare che livelli elevati ($175 \text{ fmol/mg tessuto} < X < 125 \text{ fmol/mg tessuto}$) si ritrovano in aree anteriori quali E e SGC; livelli intermedi ($125 \text{ fmol/mg tessuto} < X < 75 \text{ fmol/mg tessuto}$) nella porzione dorso-mediale del telencefalo (Dm), nel diencefalo a livello di CP e

NLT, nel pretetto in NPGm; valori moderati ($X < 75$ fmol/mg tessuto) caratterizzano lo strato molecolare del cervelletto (MS).

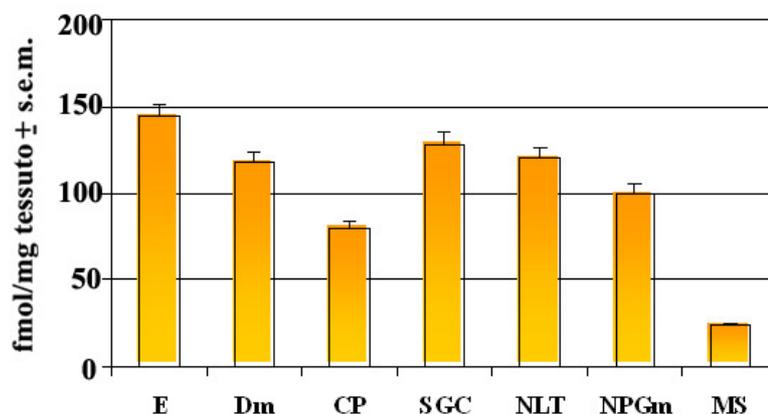


Fig. 25 Distribuzione dei livelli di legame totale di [3 H]-NAMH nell'encefalo di *Thalassoma pavo*. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte per ogni area encefalica ed i dati sono riportati come valori medi di fmol/mg tessuto \pm s.e.m.

3.2 Caratterizzazione dei sottotipi recettoriali istaminergici

L'impiego degli antagonisti Pir, Cim e Tio, altamente specifici per i tre sottotipi recettoriali istaminergici H_1R , H_2R , H_3R rispettivamente, ha consentito di caratterizzare farmacologicamente i diversi sottotipi mediante un meccanismo di competizione per il legame dell'agonista ai recettori nelle diverse aree encefaliche di *Thalassoma pavo* (fig. 26).

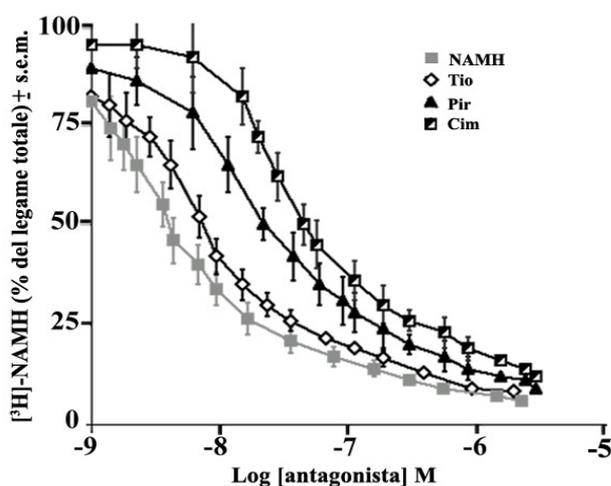


Fig. 26 Curva di competizione di [3 H]-NAMH in presenza di antagonisti specifici per H_1R , H_2R , H_3R nell'area preottica di *Thalassoma pavo*. Ogni punto rappresenta la media di tre test statistici separati.

Lo studio di competizione mostra un'eterogena distribuzione dei tre sottotipi recettoriali (fig. 27). In particolare i sottotipi H₂R e H₃R appaiono essere maggiormente distribuiti, il primo principalmente nelle aree mesencefaliche quali OT (SGC; 43%) e NSV (42%), il secondo nelle aree telencefaliche (Dm; 38%) in HTH a livello di VM (45%) e NLT (46%). In quest'ultimo nucleo apprezzabili valori sono riportati anche per il sottotipo H₁R (36%), che risulta abbondantemente rappresentato anche in Tlo (32%).

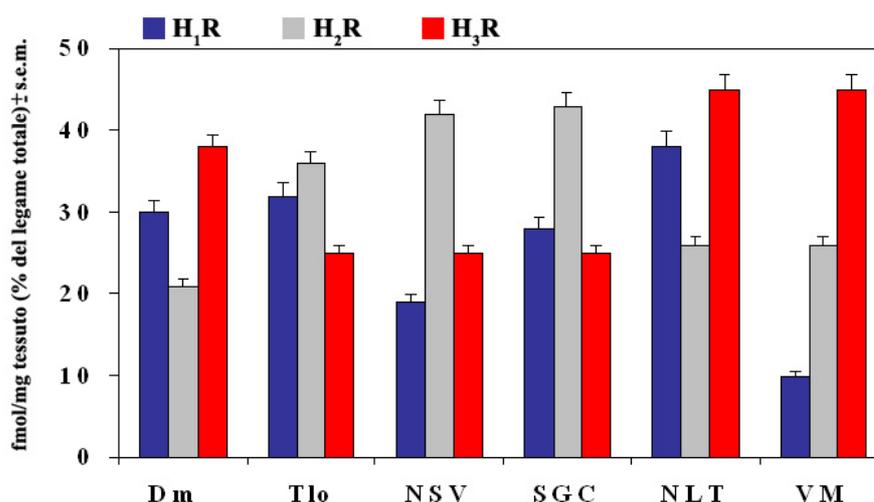


Fig. 27 Livelli di legame (% del legame totale) dei tre sottotipi recettoriali H₁R, H₂R e H₃R nell'encefalo di *Thalassoma pavo*, determinati mediante l'applicazione dei loro specifici antagonisti. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte per ogni area encefalica ed i dati sono riportati come % del legame di ogni singolo sottotipo rispetto al legame totale nelle aree considerate.

3.3 Identificazione molecolare di H₂R e H₃R

Sulla base dei risultati dell'analisi autoradiografica, è stato possibile osservare non solo la distribuzione eterogenea del sistema istaminergico ma anche una prevalenza dei sottotipi istaminergici H₂R e H₃R, la cui localizzazione risulta abbondante in aree che risultano critiche dal punto di vista funzionale nel Teleosteo *Thalassoma pavo*. Sulla base di tali considerazioni, il successivo studio molecolare e le analisi di neurotossicità si sono prevalentemente focalizzate su tali sottotipi.

L'utilizzo di *primers* degenerati costruiti sulla sequenza del sottotipo recettoriale H₂R di *Rattus norvegicus* ha permesso di identificare, in una specie relativamente lontana dal punto di vista filogenetico quale *Thalassoma pavo*, un frammento di 394 bp, la cui lunghezza è paragonabile a quella ritrovato nel ratto. I risultati della reazione di sequenza hanno fornito un frammento nucleotidico complessivo di 317 bp, poiché la parte terminale del frammento presenta una perdita di purezza, visualizzata sugli elettroferogrammi mediante Finch TV versione 1.3.1. La sequenza è riportata di seguito:

```
> partial cds H2R Thalassoma pavo
GCGTGATGAGGTCTATGGACAGGAGGATGGGCGTGTGACCTTCTACCTGCCTCTTCTCATCATGTGTGT
GGTTTTCTACACAATCTTTATAATTGCCAGGGAGCAGGCCAAACGGATCTCCCCCTCCCCCTTGGAA
AGCGCCCACCATCAGAGAGAACACAGCCACCGTGACACTGGCGCCCGTCATGGGAGCGTCTCCACCTG
CTGGTTTCCTTACTTCACTGCATTTCGTTTACCGTGTGCTGAGAGGGGATGATGCCACTAATGAGGCGGT
CGAGGGCATTGTCTATGGTTGGGTTATGGCAAATCAGCCC
```

Per verificare se tale frammento corrispondesse realmente alla sequenza di H₂R in *Thalassoma pavo*, tale sequenza parziale è stata analizzata mediante un programma di allineamento disponibile *online* (<http://workbench.sdsc.edu>) che consente di realizzare la funzione BLASTN, consentendo di ricercare l'omologia con tutte le sequenze di tale recettore per altre specie depositate in banca dati. Al fine di verificare la percentuale di identità tra il frammento neo-sequenziato in *Thalassoma pavo* e le sequenze nucleotidiche codificanti per tale recettore in altre specie, è stata realizzato un allineamento nucleotidico (CLUSTALW) che dimostra una percentuale di omologia > 80% con tutte le specie considerate (fig. 28).

Sequence alignment for H₂R

Consensus key (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue

- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
Guinea 481  AGGAATGAGACCAGCAAGGATAATGACACCATTGTCAAGTGCAAAGTCCAGGTCAACGAA
Homo       AGGAACGAGACCAGCAAGGGCAATCATACCACCTCTAAGTGCAAAGTCCAGGTCAATGAA
Mus       AGAAATGGGACCAGAGGGGGCAATGACACC---TTCAAGTGCAAAGTGCAGGTCAACGAG
Rattus    AGAAATGGGACCAGAGGGGGCAATGACACC---TTCAAGTGCAAAGTCCAGGTCAATGAG
Thalas    -----GCGTGATGAG
                                         *   *   **

Guinea 541  GTGTATGGGTTGGTGGATGGACTGGTACCTTCTACCTACCTCTGCTGATAATGTGCATC
Homo       GTGTACGGGCTGGTGGATGGGCTGGTACCTTCTACCTCCCGCTACTGATCATGTGCATC
Mus       GTATATGGACTGGTGGATGGGATGGTACCTTCTACCTGCCTCTTCTCATCATGTGTGTC
Rattus    GTGTACGGACTGGTGGATGGGCTGGTACCTTCTACCTGCCTCTTCTCATCATGTGTGTC
Thalas    GTCTATGGACAGGAGGATGGGCGTGTGACCTTCTACCTGCCTCTTCTCATCATGTGTGTC
** ** **   ** * ** **   ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** *
```

```

Guinea 601 ACATACTTCCGCATCTTCAAGATCGCTCGGGAACAGGCCAGGAGAATCAATCACATCGGT
Homo       ACCTACTACCGCATCTTCAAGGTCGCCCGGGATCAGGCCAAGAGGATCAATCACATTAGC
Mus        ACCTACTACAGAATCTTTAAGATCGCCAGGGAGCAAGCCAAGAGGATCAACCACATCAGC
Rattus     ACTTACTACAGAATCTTTAAGATTGCCAGGGAGCAGGCCAACCGATCAACCACATCAGC
Thalas     GTTTTCTACACAATCTTTATAATTGCCAGGGAGCAGGCCAACCGATCTCCCCCTCTCCC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Guinea 661 TCCTGGAAAGGCAGCCACCATCAGGGAGCACAAGCCACAGTGACACTGGCTGCCGTAATG
Homo       TCCTGGAAAGGCAGCCACCATCAGGGAGCACAAGCCACAGTGACACTGGCCGCCGTCATG
Mus        TCCTGGAAAGGCAGCCACCATCAGAGAACACAAGCCACCGTGACCCTGGCTGCCGTCATG
Rattus     TCCTGGAAAGGCAGCCACCATCAGAGAGCACAAGCCACCGTGACACTGGCAGCCGTCATG
Thalas     CCTTGGAAAGCGCCACCATCAGAGAGAACACAGCCACCGTGACACTGGCGCCCGTCATG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Guinea 721 GGAGCCTTCATCATCTGCTGGTTTCCCTTACTTCACCGTTTTTGTGTACCGTGGGCTGAAA
Homo       GGGGCCTTCATCATCTGCTGGTTTCCCTTACTTCACCGCGTTTTGTGTACCGTGGGCTGAGA
Mus        GGAGCATTTCATCTGCTGGTTTCCCTTACTTCACCTGCCCTCGTTTACCGTGGACTGAGA
Rattus     GGAGCCTTCATCATCTGCTGGTTTCCCTTACTTCACCTGCATTCGTTTACCGTGGGCTGAGA
Thalas     GGAGCCTTCATCATCTGCTGGTTTCCCTTACTTCACCTGCATTCGTTTACCGTGTGCTGAGA
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Guinea 781 GGGGATGATGCTGTCAATGAGGTGTTGAAGATGTTGTTCTGTGGCTGGGCTATGCCAAC
Homo       GGGGATGATGCCATCAATGAGGTGTTAGAAGCCATCGTTCTGTGGCTGGGCTATGCCAAC
Mus        GGGGATGACGCTGTGAACGAGGTGGTCGAGGGTATCGTCCTATGGTTGGGTTATGCCAAT
Rattus     GGGGATGATGCCATCAATGAGGCGGTGAGGGCATTTGTCCTATGGTTGGGCTATGCCAAT
Thalas     GGGGATGATGCCACTAATGAGGCGGTGAGGGCATTTGTCCTATGGTTGGGTTATGGCAA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Guinea 841 TCAGCCCTGAACCCCATCCTGTATGCTGCCCTCAACAGAGACTTCCGCACTGCATACCAT
Homo       TCAGCCCTGAACCCCATCCTGTATGCTGCGCTGAACAGAGACTTCCGCACCGGTTACCAA
Mus        TCAGCCCTGAACCCCATCCTGTACGCCACCCTCAACAGAGACTTCCGCATGGCGTACCAA
Rattus     TCAGCCCTGAACCCCATCCTGTACGCTGCTCTCAACAGAGACTTCCGCACGGCGTACCAA
Thalas     TCAGCCC-----
          * * * * *

```

Fig. 28 Allineamento tra la parziale sequenza nucleotidica di H₂R in *Thalassoma pavo* ed altre specie di Mammiferi, quali *Guinea pig*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*. Gli asterischi in azzurro indicano l'identità nucleotidica.

Con l'ausilio dello stesso sito disponibile *online* (<http://workbench.sdsc.edu>), è stato possibile mediante la funzione SIXFRAME ottenere la traduzione aminoacidica del frammento nucleotidico sequenziato, verificando che in essa non esistono codoni di STOP:

```

> partial protein H2R Thalassoma pavo
RDEVYQGEDGRVTFYLPPLLIMCVVFYTIIFIAREQAKRISPSPWKAPTIRENTATVTLAPVMGAFSTCW
FPYFTAFVYRVLRGDDATNEAVEGIVLWLVGYGKSA

```

Lo stesso programma ci ha consentito di realizzare un allineamento tra le sequenze aminoacidiche delle altre specie con quella ottenuta in *Thalassoma pavo*, verificando successivamente identità e similarità tra la sequenza in esame e tutte le altre, mediante il software BIOEDIT *Sequence Allineament Editor* (fig. 29).

a) Sequence alignment H₂R

Consensus key

- * - single, fully conserved residue
- : - conservation of strong groups
- . - conservation of weak groups
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

Guinea 161 TDPLRYPVLITPARVAISLVFIWVISITLSFSLIHLGWNSRNETSKDNDTIVKCKVQVNE
Homo      MDPLRYPVLVTPVRVAISLVLIWVISITLSFSLIHLGWNSRNETSKGNHTTSKCKVQVNE
Mus       TDPLRYPVLVTPVRVAISLVFIWVISITLSFSLIHLGWNSRNGTRGGND-TFKCKVQVNE
Rattus    TDPLRYPVLVTPVRVAISLVFIWVISITLSFSLIHLGWNSRNGTRGGND-TFKCKVQVNE
Thalas    -----RDE
                                         :*

Guinea 221 VYGLVDGLVTFYLP LLIMCITYFRIFK IAREQARRINHIGSWKAATIREHKATVTLAAM
Homo      VYGLVDGLVTFYLP LLIMCITYYRIFK VARDQAKRINHISSWKAATIREHKATVTLAAM
Mus       VYGLVDGMVTFYLP LLIMCVTYRIFK IAREQAKRINHISSWKAATIREHKATVTLAAM
Rattus    VYGLVDGLVTFYLP LLIMCVTYRIFK IAREQAKRINHISSWKAATIREHKATVTLAAM
Thalas    VYQEDGRVTFYLP LLIMCVVFTIF IAREQAKRISPSPWKAPTIRENTATVTLAPVM
***  ** *****.:.: ** :*:*:*. .***.***.:*****. **

Guinea 281 GAFIICWFPYFTAFVYRGLKGDDAVNEVFEDVVLWLGYSALNPILYAALNRDFRTAYH
homo      GAFIICWFPYFTAFVYRGLRGDDAINEVLEAIVLWLGYSALNPILYAALNRDFRTGYQ
mus       GAFIVCWFPYFTAFVYRGLRGDDAVNEVEGIVLWLGYSALNPILYATLNRDFRMAYQ
rattus    GAFIICWFPYFTAFVYRGLRGDDAINEAVEGIVLWLGYSALNPILYAALNRDFRTAYQ
T.pavo    GAFSTCWFPYFTAFVYRVLRGDDATNEAVEGIVLWLGYGKSA-----
***  *****.*** *:*** **.* :*****.:**

```

b) <i>Thalassoma pavo</i> H ₂ R	identità	similarità
<i>Guinea pig</i>	70%	83%
<i>Homo sapiens</i>	72%	86%
<i>Rattus norvegicus</i>	78%	88%
<i>Mus musculus</i>	72%	87%

Fig. 29 Allineamento tra la sequenza aminoacidica di H₂R in *Thalassoma pavo* con le altre specie di Mammiferi (a): gli asterischi in azzurro indicano un residuo aminoacidico completamente conservato, i due punti in verde la conservazione di gruppi forti, mentre il singolo punto blu la conservazione di gruppi deboli. (b) Tabella riassuntiva delle percentuali di identità e similarità calcolate tra la sequenza proteica di *Thalassoma pavo* e quella di tutte le altre specie prese in esame.

Lo studio della sequenza aminoacidica determinata in *Thalassoma pavo* è proseguito con l'analisi di predizione della struttura secondaria mediante http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gib.pl, al fine di verificare se le configurazioni secondarie ritrovate nella sequenza aminoacidica H₂R in *Rattus norvegicus* fossero mantenute anche nel frammento identificato in *Thalassoma pavo* (fig. 30).

ratto, è stato possibile determinare la presenza di 19 sostituzioni aminoacidiche, di cui sette mantengono la stessa funzione, nove determinano una totale perdita della funzione e tre garantiscono una conservazione di gruppi laterali deboli.

Tenendo presente che il frammento proteico di H₂R in *Thalassoma pavo* consiste di una porzione omologa a quella di ratto in cui sono contenuti due domini transmembrana (TMV e TMVI), attraverso <http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html> è stato possibile effettuare una previsione di ipotetici domini transmembrana in *Thalassoma pavo*. Il risultato di tale analisi dimostra come realmente il frammento neo-identificato contenga probabilmente due domini TM in maniera analoga a quelli osservabili nella medesima regione di H₂R in *Rattus norvegicus* (fig. 31).

Sequenza: H₂R Rattus Norvegicus, Lunghezza totale : 358 aa. Grado di idrofobicità : 0.396369

No.	N terminale	Regione transmembrana	C terminale	lunghezza
1	16	ALKVTISVVLTTLLILITIAGNVV	38	23
2	55	CFIVSLAATDLLLGLLVLPFSAI	77	23
3	89	VFCNIYTSLDVMLCTASILNLFM	111	23
4	133	VRVAISLVFIWVISITLSFLSIH	155	23
5	183	LVDGLVTFYLPLLIMCVTYRIF	205	23
6	234	TAAVMGAFIICWFPYFTAFVYR	256	23
7	270	GIVLWLGYANSALNPILYAALNR	292	23

Sequenza: H₂R Thalassoma pavo, Lunghezza totale: 105 aa. Grado di idrofobicità: 0.193333

No.	N terminale	Regione transmembrana	C terminale	lunghezza
1	13	TFYLPLLIMCVVFYTFIAREQ	35	23
2	57	VTLAPVMGAFSTCWFYFTAFVY	79	23

Fig. 31 Predizione dei domini TM determinati per H₂R in *Rattus norvegicus* e *Thalassoma pavo*.

Per l'identificazione molecolare di H₃R sono stati utilizzati *primers* degenerati costruiti sulla sequenza del sottotipo recettoriale H₃R di *Rattus norvegicus* identificando in tal modo in *Thalassoma pavo* un frammento la cui lunghezza è paragonabile a quella ritrovato nel ratto. Tale frammento è stato visualizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio ed inviato per la reazione di sequenza. I risultati di tale reazione hanno così fornito un frammento nucleotidico di 457 bp la cui sequenza è riportata di seguito:


```

Mus      841      GCAGGCCCTGGTGTGAGACTGGGGAGGCTGGCCTCGGGGGTGGCAGCGGTGGAGGCGCT
Homo     GCGGCCGTAGGCGCTGAGGCCGGGGAGGCGACCCCTCGGGGGTGGCGGTGGGGGCGGCTCC
Rattus   GCAGGCCCTGGTGTGAGGCTGGGGAGGCTGCCCTCGGGGGTGGCAGTGGTGGAGGTGCT
Thalas   GAAGGCCCAGGTGCTGAGGCCGGCGATGCTGCCCTCGGGGGTACCAGTGGCAGAAGCTCT
          * * *   ** * ***** * ** * * *   ***** * * * * * * *

Mus      901      GCTGCCTCGCCCTACCTCCAGCTCCGGCAGCTCCTCAAGGGGCACCTGAGAGGCCACGCTCA
Homo     GTGGCTTCACCCACCTCCAGCTCCGGCAGCTCCTCGAGGGGCACCTGAGAGGCCCGCTCA
Rattus   GCTGCCTCGCCACCTCCAGCTCTGGCAGCTCCTCAAGGGGCACCTGAGAGGCCACGCTCA
Thalas   GCTGCCTCGCCCTACCTTCGGCTCTGCCCGCTCCTCGAGGGGCACCTTGGAGGCCCGCTCA
          * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Mus      961      CTCAAAAGGGGCTCCAAGCCATCAGCGTCTTCAGCGTCTTGGAGAAGCGCATGAAGATG
Homo     CTCAAGAGGGGCTCCAAGCCGTGCGGCTCCTCGGCCCTCGTGGAGAAGCGCATGAAGATG
Rattus   CTCAAAAGGGGCTCCAAGCCATCAGCATCTTCAGCATCCCTGGAGAAGCGCATGAAGATG
Thalas   TTCAAAAGAGTCTCCAGCCTCCAGCTTCTTCAGCAACCTTCCACAAGCGCCTCGAGATG
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Mus      1021     GTATCCCAAAGCATCACCCAGCGCTTTCGGCTGTCGCGGGACAAGAAGGTAGCCAAGTCCG
Homo     GTGTCCAGAGCTTCACCCAGCGCTTTCGGCTGTCGCGGGACAGGAAGGTGGCCAAGTCCG
Rattus   GTGTCCAGAGCATCACCCAGCGCTTTCGGCTGTCGCGGGACAAGAAGGTGGCCAAGTCCG
Thalas   TTGTTCCAAAGCATCACCCAGCCGTATCAGATGTCGCGGGACAATAAGGTAGCGAAGTCCG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Mus      1081     CTGGCTATCATCGTGAGCATCTTTGGGCTCTGCTGGGCCCCGTACACACTCCTCATGATC
Homo     CTGGCCGTCATCGTGAGCATCTTTGGGCTCTGCTGGGCCCCATACACGCTGCTGATGATC
Rattus   CTGGCCATCATCGTGAGCATCTTTGGGCTCTGCTGGGCGCCGTACACGCTCCTAATGATC
Thalas   CTGGCCATCATGGCGAACAAAGTTTGGGAT-----
          ***** * * * * * * * * * * * *

```

Fig. 32 Allineamento tra la parziale sequenza nucleotidica di H₃R in *Thalassoma pavo* ed altre specie di Mammiferi, quali *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*. Gli asterischi in azzurro indicano l'identità nucleotidica.

La traduzione aminoacidica del frammento nucleotidico sequenziato è stata effettuata tramite il programma (<http://workbench.sdsc.edu>), mediante la funzione SIXFRAME verificando che in essa non esistono codoni di STOP:

```

> partial protein H3R Thalassoma pavo
NLGIYLYIQRRTRLRLDGGREAGPELPPDAQSPPPPAPPSCWGCWPKGHGEAMPLHRYGGGEEGPGAEAGDAAL
GGTSGRSSAASPTFGSASSRGLRPRSFKRVSQPPASSATFHKRLEMLFQSITQPYQMSPDKKVAKSLAIMAN
KFG

```

Con lo stesso programma è stato realizzato un allineamento tra le sequenze aminoacidiche delle altre specie con quella ottenuta in *Thalassoma pavo*, verificando successivamente identità e similarità tra la sequenza in esame e tutte le altre, mediante il software BIOEDIT *Sequence Allineament Editor* (fig. 33).

coil Cc). Nel frammento sequenziato in tale studio è stata inoltre condotta un'analisi delle principali sostituzioni aminoacidiche che si ritrovano nella sequenza proteica di *Thalassoma pavo*, rispetto a quella di *Rattus norvegicus*. In generale, sono state rinvenute venticinque sostituzioni aminoacidiche in una sequenza complessiva di 151 aminoacidi: tra esse dodici garantiscono un'analogia funzionale, cinque consentono il mantenimento di aminoacidi con analoghe caratteristiche chimico-fisiche, e sette prevedono una totale perdita di funzione.

3.4 Pattern di espressione di H₂R e H₃R

Al fine di valutare le caratteristiche farmacologiche e funzionali di tali sottotipi ed in particolare il loro ruolo in condizioni di stress indotto dai contaminanti ambientali, è stato necessario innanzitutto definire il pattern di espressione di H₂R e H₃R (fig. 35) in condizioni basali nell'encefalo di *Thalassoma pavo*.

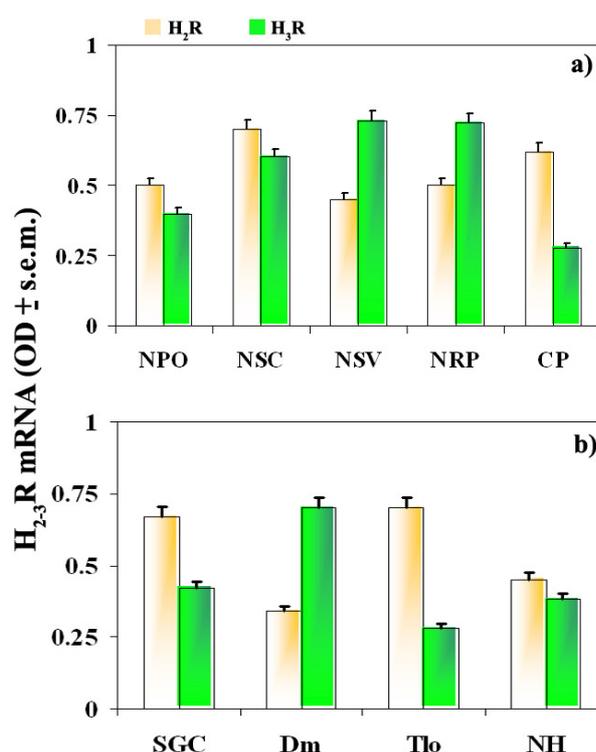


Fig. 35 Distribuzione dell'mRNA per H₂₋₃R nelle aree diencefaliche (a) ed extra-diencefaliche (b) di *Thalassoma pavo*. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come valori medi di OD ± s.e.m.

Dalla valutazione quantitativa dell'mRNA per H₂R, si può osservare che livelli elevati (0.75 OD < X < 0.5 OD) di tale trascritto sono riscontrabili nelle aree diencefaliche ed in particolare in NSC, CP, NPO e NRP, mentre valori intermedi (0.5 OD < X < 0.25 OD) sono

stati riportati in NSV. Nelle aree extra-diencefaliche valori elevati di tale mRNA caratterizzano le aree mesencefaliche quali SGC e Tlo, mentre intermedi livelli sono osservabili nel telencefalo in Dm e in NH. Per quanto concerne l'espressione di H₃R, nelle aree diencefaliche si osservano livelli elevati di tale trascritto in NSV, NRP e NSC, intermedi in NPO e bassi (≤ 0.25 OD) in CP. Le aree extra-diencefaliche presentano invece valori elevati solo in Dm, intermedi in SGC e NH e bassi in Tlo.

3.5 Antagonisti istaminergici: attività comportamentali e trascrizionali

La determinazione delle concentrazioni ottimali degli antagonisti istaminergici Cim e Tio, specifici per H₂R e H₃R rispettivamente, in grado di determinare una variazione significativa di un parametro biologico quale il peso corporeo, è stata condotta mediante uno screening di concentrazioni somministrate i.p. nel Teleosteo per una settimana. Tutte le analisi condotte negli animali *sham* hanno dimostrato che non esistono differenze significative tra tale gruppo sperimentale ed animali intatti (dati non mostrati), per cui gli *sham* sono da considerarsi il controllo in tutti i risultati relativi all'azione degli antagonisti istaminergici Cim e Tio. I risultati dello screening di concentrazione per la Cim dimostrano che la concentrazione di 200 mg/Kg per tale antagonista sia in grado di indurre un'incremento significativo ($p < 0.05$) del peso in *Thalassoma pavo*, incremento che rimane costante aumentando la dose iniettata (fig. 36).

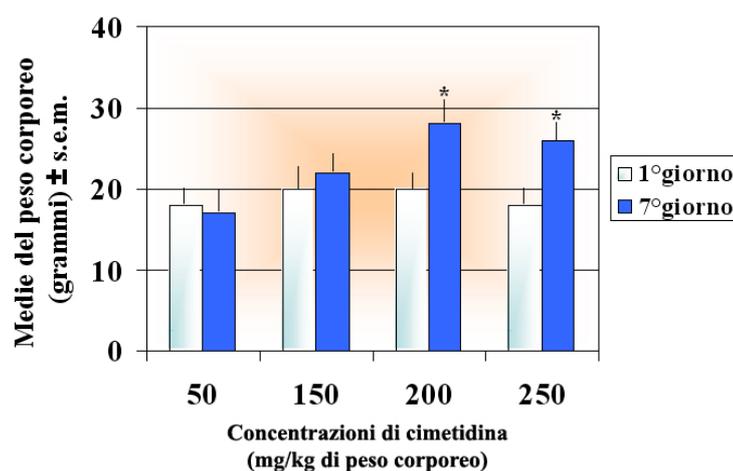


Fig. 36 Variazioni del peso corporeo, calcolate tra l'inizio e la fine del trattamento in *Thalassoma pavo* sottoposto a quattro diverse concentrazioni di Cim (50-250 mg/kg peso corporeo). I valori sono espressi come medie del peso in grammi \pm s.e.m. (Analisi Statistica: Student *t*-test two-tailed, * $p < 0.05$).

Per quanto concerne il trattamento i.p. condotto con le differenti concentrazioni di Tio, l'analisi dei dati dimostra come la concentrazione di 10 mg/Kg di peso corporeo induca un decremento significativo ($p < 0.05$) del peso corporeo, che si mantiene costante anche all'aumentare delle dosi iniettate (fig. 37).

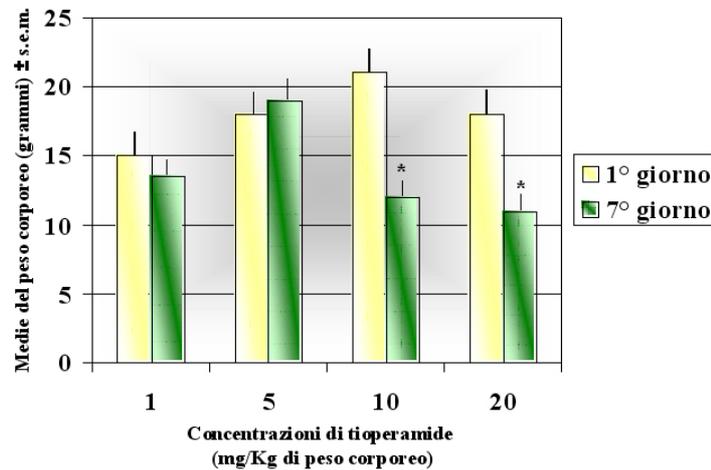


Fig. 37 Variazioni del peso corporeo, calcolate tra l'inizio e la fine del trattamento in *Thalassoma pavo* sottoposto a quattro diverse concentrazioni di Tio (1-20 mg/kg peso corporeo). I valori sono espressi come medie del peso in grammi \pm s.e.m. (Analisi Statistica: Student *t*-test two-tailed, * $p < 0.05$).

Lo studio cinetico (*time-course study*), che riporta l'andamento temporale della variazione di peso indotta dalle concentrazioni ottimali di Cim e Tio in *Thalassoma pavo* dimostra che il peso corporeo dell'animale aumenta nel caso della Cim e decresce nel caso della Tio in maniera graduale nell'arco dell'intero trattamento, con la prima variazione significativa che realmente compare al settimo giorno del trattamento per entrambi gli antagonisti (fig. 38). Ciò consente di assegnare una settimana quale durata ideale di tali trattamenti.

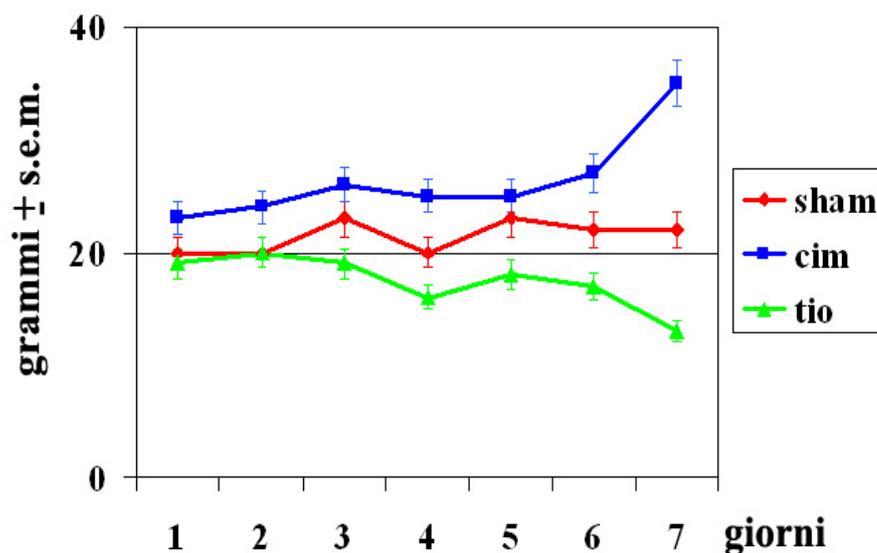


Fig. 38 Andamento temporale dei gruppi sperimentali “sham” (rosso), Cim 200 mg/Kg (azzurro) e Tio 10 mg/Kg (verde). I dati sono espressi come medie del peso corporeo nei tre gruppi (grammi \pm s.e.m.)

Sulla base delle concentrazioni testate e degli studi di *time course*, le analisi successive sono state condotte mediante trattamento i.p. di tali dosi e nel tempo sperimentale di una settimana. In particolare, per quanto concerne lo studio comportamentale, è stato possibile riscontrare come tali concentrazioni degli antagonisti istaminergici siano state in grado di indurre in *Thalassoma pavo* significative variazioni delle principali attività comportamentali prese in esame.

Nella valutazione degli effetti indotti da Cim (200 mg/Kg) sulle principali attività comportamentali di *Thalassoma pavo* ed in particolare sulle attività motorie ed alimentari, è stato possibile osservare come tale antagonista abbia indotto un incremento progressivo della ricerca del cibo e del tempo complessivo di inattività trascorsi dall'animale (sec. \pm s.e.m.) rispetto all'animale *sham* (fig. 39).

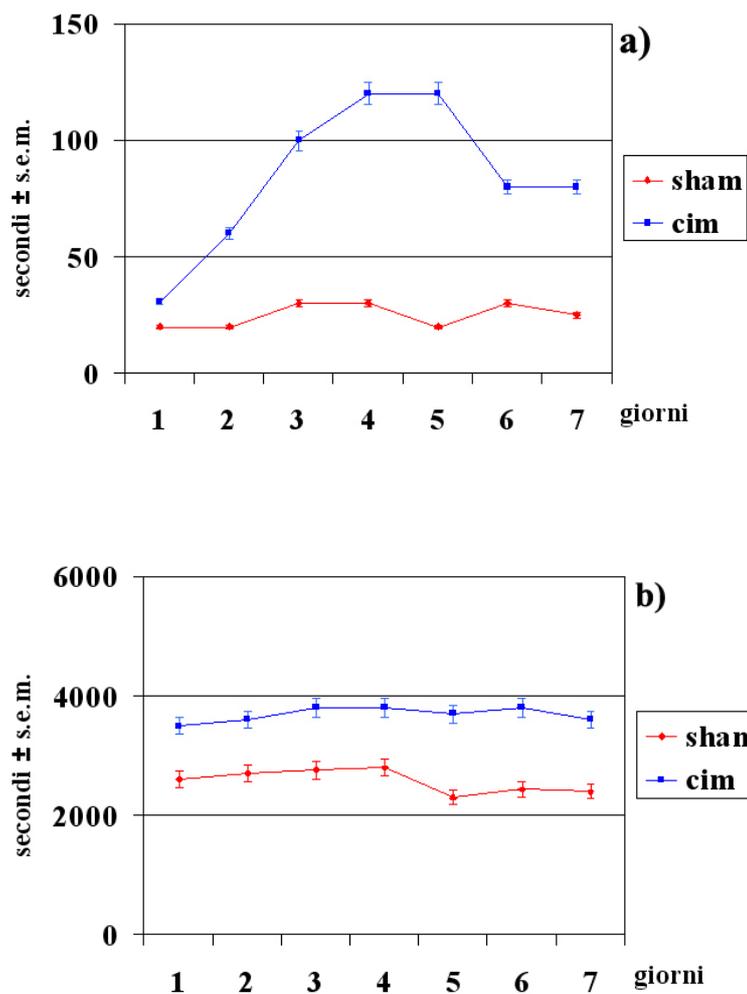


Fig. 39 Andamento temporale della variazione del tempo totale trascorso nella ricerca del cibo (a) e di inattività (b) nei *Thalassoma pavo sham* (rosso) e trattati con Cim (200 mg/Kg peso corporeo, azzurro). I dati sono espressi in secondi \pm s.e.m.

Per quanto concerne gli effetti indotti, invece, dal trattamento con Tio (10 mg/Kg), è interessante osservare come siano state riscontrate variazioni che seguono un andamento totalmente opposto rispetto a quello riscontrato con il trattamento con Cim: in questo caso gli animali dimostrano infatti una riduzione della ricerca del cibo, accanto ad una spiccata iperattività e dunque incremento complessivo della fase di nuoto (fig. 40).

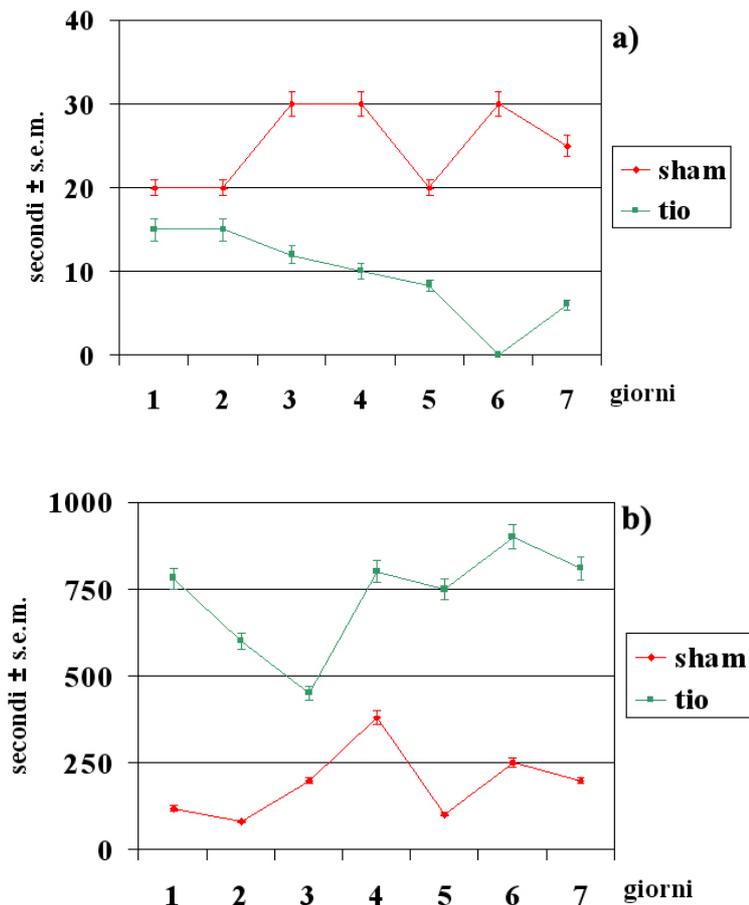


Fig. 40 Andamento temporale della variazione del tempo totale trascorso nella ricerca del cibo (a) e nel nuoto (b) nei *Thalassoma pavo sham* (rosso) e trattati con Tio (10 mg/Kg peso corporeo, verde). I dati sono espressi in secondi \pm s.e.m.

Accanto alle variazioni comportamentali riportate per effetto della somministrazione dei due antagonisti istaminergici, è stato possibile osservare che tali agenti farmacologici alle concentrazioni ottimali sono in grado di indurre significative variazioni nell'espressione genica dei due sottotipi istaminergici rispetto al controllo, mentre alle concentrazioni più basse testate per tali antagonista non sono state riportate variazioni di rilievo. A tale proposito, Cim (200 mg/Kg) induce nelle aree diencefaliche di *Thalassoma pavo* significative *upregulations* del trascritto di H₂R, che si traducono in incrementi molto elevati ($p < 0.001$) in NRP (+110%), elevati ($p < 0.01$) in NSC (+86%) e moderati ($p < 0.05$) in VM (+46%, fig. 41 a). Per quanto concerne le aree extradiencefaliche, tale antagonista induce moderate *upregulations* in aree mesencefaliche quali SGC (+52%) e Tlo (+48%), accanto ad elevate e moderate *downregulations* in NH (-74%) e NPGm (-40%), rispettivamente (fig. 41 b).

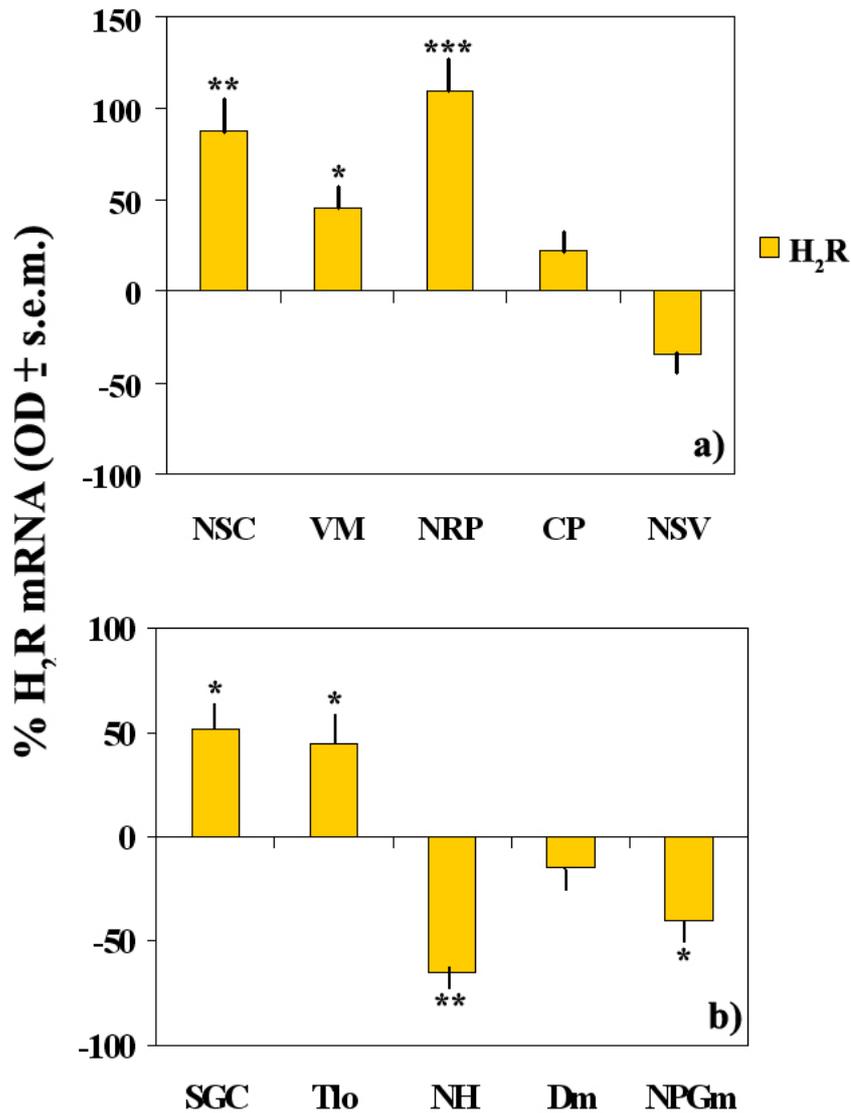


Fig. 41 Variazioni dell'mRNA per H₂R nelle aree diencefaliche (a) ed extra-diencefaliche (b) in *Thalassoma pavo*. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattato con Cim (200 mg/kg di peso corporeo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Per quanto concerne gli effetti indotti dalla Tio (10 mg/Kg) sull'espressione genica di H₃R, è stato possibile osservare che le aree diencefaliche seguono un trend contrastante, caratterizzato da elevate *up* e *downregulations* in NDLi (+73%) e NRP (-88%), rispettivamente, oltre a moderate *up* e *downregulations* in NSV (+38%) e NPO (-48%), rispettivamente (fig. 42 a). Nelle aree extra-diencefaliche, l'andamento generale indotto da tale antagonista risulta essere di decremento dei livelli di trascritto per H₃R, come

evidenziato dalle elevate *downregulations* in Dm (-72%), divengono moderate nelle aree mesencefaliche quali SGC (-49%) e Tlo (-46%, fig. 42 b).

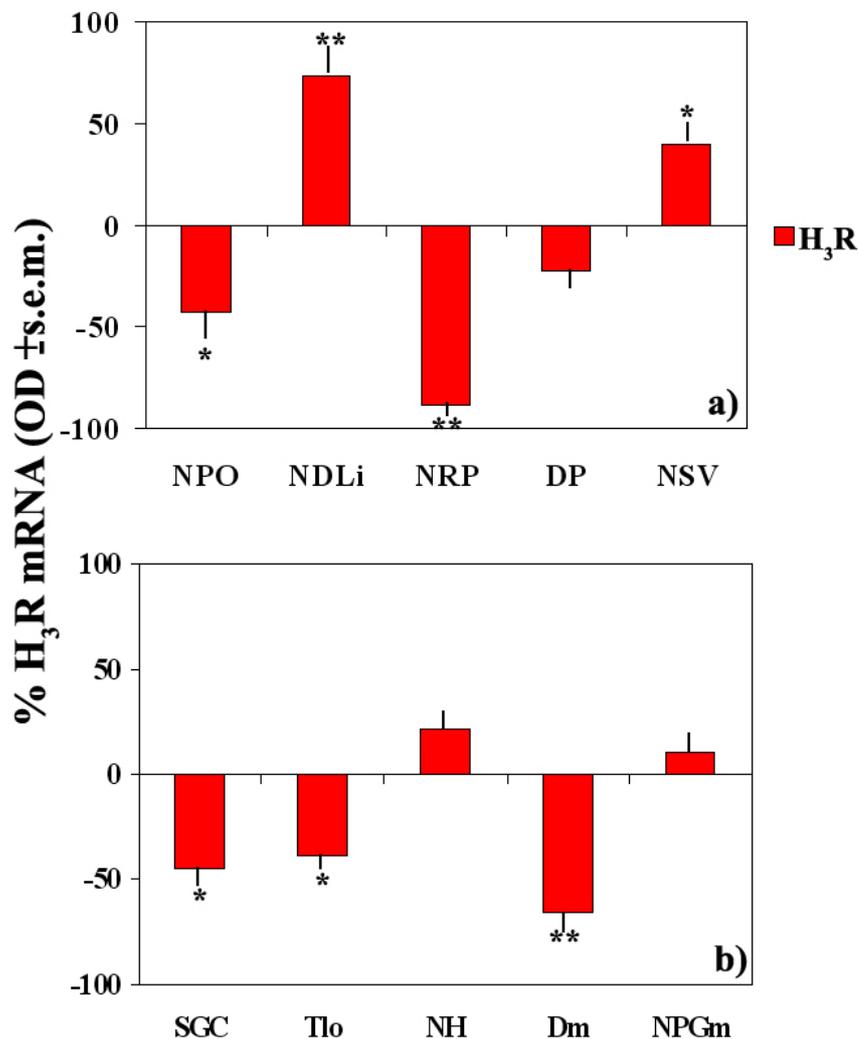


Fig. 42 Variazioni dell'mRNA per H₃R nelle aree diencefaliche (a) ed extra-diencefaliche (b) in *Thalassoma pavo*. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattato con Tio (10 mg/kg di peso corporeo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

3.6 Effetti degli stressori ambientali sull'espressione di H₂R e H₃R

Sulla base dei risultati ottenuti sulla distribuzione dell'mRNA per H₂R e H₃R dell'animale in condizioni fisiologiche, si è proceduto alla determinazione degli effetti indotti dalle concentrazioni NOAEL e MAT dei metalli pesanti Cd²⁺ e Pb²⁺ e dei pesticidi Ed e Atr. In tutte le analisi effettuate le concentrazioni LOAEL non inducono variazioni significative

dell'espressione genica di tali sottotipi (dati non mostrati). Da un'analisi generale appare evidente che i metalli pesanti Cd^{2+} e Pb^{2+} alle concentrazioni MAT inducono un generale decremento dei livelli del trascritto per H_2R (fig. 43).

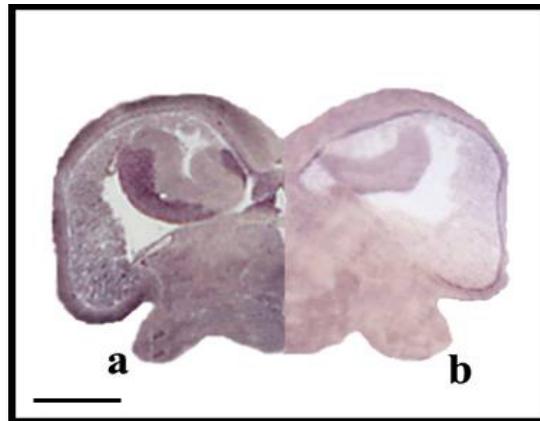


Fig. 43 Espressione dell'mRNA per H_2R in aree rappresentative diencefaliche intermedie di animali ctrl (a) e trattati con la concentrazione MAT di Cd^{2+} (b). Scale bar: 1.6 mm.

Gli effetti di *downregulation* indotti dai due metalli pesanti risultano particolarmente spiccati nelle aree mesencefaliche (fig. 44).

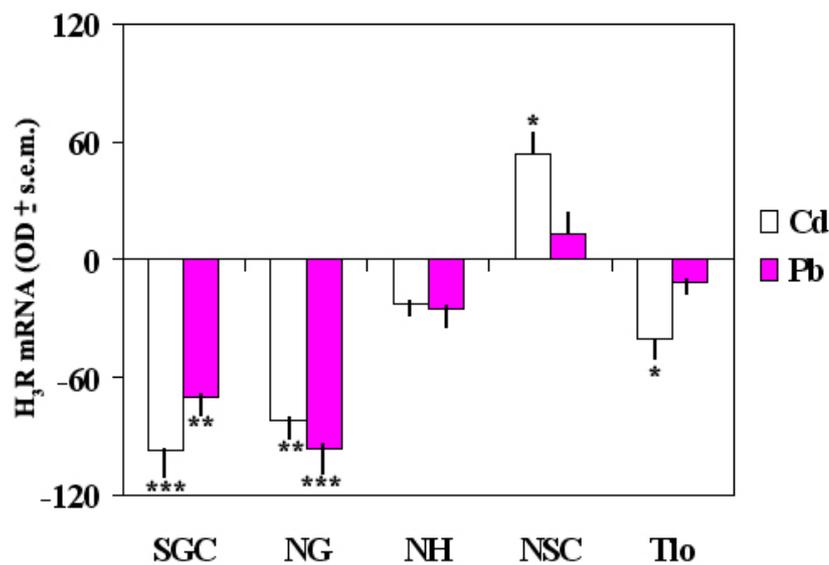


Fig. 44 Variazioni dell'mRNA per H_2R in *Thalassoma pavo* esposto alle concentrazioni MAT dei metalli pesanti. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi ($OD \pm s.e.m.$) calcolati nel gruppo di animali trattati con Cd^{2+} (bianco) e Pb^{2+} (rosa) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In particolare è possibile osservare come Cd^{2+} induca decrementi molto elevati (-108%) in SGC e similmente il Pb^{2+} nella stessa area promuove elevati decrementi (-70%). In NG i decrementi indotti dal trattamento risultano elevati (-80%) e molto elevati (-106%) per effetto di Cd^{2+} e Pb^{2+} rispettivamente. Inoltre il solo Cd^{2+} induce moderate *up* e *downregulations* in NSC (+57%) e Tlo (-48%), rispettivamente.

Per quanto concerne gli effetti indotti dai pesticidi Ed e Atr sull'espressione di H_2R , si assiste complessivamente ad effetti di *upregulations*, moderati in VM (+49%) per effetto di Ed e (+36%) per effetto di Atr, mentre in NRP solo Ed è in grado di indurre elevati incrementi (+62%) dei livelli di trascritto per tale sottotipo recettoriale (fig. 45).

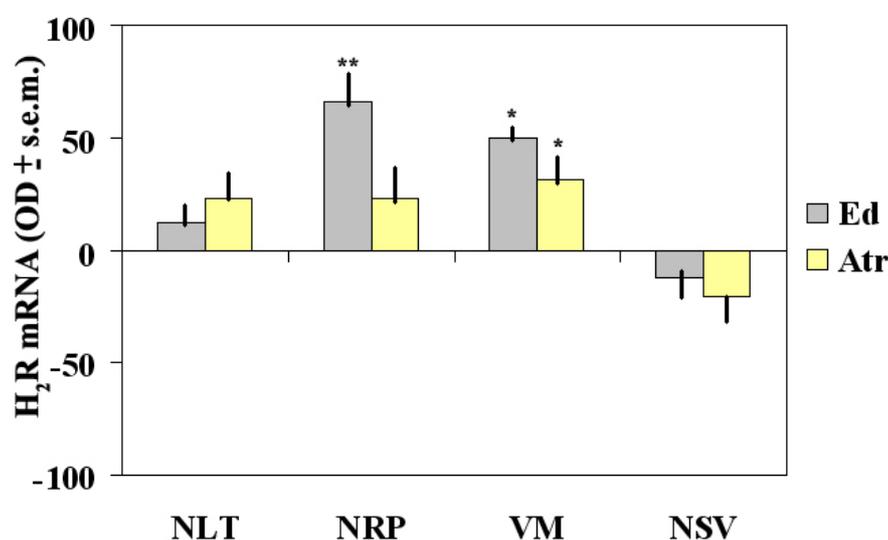


Fig. 45 Variazioni dell'mRNA per H_2R in *Thalassoma pavo* esposto alle concentrazioni MAT dei pesticidi. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi ($OD \pm s.e.m.$) calcolati nel gruppo di animali trattati con Ed (grigio) e Atr (giallo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

La valutazione degli effetti indotti dai contaminanti ambientali sull'espressione di H_3R dimostra che i metalli pesanti inducono prevalentemente effetti di *upregulations*, elevati in SGC per effetto di Cd^{2+} (+64%) e Pb^{2+} (+66%). Quest'ultimo metallo induce inoltre incrementi elevati nell'espressione di H_3R in NDG (+68%), che divengono moderati in Tlo (+33%, fig. 46).

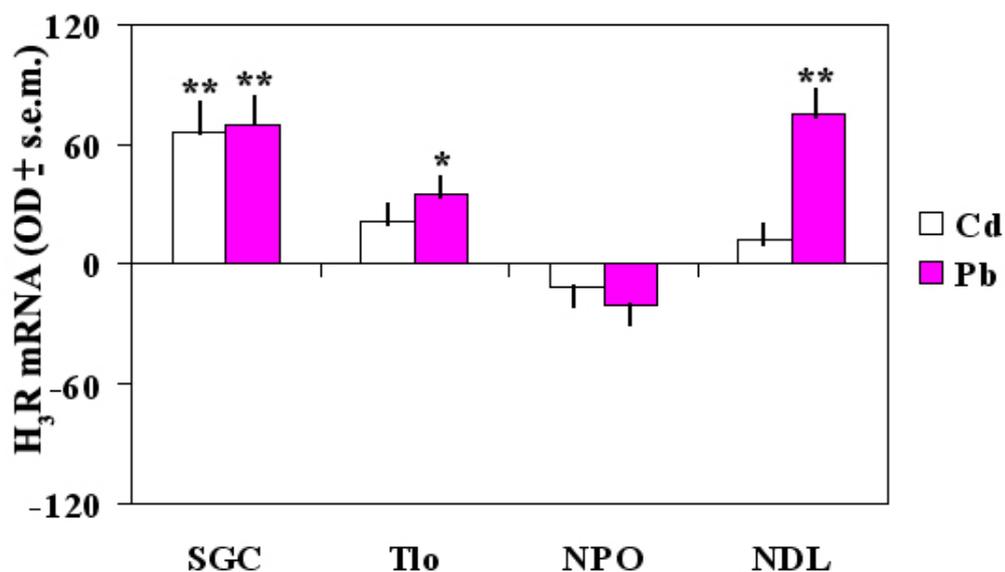


Fig. 46 Variazioni dell'mRNA per H₃R in *Thalassoma pavo* esposto alle concentrazioni MAT dei metalli pesanti. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattati con Cd²⁺ (bianco) e Pb²⁺ (rosa) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Anche i pesticidi sono complessivamente responsabili di un incremento dei livelli di trascritto per H₃R (fig. 47).

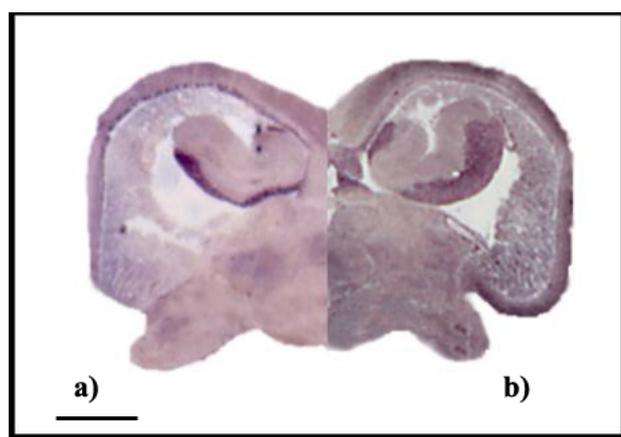


Fig. 47 Espressione dell'mRNA per H₃R in aree rappresentative diencefaliche intermedie di animali ctrl (a) e trattati con la concentrazione MAT di Ed (b). Scale bar: 1.6 mm.

Tali incrementi sono particolarmente significativi in NTL, ove si osservano incrementi molto elevati (+105%) di mRNA per H₃R per effetto di Ed ed elevati (+65%) per effetto di Atr (fig. 48). Inoltre Ed induce elevate upregulations (+63%) in NRP. Eccezione a tale andamento è rappresentato dagli effetti di *downregulations* osservati in VM che sono di natura elevata (-62%) e moderata (-58%) per effetto di Ed e Atr, rispettivamente.

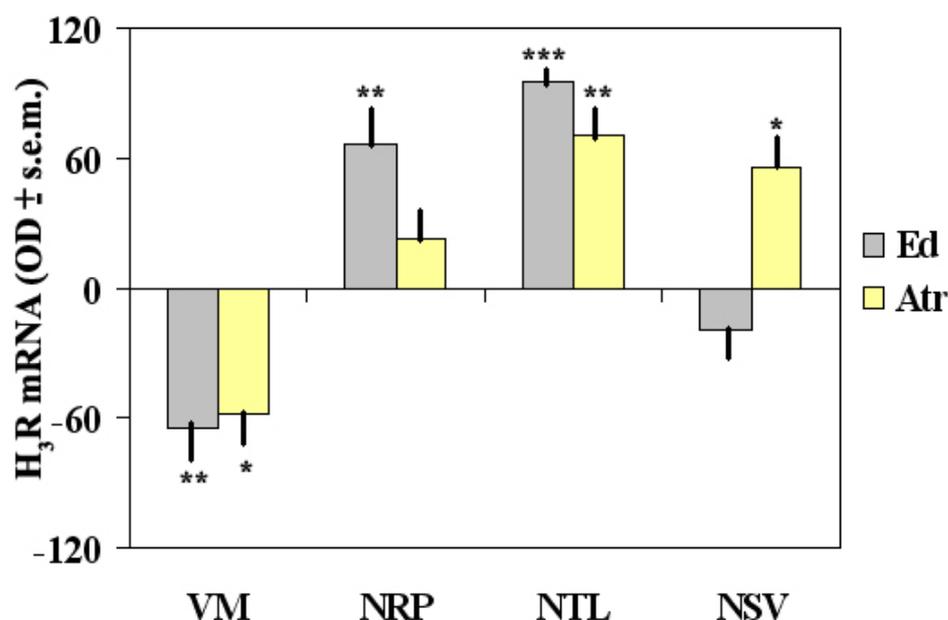


Fig. 48 Variazioni dell'mRNA per H₃R in *Thalassoma pavo* esposto alle concentrazioni MAT dei pesticidi. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattati con Ed (grigio) e Atr (giallo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

3.7 Effetti di Cim e Tio sull'espressione dei recettori istaminergici in presenza dei contaminanti ambientali

I risultati sinora illustrati riportano che l'espressione del sistema istaminergico appare essere strettamente condizionata dall'azione di specifici antagonisti istaminergici, oltre a subire significative variazioni per effetto di contaminanti ambientali di varia natura quali metalli pesanti e pesticidi. Al fine di indagare il ruolo neuroprotettivo esercitato dai sottotipi recettoriali H₂R e H₃R in condizioni di stress, sono stati analizzati gli effetti derivanti dall'azione combinata di trattamenti realizzati con somministrazione i.p. di Cim e Tio in concomitanza all'esposizione agli stressori ambientali.

Il trattamento realizzato mediante somministrazione i.p. di Cim in concomitanza con i quattro stressori analizzati ha indotto variazioni dell'espressione di H₂R sia per effetto dei metalli pesanti che dei pesticidi. Nel primo caso sia Cd²⁺ che Pb²⁺ inducono un moderato decremento dei livelli di espressione per tale sottotipo recettoriale in SGC (-52%, -49%) rispettivamente, ed il solo Cd²⁺ è in grado di indurre moderate *up* and *downregulations* per tale trascritto in NSC (+56%) e Tlo (-51%) rispettivamente (fig. 49).

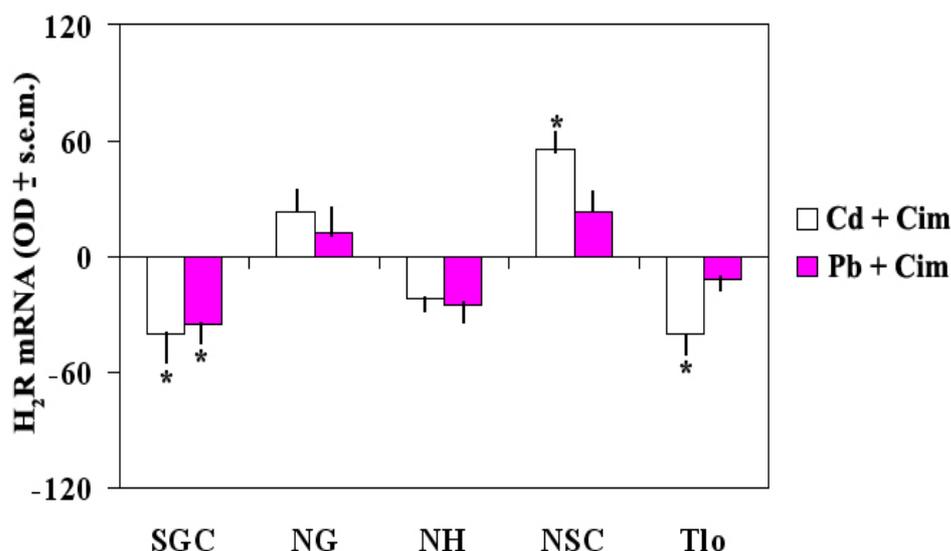


Fig. 49 Variazioni dell'mRNA per H₂R in *Thalassoma pavo* trattato con Cim (200 mg/Kg di peso corporeo) ed esposto alle concentrazioni MAT di Cd²⁺ o Pb²⁺. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattati con Cd+Cim (bianco) e Pb+Cim (rosa) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Per quanto concerne gli effetti provocati dal trattamento combinato di Cim con i due pesticidi, tale trattamento appare responsabile di moderate *upregulations*, che sono similmente indotte da Ed e Atr in NLT (+46%, +49%, rispettivamente) ed in VM (+50%, +48%, rispettivamente). Il solo Ed è inoltre in grado di provocare moderate *up* e *downregulations* dei livelli di tale trascritto in NSV (+48%) e NRP (-47%), rispettivamente (fig. 50). In maniera estremamente interessante, l'analisi neurodegenerativa condotta in tali animali mediante Fluoro-Jade B ha dimostrato che le aree cerebrali di *Thalassoma pavo* che mostrano le principali variazioni dei livelli di espressione di H₂R sono quelle in cui si riscontrano i principali effetti di neurodegenerazione, come dimostrato in particolare nel tetto ottico in cui è presente un evidente incremento del numero di neuroni degenerati per effetto del trattamento combinato Cim + Cd²⁺ (fig. 51).

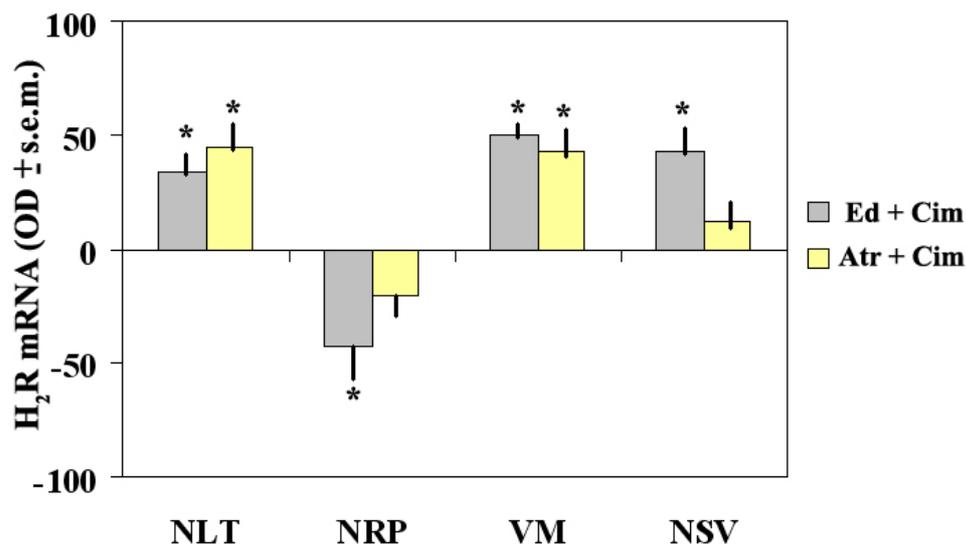


Fig. 50 Variazioni dell'mRNA per H₂R in *Thalassoma pavo* trattato con Cim (200 mg/Kg di peso corporeo) ed esposto alle concentrazioni MAT di Ed o Atr. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattati con Ed+Cim (grigio) e Atr+Cim (giallo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

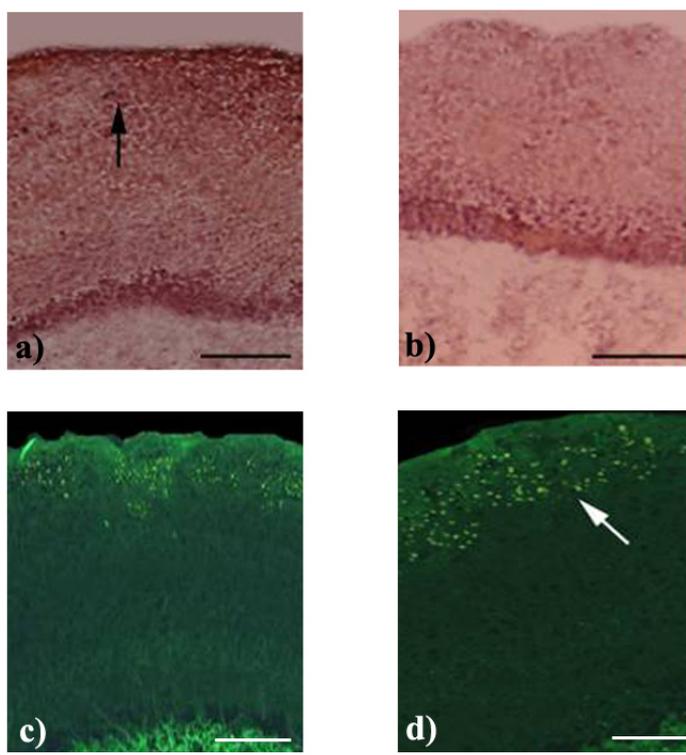


Fig. 51 Espressione dell'mRNA per H₂R (a, b) e colorazione con Fluoro-Jade B (c,d) nel tetto ottico di *Thalassoma pavo* esposto alla concentrazione MAT di Cd²⁺ (11.32 mg/L) e Cim (200 mg/Kg di peso corporeo). La freccia nera indica l'espressione dell'mRNA e la freccia bianca i neuroni degenerati. Scale bar: 80 µm.

La valutazione degli effetti indotti dal trattamento combinato di Tio (10 mg/Kg) con i metalli pesanti dimostra un generale decremento dei livelli di espressione del sottotipo H₃R, in tutte le aree encefaliche di *Thalassoma pavo* considerate. In particolare quando gli animali sono stati esposti a Tio in concomitanza a Cd²⁺ o Pb²⁺, si sono osservate in Dm elevate (-75%) e moderate (-49%) *downregulations*, rispettivamente. In SGC si assistono a moderati decrementi dei livelli di espressione per tale sottotipo sia in presenza nella combinazione Cd²⁺ + Tio (-46%) che Pb²⁺ + Tio (-53%). Infine il solo Pb²⁺, quando somministrato insieme a Tio, è stato in grado di indurre un moderato decremento in NDL (-53%, fig. 52).

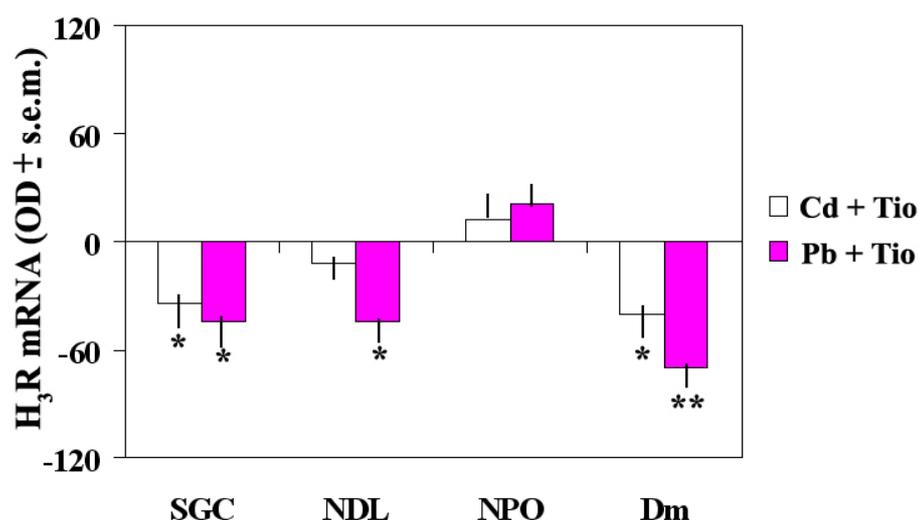


Fig. 52 Variazioni dell'mRNA per H₃R in *Thalassoma pavo* trattato con Tio (10 mg/Kg di peso corporeo) ed esposto alle concentrazioni MAT di Cd²⁺ o Pb²⁺. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattati con Cd+Tio (bianco) e Pb+Tio (rosa) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Per quanto concerne gli effetti provocati dal trattamento combinato di Tio con i due pesticidi, è stato possibile osservare anche in questo caso moderate *downregulations*, che sono similmente indotte da Ed e Atr in VM (-49%, -43%, rispettivamente) ed in NTL (-47%, -53%, rispettivamente). Il solo Ed è inoltre in grado di provocare una moderata *downregulation* dei livelli di tale trascritto in NRP (-42%; fig. 53). Le analisi neurodegenerative condotte in *Thalassoma pavo* esposto a trattamento combinato con Tio e pesticidi dimostrano che nelle aree cerebrali che mostrano prevalentemente un abbassamento dei livelli di espressione di H₃R si osserva una sensibile riduzione degli effetti neurodegenerativi indotti dai singoli metalli, come dimostrato in particolare nelle aree ipotalamiche per effetto del trattamento combinato Tio +Ed (fig. 54).

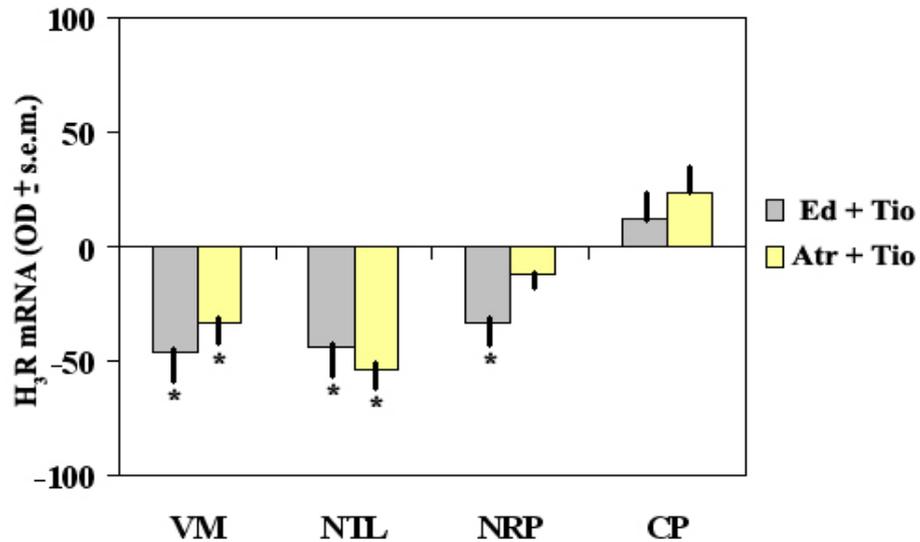


Fig. 53 Variazioni dell'mRNA per H₃R in *Thalassoma pavo* trattato con Tio (10 mg/Kg di peso corporeo) ed esposto alle concentrazioni MAT di Ed o Atr. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattati con Ed+Tio (grigio) e Atr+Tio (giallo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

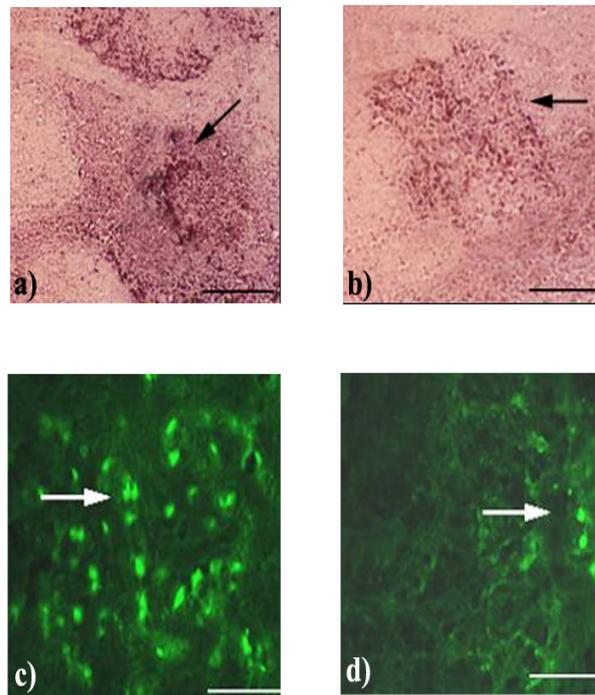


Fig. 54 Espressione dell'mRNA per H₃R (a, b) e colorazione con Fluoro-Jade B (c,d) in NTL di *Thalassoma pavo* esposto alla concentrazione MAT di Ed (1.3 μg/L) e Tio (10 mg/Kg di peso corporeo). La freccia nera indica l'espressione dell'mRNA e la freccia bianca i neuroni degenerati. Scale bar: 60 μm.

3.8 Identificazione molecolare di HSP90 e HSP70

L'utilizzo di *primers* degenerati disegnati sulla base della complementarietà a regioni conservate della sequenza codificante per l'isoforma cerebrale della HSP90 di *Rattus norvegicus*, ha permesso di individuare per la prima volta un frammento nucleotidico di tale proteina in *Thalassoma pavo*. Il prodotto di PCR è stato visualizzato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio (2%) in parallelo al campione di *Rattus norvegicus*, evidenziando la presenza di due bandine di lunghezza paragonabile. In seguito all'estrazione di tale frammento dal gel e purificazione dell'estratto, il campione è stato sequenziato (Genelab-Roma) ed il risultato di tale reazione di sequenza ha fornito un frammento complessivo di 705 bp:

```
>Partial cds HSP90 Thalassoma pavo:
CTGCAGGCTGGAGCTGATATTTCTATGATCGGTCAGTTTGGTGTGGGTTTCTACTCTGCCTACCTGGTGG
CTGAGAAAAGTGGCGGTCATTACCAAACACAATGATGACGAGCAGTACGCCTGGGAATCCTCTGCTGGAGG
CTCCTTCACAGTCAAAGTAGACAGTGTGAACCTATGGGGCGCGGAACAAAGGTGATCTTGCATATGAAA
GAGGACCAGATCGAATACATCGAGGAGAAAAGAGTGAAAGAAATTGTGAAAAAGCACTCTCAGTTCATCG
GATACCCCATCACCTCTTTGTGGAGAAAAGAGCGTGATAAGGAGGTGAGTGACGACGAGGCGGAGGAGGA
AGAGGCTGAGAAGGAGGAGGACGAGGATGAGGAGGACGACGAAAAGATTGCCGATATTGAGGATGTGGGG
GAGGACGACTCCAACGACAACGACCACAACCACAACCAACATCGGGGACAAGTACATCAACAAGAAAA
AGATGAACAAGACCTACCTCATCTGGAACAAGAACCAGATGACATCACAATCGAGGACTACGGCGAATT
CTACATCACCTGACCAACGACTGGGAGGATCACCTGGCTGTGAAGCACTTCTCTGTTGAGGGTCAGCTG
GAGTTCGGTCTGCTCTTTCATCCCTCGCCGTGCACCTTTCGACCTCTTTGAGAACAAGAAAAAGAAGA
ATAAC
```

Al fine di valutare se tale frammento corrispondesse realmente alla proteina HSP90 di *Thalassoma pavo*, tale sequenza parziale è stata allineata con le sequenze note della HSP90 di altri Vertebrati presenti in banca dati mediante la funzione BLASTN di cui si può usufruire *on line* tramite il sito [http:// workbench.sdsc.edu](http://workbench.sdsc.edu). Questo programma di allineamento permette di ottenere il grado di omologia tra le sequenze allineate e di conseguenza valutare l'attendibilità del nostro risultato. Per valutare il grado di identità nucleotidica tra il frammento neo-sequenziato in *Thalassoma pavo* e le altre specie, è stato realizzato un allineamento nucleotidico con (CLUSTALW), che ha mostrato un'identità superiore all'80% con il ratto (fig. 55)

Sequence alignment HSP90

Consensus key (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
R.norvegicus 301 AACTTGGGAACCATTGCTAAGTCTGGTACAAAGGCGTTTCATGGAGGCTCTCCAGGCTGGT
T.pavo -----CTGCAGGCTGGA
                                         ** *
R.norvegicus 361 GCAGACATCTCCATGATTGGGCAGTTTGGTGTGGGCTTCTACTCTGCCTACCTGGTGGCA
T.pavo GCTGATATTTCTATGATCGGTCAAGTTTGGTGTGGGTTTCTACTCTGCCTACCTGGTGGCT
```

```

** ** ** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****
R.norvegicus 421 GAGAAAGTGGTTGTGATCACGAAGCACAACGATGATGAGCAGTATGCCTGGGAGTCTTCT
T.pavo          GAGAAAGTGGCGGTCAATACCAAACACAAATGATGACGAGCAGTACGCCTGGGAATCCTCT
***** ** ** ** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** **
R.norvegicus 481 GCTGGTGGATCCTTCACTGTCCGTGCAGACCACGGTGAGCCCATTGGCCGGGGTACCAAA
T.pavo          GCTGGAGGCTCCTTACAGTCAAAGTAGACAGTGTGAACCTATGGGGCGCGGAACAAAG
***** ** ***** ** * ** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
R.norvegicus 541 GTGATCCTTCACTCAAAGAAGACCAGACAGAGTACTTAGAGGAGAGGAGGGTCAAGGAG
T.pavo          GTGATCTTGCATATGAAAGAGGACCAGATCGAATACATCGAGGAGAAAGAGTAAAGAA
***** * ** * ***** ** ***** ** ** * ***** ** ** ** **
R.norvegicus 601 GTGGTGAAGAAACACTCACAGTTCATAGGCTACCCCATCACCTCTATCTGGAGAAGGAA
T.pavo          ATTGTGAAAAGCACTCTCAGTTCATCGGATACCCCATCACCTCTTGTGGAGAAGAG
* ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** **
R.norvegicus 661 CGCGAGAAGGAGATCAGTGTATGAGGCAGAGGAAGAGAAAGGGGAGAAGGAGGAGGAA
T.pavo          CGTGATAAGGAGGTGAGTGACGACGAGGCGGAGGAGGAAGAGGCTGAGAAGGAGGAGGAC
** ** ***** * ***** ** ***** ** ***** ** * *****
R.norvegicus 721 GATAAGGAGGATGAGGAGAAGCCTAAGATTGAGGATGTGGGATCTGATGAGGAGGATGAC
T.pavo          GAGGATGAGGAGGACGACGAA---AAGATTGCCGATATTGAGGATGTGGGGAGGACGAC
** * ***** ** ** * ***** ** ** * ** * ***** **
R.norvegicus 781 AGCGGCAAGATAAGAAAAGAAAACAAAGAAAGATCAAGGAGAAGTACATTGACCAGGAA
T.pavo          TCCAACGACAACGACCACAACCACAACCACAACATCGGGGACAAGTACATCAACAAGAAA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
R.norvegicus 841 GAGCTGAATAAGACGAAGCCCATCTGGACCAGAAATCCTGATGACATCACTCAAGAGGAA
T.pavo          AAGATGAACAAGACCTACCTCATCTGGAACAAGAACCCAGATGACATCAATCGAGGAC
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
R.norvegicus 901 TATGGTGAATTCTACAAGAGCCTACCAATGACTGGGAAGACCATTGGCAGTCAAGCAC
T.pavo          TACGGCGAATTCTACATCACCTGACCAACGACTGGGAGGATCACCTGGCTGTGAAGCAC
** ** ***** * ** ***** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** **
R.norvegicus 961 TTCTCTGTAGAAGGGCAGTTGGAATTCAGGGCATTGCTCTTCATTCGCCGCGAGCTCCC
T.pavo          TTCTCTGTTGAGGTCAGCTGGAGTTCCTGCTCTGCTCTTCATCCCTCGCCGTGCACCT
***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
R.norvegicus 1021 TTTGACCTCTTTGAGAACAAGAAAGAAGAACAACATCAAATGTATGTCCGTCGTGTG
T.pavo          TTCGACCTCTTTGAGAACAAGAAAAGAAGAATAAC-----
** ***** ** ***** ** ***** **

```

Fig. 55 Allineamento nucleotidico della sequenza parziale di HSP90 in *Thalassoma pavo* con *Rattus norvegicus*. Gli asterischi in azzurro indicano l'identità nucleotidica.

La funzione SIXFRAME disponibile sullo stesso sito *online* <http://workbench.sdsc.edu> ha consentito di ottenere la traduzione aminoacidica della sequenza nucleotidica, fornendo tutte le sei traduzioni possibili e tra queste è stata scelta quella che non presenta codoni di STOP e presenta elevata similarità con le altre sequenze disponibili in banca dati.

(b) <i>Thalassoma pavo</i> HSP90	Similarità	Identità
Dicentrarchus labrax	90%	81%
Oncorhynchus mykiss	88%	78%
Salmo salar	87%	76%
Rattus norvegicus	76%	68%

Fig. 56 Allineamento tra la sequenza aminoacidica di HSP90 in *Thalassoma pavo* con le altre specie (a): gli asterischi in azzurro indicano un residuo aminoacidico completamente conservato, i due punti in verde la conservazione di gruppi forti, mentre il singolo punto blu la conservazione di gruppi deboli. (b) Tabella riassuntiva delle percentuali di identità e similarità calcolate tra la sequenza proteica di *Thalassoma pavo* e quella di tutte le altre specie prese in esame.

Come è possibile osservare dagli allineamenti aminoacidi, la sequenza parziale di HSP90 in *Thalassoma pavo* possiede 47 sostituzioni di cui 31 garantiscono la conservazione della funzione, mentre 12 determinano una perdita di essa. In particolare è interessante sottolineare come *Thalassoma* appare mantenere caratteristiche che lo rendono molto simile agli altri Teleostei considerati, in quanto presenta in posizione 168 e 196 l'aminoacido K, che nel ratto è sostituito con R. Inoltre in posizione 175 i Pesci presentano I che nel ratto viene sostituita con M.

Lo studio della sequenza di HSP90 di *Thalassoma pavo* è proceduto con la predizione della struttura secondaria al fine di valutare se la stessa fosse mantenuta rispetto a quella nota per le altre specie. Inserendo la sequenza aminoacidica nel programma GOR3 e presente nel sito http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gib.pl si ottiene il seguente risultato (fig. 57):

Query: Thalassoma HSP 90

```

          10          20          30          40          50          60          70
          |          |          |          |          |          |          |
LQAGADISMIGQFGVGFYSAYLVAEKVAVITKHNDDEQYAWESSAGGSFTVKVDSAEPMGRGTKVILHMK
hhhcchheeeeeeeeeehhhhhhhhhhhhhhhcccchheeeeehccccceeeccccccccchhehhhh

EDQIEYIEEKRVKEIVKKSQFIGYPITLVEKERDKEVSDDEAEKEEKEDEDEDEDEDEDEKIADIEDVG
hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhc

EDRSNDNDHNHNHNIGDKYINKKKMNKTYLIWKNPDDITIEDYGEFYITLTNDWEDHLAVKHFVSEVQL
ccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh

EFRALLFIPRRAPFDLDFENKKKNN
hhhhhhhhhhchchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhc

```

```

Sequence length : 235
GOR3 :
  Alpha helix      (Hh) : 144 is 61.28%
  Extended strand (Ee) : 32 is 13.62%
  Random coil     (Cc) : 59 is 25.11%

```

Fig. 57 Struttura secondaria di HSP90 in *Thalassoma pavo*.

Per quanto concerne l'identificazione molecolare di HSP70, anche in questo caso, l'utilizzo di *primers* degenerati disegnati sulla base della complementarietà a regioni conservate della sequenza codificante per HSP70 di *Rattus norvegicus*, ha permesso di individuare per la prima volta un frammento nucleotidico di tale proteina in *Thalassoma pavo*. Il prodotto di PCR è stato visualizzato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio (2%) in parallelo al campione di *Rattus norvegicus*, evidenziando la presenza di due bandine di lunghezza paragonabile. In seguito all'estrazione di tale frammento dal gel e purificazione dell'estratto, il campione è stato sequenziato (Genelab-Roma) ed il risultato di tale reazione di sequenza ha fornito un frammento complessivo di 373 bp:

```

> partial cds HSP70 Thalassoma pavo
ACAACGTGGTGGTCTAATCGTCAACGCTGGGCGTATGATCGCGGGTCTGAACGTGCTGCGGATCATCAACGAGCCACTTTT
AAAAGCCATCGCCTACGGGCTGGACCGGACCGGCTGCGCAAGCCCCGAGCGCAACGTGCCCTTCTTCTACCTGGGGGGCGGC
ACGTTGACTTGTCCATCCTGACGATCGACAACGGCTTCTTCAAGGTGAAGGCCACGGCGGGCGACACGCACCTGGGCGGGG
AGGACTTCGACAACCGGCTGGTGAGCCACTTCGTGGAGGAGTTCAAGAGGAAGCACAAGAAGGACATCAGCCAGAACAAGCG
CGCGGTGGGGCGCTGCGCACGGTGTGCGAGAGGGCTAACAGGACG

```

Al fine di valutare se tale frammento corrispondesse realmente alla proteina HSP70 di *Thalassoma pavo*, tale sequenza parziale è stata allineata con le sequenze note della HSP70 di altri Vertebrati presenti in banca dati mediante la funzione BLASTN di cui si può

usufruire *on line* tramite il sito [http:// workbench.sdsc.edu](http://workbench.sdsc.edu). Per valutare il grado di identità nucleotidica tra il frammento neo-sequenziato in *Thalassoma pavo* e le altre specie, è stato realizzato un allineamento nucleotidico con (CLUSTALW), che ha mostrato un'identità superiore all'85% con il ratto (fig. 58).

Sequence alignment HSP70

Consensus key (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue
 - no consensus

```

hsp70_thalassoma -----ACAACGTGGTGGTCCATAATCGTCAAC
hsp_70_ratto      CAGAGCGCAGTCATCACTGTTCTGCTATTTCAACGACTCGCAGCGCCAGGCCACCAAG
                      ** * * * * * * * * * *

hsp70_thalassoma GCTGGGCGTATGATCGCGGGTCTGAACGTGCTGCGGATCATCAACGAGCCACTTTTAAAA
hsp_70_ratto      GATGCGGGCACCATCACCGGTCTCAATGTATTGCGTATCATCAACGAACCCACAGCAGCG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

hsp70_thalassoma GCCATCGCCTACGGGCTGGACCGGACCGGCTGCGCAAGCCCCGAGCGCAACGTGCCCTTC
hsp_70_ratto      GCCATCGCTTATGGCCTGGATAAGAAGGGCTGCGCGGGCGGCGAGAAGAACGTGCTCATC
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

hsp70_thalassoma TTCTACCTGGGGGGCGGCACGTTGACTTGTCCATCCTGACGATCGACAACGGCTTCTTC
hsp_70_ratto      TTTGACCTGGGCGGGGGCACCTTTCGATGTGTCCATCCTCACCATCGAGGATGGCATCTTC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

hsp70_thalassoma AAGGTGAAGGCCACGGCGGGCGACACGCACCTGGGCGGGGAGGACTTCGACAACCGGCTG
hsp_70_ratto      GAGGTCAAGTCCACGGCCGGCGACACCCACCTGGGTGGCGAAGACTTCGACAACCGTATG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

hsp70_thalassoma GTGAGCCACTTCGTGGAGGAGTTCAAGAGGAAGCACAAGAAGGACATCAGCCAGAACAAG
hsp_70_ratto      GTCAGCCACCTGGCGGAGGAGTTCAAGCGCAAACACAAGAAGGACATTGGGCCCAACAAG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

hsp70_thalassoma CGCGCGGTGGGGCGGCTGCGCACGGTGTGCGAGAGGGCTAACAGGACG-----
hsp_70_ratto      CGCGCTGTGCGCCGGCTGCGCACCGCTGCGAGCGCGCTAAGCGCACCTGAGCTCGTCC
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
  
```

Fig. 58 Allineamento nucleotidico della sequenza parziale di HSP70 in *Thalassoma pavo* con *Rattus norvegicus*. Gli asterischi in azzurro indicano l'identità nucleotidica.

La funzione SIXFRAME disponibile sullo stesso sito *online* <http://workbench.sdsc.edu> ha consentito di ottenere la traduzione aminoacidica della sequenza nucleotidica, fornendo tutte le sei traduzioni possibili e tra queste è stata scelta quella che non presenta codoni di STOP e presenta elevata similarità con le altre sequenze disponibili in banca dati.

```

> Protein HSP70 Thalassoma pavo
AIAYGLDRTGKPERNVPPFFYLGGGTFDLSILTIDNGFFKVKATAGDTHLGGEDFDNRLVSHFVEEFKRKHKKDISQNKRAVG
R
  
```

Lo stesso programma ha consentito, inoltre, di ottenere l'allineamento aminoacidico tra *Thalassoma pavo* e le altre specie, ricavando in tal modo il grado di identità e similarità tra le sequenze aminoacidiche considerate mediante il software BIOEDIT *Sequenze Alineament Editor* (fig. 59).

a) Sequence alignment HSP70

Consensus key

- * - single, fully conserved residue
- : - conservation of strong groups
- . - conservation of weak groups
- no consensus

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      185      195      205      215      225      235
Oreochromi AAIAYGLDKG KSGERNVLIF DLGGGTFDVS ILTIEDGIFE VKSTAGDTHL GGEDFDNRMV
Danio      AAHPYGLDKG KSSERNVLIF DLGGGTFDVS ILTIEDGIFE VKATAGDTHL GGEDFDNRMV
Oncorhynch AAIAYGMDKG MSRERNVLIF DLGGGTFDVS ILTIEDGIFE VKATAGDTHL GGEDFDNRLV
Trota      AAIAYGMDKG MSRERNVLIF DLGGGTFDVS ILTIEDGIFE VKATAGDTHL GGEDFDNRLV
Ciprino    AAIAYGLDKK VGAERNVLIF DLGGGTFDVS ILTIEDGIFE VKSTAGDTHL GGEDFDNRMV
Thalasso   -AIAYGLDRT GKPERNVPPF YLGGGTFDLS ILTIIDNGFFK VKATAGDTHL GGEDFDNRLV
ratto      AAIAYGLDRT GKGERNVLIF DLGGGTFDVS ILTIIDGIFE VKATAGDTHL GGEDFDNRLV
          *****:*. . . *****:.* :*****:* *****:.*.* ***** *****
          ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
          245      255      265      275      285      295
Oreochromi NHFVEEFKRK HKKDISQNKR ALRRLRTAFE RAKRTLSSSS QASIEIDSLF EGIDFYTSIT
Danio      NHFVEEFKRK HKKDISQNKR ALRRLRTACE RAKRTLSSSS QASIEIDSLY EGIDFYTSIT
Oncorhynch SHFVEEFKRK HKKDISQNKR ALRRLRTACE RAKRTLSSSS QASIEIDSLF EGIDFYTSIT
Trota      SHFVEEFKRK HKKDISQNKR ALRRLRTACE RAKRTLSSSS QASIEIDSLF EGIDFYTSIT
Ciprino    NHFITEFKRK HKKDISDNKR AVRRLRTACE RAKRTLSSST QASIEIDSLY EGIDFYTSIT
Thalasso   SHFVEEFKRK HKKDISQNKR AVGR----- -----
ratto      SHFVEEFKRK HKKDISQNKR AVRRLRTACE RAKRTLSSST QASLEIDSLF EGIDFYTSIT
          .**.:***** ***** ***** **.*

```

(b) <i>Thalassoma pavo</i> HSP70	Similarità	Identità
Cyprinus carpio	88%	74%
Oncorhynchus mykiss	90%	80%
Danio rerio	90%	77%
Rattus norvegicus	86%	70%

Fig. 59 Allineamento tra la sequenza aminoacidica di HSP70 in *Thalassoma pavo* con le altre specie (a): gli asterischi in azzurro indicano un residuo aminoacidico completamente conservato, i due punti in verde la conservazione di gruppi forti, mentre il singolo punto blu la conservazione di gruppi deboli. (b) Tabella riassuntiva delle percentuali di identità e similarità calcolate tra la sequenza proteica di *Thalassoma pavo* e quella di tutte le altre specie prese in esame.

Lo studio della sequenza di HSP70 di *Thalassoma pavo* è proceduto con la predizione della struttura secondaria al fine di valutare se la stessa fosse mantenuta rispetto a quella nota per le altre specie. Inserendo la sequenza aminoacidica nel programma GOR3 e presente nel sito http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gib.pl si ottiene un risultato che conferma anche per questa proteina la conservazione di domini secondari (fig. 60).

Query: HSP70 *Thalassoma pavo*

AIAYGLDRTGKPERNVPPFFYLGGGTFDLSILITIDNGFFKVKATAGDTHLGGEDFDNRLVSHFVEEFKRKHKKDISQNKRAVGR
hehhccccccccccccccceeeeccccceeeeeeehhhhhhhhhhccchecccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhece

Sequence length : 83
 GOR3 :
 Alpha helix (Hh) : 41 is 49.40%
 Extended strand (Ee) : 16 is 19.28%
 Random coil (Cc) : 26 is 31.33%

Fig. 60 Struttura secondaria di HSP90 in *Thalassoma pavo*.

3.9 Effetti degli stressori ambientali sull'espressione di HSP90 e HSP70

Le analisi dei livelli di espressione della HSP90 e HSP70, condotte in animali sottoposti a trattamento con i quattro stressori ambientali presi in esame in questo lavoro, dimostrano una considerevole *upregulation* dell'mRNA per tali proteine in tutti i gruppi sperimentali considerati. In particolare, da una prima analisi qualitativa è possibile osservare un segnale di ibridazione della HSP90 più evidente negli animali sottoposti agli stressori ambientali rispetto al gruppo dei controlli (fig. 61).

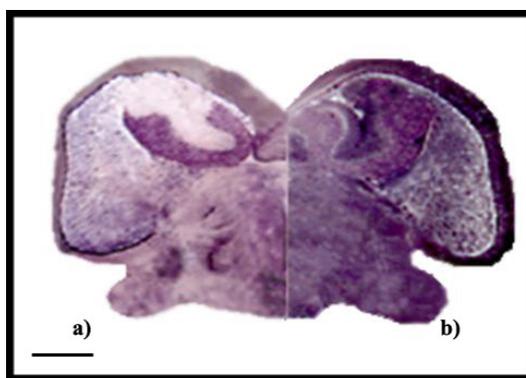


Fig. 61 Espressione dell'mRNA per HSP90 in aree rappresentative diencefaliche intermedie di animali ctrl (a) e trattati con la concentrazione MAT di Cd (b). Scale bar: 1.6 mm.

L'esposizione ai metalli pesanti Cd^{2+} e Pb^{2+} ha indotto un generale incremento dei livelli di espressione della HSP90, in particolare in SGC si assiste ad elevate *upregulations* sia per effetto di Cd^{2+} (+62%) che di Pb^{2+} (+65%). In altre aree tali incrementi sono tutti di natura moderata, come riportato in NDL (Cd^{2+} : +38%) e (Pb^{2+} : +43%) ed in alcune regioni mesencefaliche quali Tlo (Cd^{2+} : +39%) e (Pb^{2+} : +40%). Infine il solo Cd^{2+} induce moderati incrementi dei livelli trascrizionali per tale proteina in NSC (+55%; fig. 62).

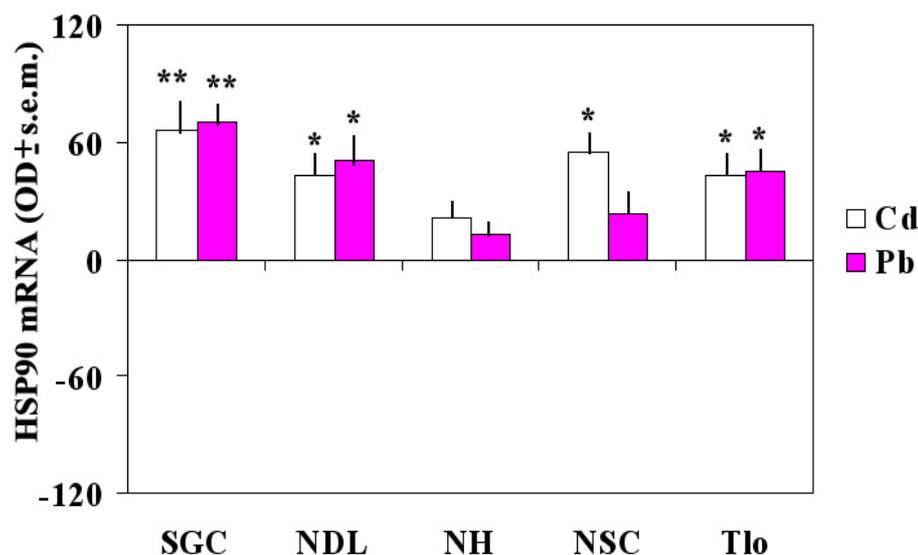


Fig. 62 Variazioni dell'mRNA per HSP90 in *Thalassoma pavo* esposto alle concentrazioni MAT dei metalli pesanti. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattati con Cd^{2+} (bianco) e Pb^{2+} (rosa) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Per quanto concerne le variazioni di espressione indotte dai pesticidi su tale proteina, in maniera paragonabile agli effetti osservati in presenza dei metalli pesanti, si assiste ad una complessiva *upregulation* in tutte le aree considerate, soprattutto a livello delle aree ipotalamiche. In particolare è possibile osservare in NLT incrementi elevati (+70%) per effetto di Ed e moderati (+48%) per effetto di Atr. Ambo i pesticidi determinano anche moderate *upregulations* in NRP (Ed: +49%) e (Atr: +52%), mentre la sola Atr induce un moderato incremento dei livelli trascrizionali di HSP90 in VM (+48%; fig. 63).

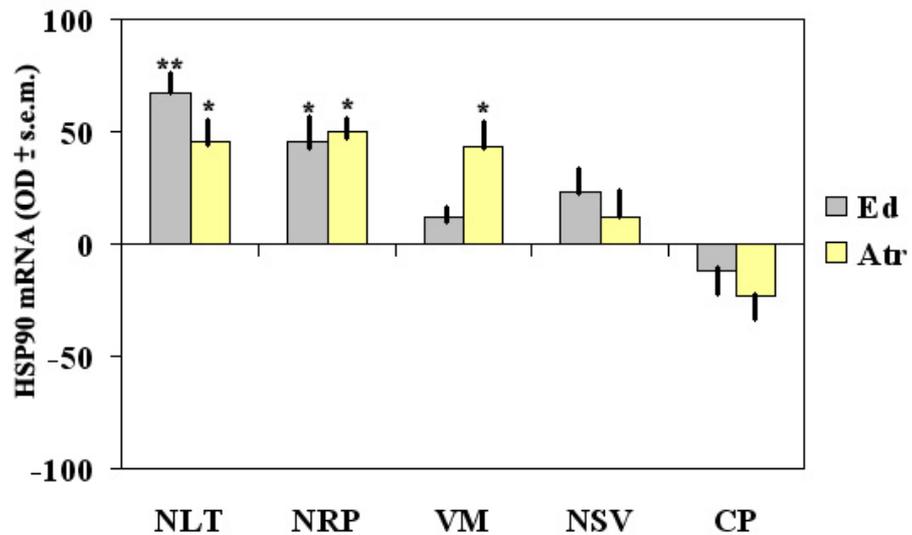


Fig. 63 Variazioni dell'mRNA per HSP90 in *Thalassoma pavo* esposto alle concentrazioni MAT dei pesticidi. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi ($OD \pm s.e.m.$) calcolati nel gruppo di animali trattati con Ed (grigio) e Atr (giallo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Il trattamento con contaminanti ambientali alle concentrazioni MAT induce un sensibile incremento di espressione anche per l'altro *chaperone* HSP70, come possibile osservare da una prima analisi qualitativa dell'intensità di segnale di ibridazione in animali esposti a stressori ambientali rispetto agli animali controllo (fig. 64).

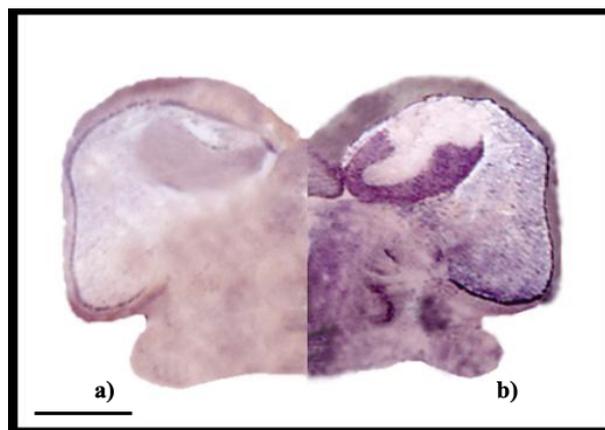


Fig. 64 Espressione dell'mRNA per HSP70 in aree rappresentative diencefaliche intermedie di animali ctrl (a) e trattati con la concentrazione MAT di Cd (b). Scale bar: 1.6 mm.

I metalli pesanti inducono evidenti effetti di *upregulations* di tale proteina, che si traducono in incrementi molto elevati (+105%) di tale trascritto in SGC per effetto di Pb^{2+} , che si mantengono elevati (+65%) nella stessa area per effetto di Cd^{2+} . Un andamento paragonabile si osserva anche in Tlo, con un innalzamento molto elevato (+98%) dei livelli di espressione della HSP70 per effetto del Pb^{2+} ed elevato (+60%) in seguito ad esposizione all'altro metallo. Anche nelle aree ipotalamiche si assiste a variazioni dei livelli di espressione di tale trascritto, come in NSC con *upregulations* elevate (+70%) e moderate (+50%) per effetto di Pb^{2+} e Cd^{2+} , rispettivamente. Infine Cd^{2+} induce moderati incrementi (+45%) dei livelli di espressione della HSP70 in NH e Pb^{2+} produce medesimi effetti in NG (+50%; fig. 65).

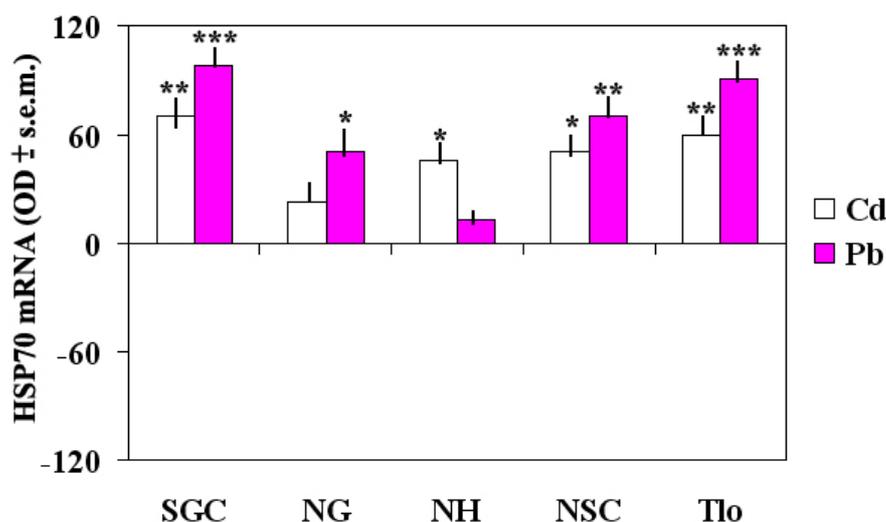


Fig. 65 Variazioni dell'mRNA per HSP70 in *Thalassoma pavo* esposto alle concentrazioni MAT dei metalli pesanti. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattati con Cd^{2+} (bianco) e Pb^{2+} (rosa) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Per quanto concerne le variazioni di espressione genica indotte dai pesticidi, anche in questo caso è possibile osservare un generale effetto di *upregulations*, che si traducono in elevati incrementi dei livelli trascrizionali in VM per effetto di Ed (+68%) e Atr (+74%). Entrambi i pesticidi inducono moderati incrementi dell'mRNA per HSP70 anche in NLT (Ed: +49%; Atr: +45%), mentre il solo Ed induce moderate *upregulations* in NSV (+43%; fig. 66).

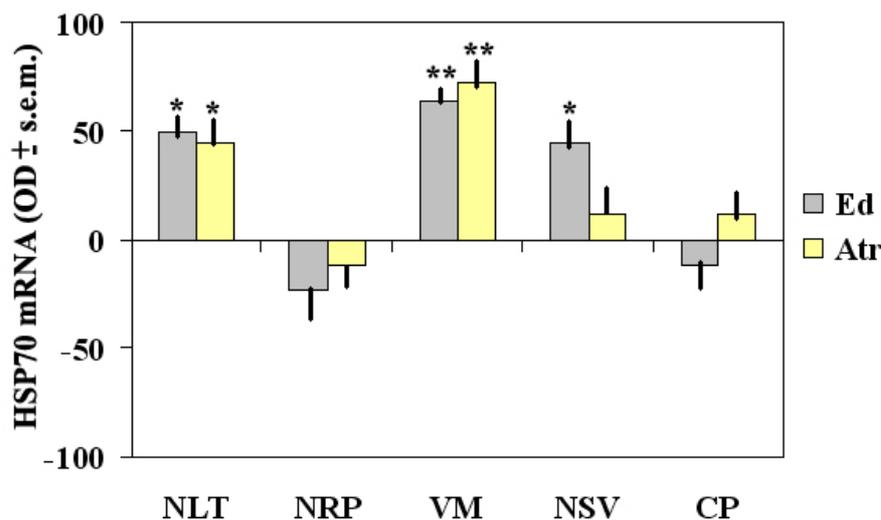


Fig. 66 Variazioni dell'mRNA per HSP70 in *Thalassoma pavo* esposto alle concentrazioni MAT dei pesticidi. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi ($OD \pm s.e.m.$) calcolati nel gruppo di animali trattati con Ed (grigio) e Atr (giallo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.10 Effetti di Cim e Tio sull'espressione delle HSPs in presenza dei contaminanti ambientali

Al fine di verificare se esista un'interazione funzionale tra il sistema istaminergico e le HSPs, è stato valutato il pattern di espressione di queste proteine in animali sottoposti con un trattamento combinato con somministrazione i.p. di Cim e Tio in concomitanza all'esposizione agli stressori ambientali. In presenza di Cim, associata sia ai metalli pesanti che ai pesticidi, è possibile osservare che l'espressione della HSP90 subisce degli effetti contrastanti, come dimostrato dalle *up* and *downregulations* indotte per effetto dei metalli pesanti in SGC e NSC, rispettivamente. In particolare nella prima area Cd^{2+} promuove incrementi elevati di tale trascritto (+48%), che diventano molto elevati in presenza di Pb^{2+} (+75%). Nell'area ipotalamica in NSC entrambi i metalli inducono moderate *downregulations* (Cd^{2+} : -40%; Pb^{2+} : -45%). Per quanto concerne il trattamento combinato Cim *plus* pesticidi, anche in questo caso si assiste a moderate *up* and *downregulations*, provocate però esclusivamente da Atr in VM (+50%) e NRP (-47%), rispettivamente (fig. 67).

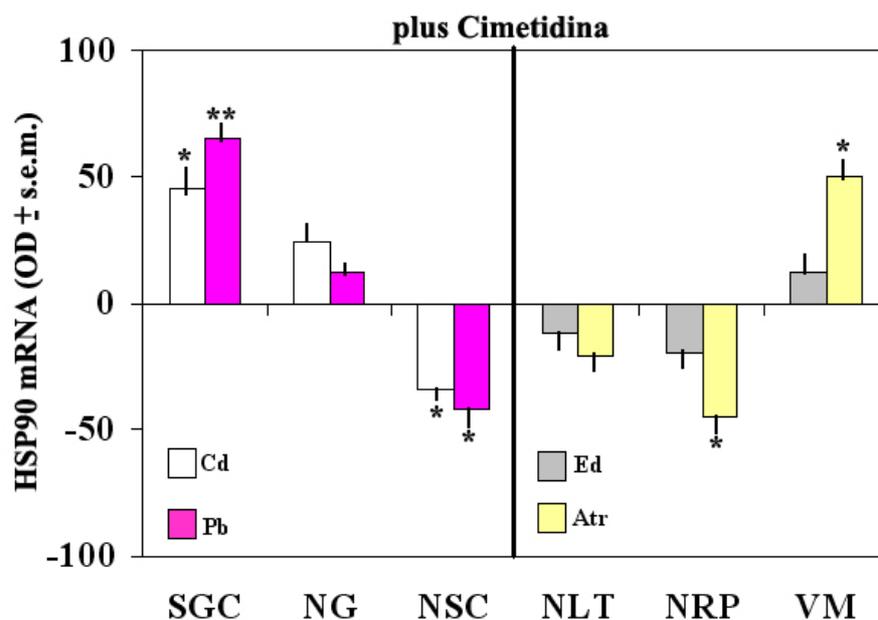


Fig. 67 Variazioni dell'mRNA per HSP90 in *Thalassoma pavo* trattato con Cim (200 mg/Kg di peso corporeo) ed esposto alle concentrazioni MAT di Cd²⁺, Pb²⁺, Ed e Atr. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattati con Cd+Cim (bianco), Pb+Cim (rosa); Ed+Cim (grigio) e Atr+Cim (giallo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Anche in seguito al trattamento combinato realizzato con la Tio ed i contaminanti ambientali, è possibile osservare un pattern eterogeneo di espressione della HSP90 caratterizzato da *up* e *downregulations*. In particolare entrambi i metalli, in presenza di Tio inducono elevati incrementi dei livelli di espressione di HSP90 in Dm (Cd²⁺:+74%; Pb²⁺: +80%), e moderati in SGC (Cd²⁺:+48%; Pb²⁺: +44%). Effetti di moderate *downregulations* sono invece caratteristici di Tlo, sia in presenza di Cd²⁺ (-48%) che di Pb²⁺ (-52%; fig. 68).

Le analisi neurodegenerative condotte in *Thalassoma pavo* esposto a trattamento combinato con Tio e metalli dimostrano che nelle aree cerebrali che mostrano prevalentemente un innalzamento dei livelli di espressione di HSP90 si osserva anche una sensibile riduzione degli effetti neurodegenerativi indotti dai singoli metalli, come dimostrato in particolare in aree telencefaliche per effetto del trattamento combinato Tio +Pb²⁺ (fig. 69).

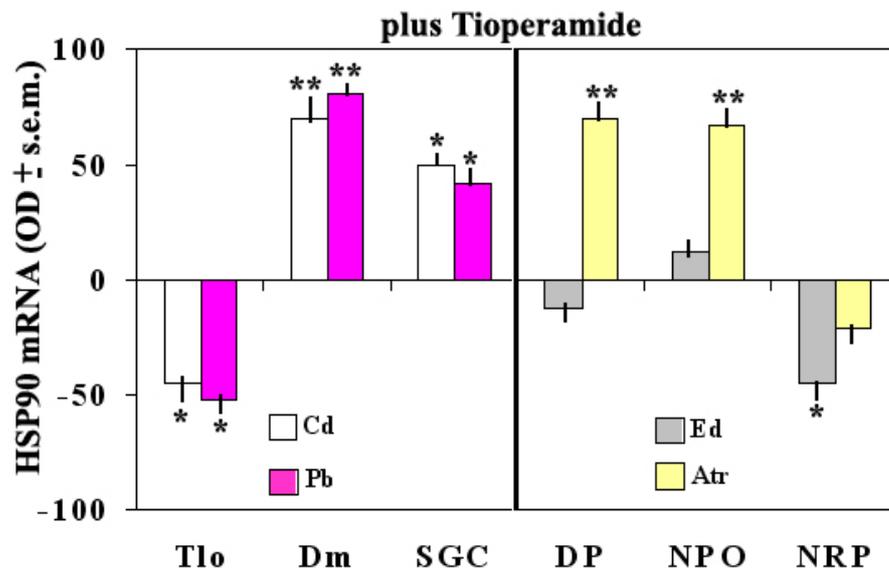


Fig. 68 Variazioni dell'mRNA per HSP90 in *Thalassoma pavo* trattato con Tio (10 mg/Kg di peso corporeo) ed esposto alle concentrazioni MAT di Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ed e Atr. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi ($\text{OD} \pm \text{s.e.m.}$) calcolati nel gruppo di animali trattati con Cd+Tio (bianco), Pb+Tio (rosa); Ed+Tio (grigio) e Atr+Tio (giallo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

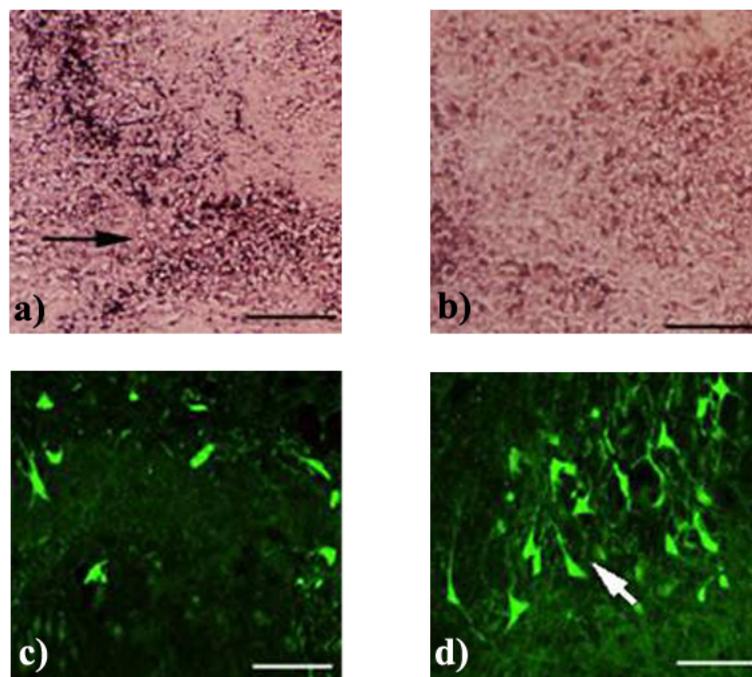


Fig. 69 Espressione dell'mRNA per HSP90 (a, b) e colorazione con Fluoro-Jade B (c,d) in Dm di *Thalassoma pavo* esposto alla concentrazione MAT di Pb (1.4 mg/L) e Tio (10 mg/Kg di peso corporeo). La freccia nera indica l'espressione dell'mRNA e la freccia bianca i neuroni degenerati. Scale bar: 60 μm .

Nel caso del trattamento combinato realizzato mediante somministrazione di Tio in concomitanza con l'esposizione ai pesticidi, è stato possibile evidenziare che in presenza dell'antagonista istaminergico Atr è in grado di promuovere elevate *upregulations* in DP (+78%) e NPO (+76%). Tale effetto è in contrasto con le moderate *downregulations* indotte invece da Ed in presenza di Tio in HTH posteriore (NRP: -50%; fig. 68).

Le variazioni di espressione riportate invece per HSP70, in relazione ai trattamenti realizzati con la concomitante esposizione ad antagonisti istaminergici e contaminanti ambientali, risultano in un generale incremento dei livelli trascrizionali. In particolare, in presenza di Cim, si assiste ad elevate (+64%) e molto elevate (+104%) *upregulations* di tale trascritto in SGC in presenza di Cd²⁺ e Pb²⁺, rispettivamente. Analogo effetto è riportato anche per Tlo (Cd²⁺: +58%; Pb²⁺: +95%). Il solo Pb²⁺ induce inoltre elevati incrementi dei livelli di espressione di HSP70 in NSC (+63%; fig. 70).

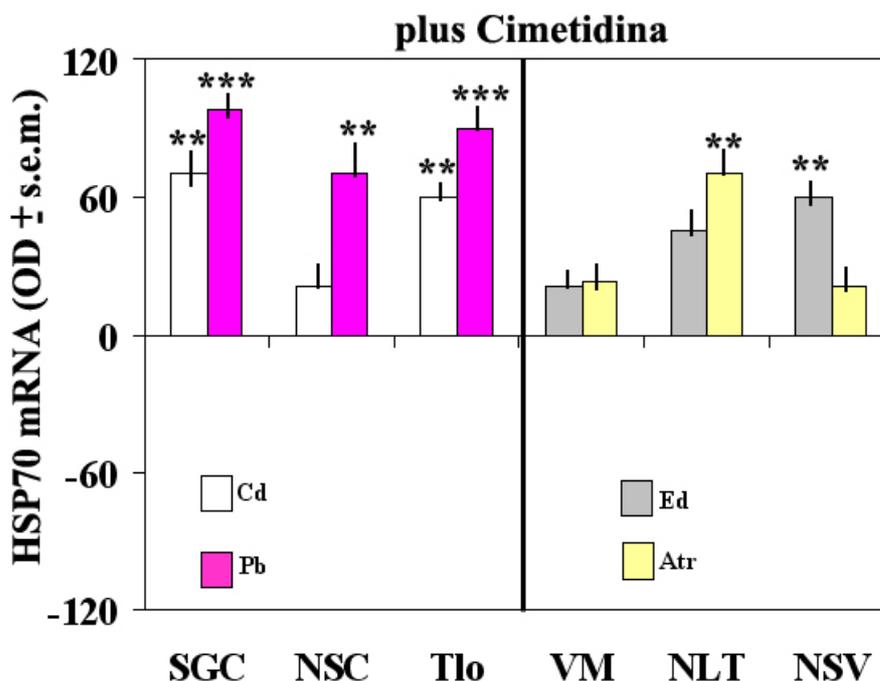


Fig. 70 Variazioni dell'mRNA per HSP70 in *Thalassoma pavo* trattato con Cim (200 mg/Kg di peso corporeo) ed esposto alle concentrazioni MAT di Cd²⁺, Pb²⁺, Ed e Atr. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattati con Cd+Cim (bianco), Pb+Cim (rosa); Ed+Cim (grigio) e Atr+Cim (giallo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Gli effetti indotti dai pesticidi risultano di minore entità, fatta eccezione dagli elevati incrementi di mRNA per HSP70 indotti da Ed e Atr rispettivamente in NSV (+60%) e NLT (+70%), rispettivamente (fig. 70).

Anche la somministrazione dell'antagonista Tio in concomitanza con i contaminanti ambientali produce un generale incremento dei livelli trascrizionali della HSP70. In particolare è possibile evidenziare in Dm *upregulations* elevate (+51%) e molto elevate (+95%) indotte da Cd²⁺ e Pb²⁺, rispettivamente. Il solo Pb²⁺ produce inoltre moderati incrementi dei livelli del trascritto in Tlo (+49%) e SGC (+42%). Per quanto concerne l'effetto dei pesticidi, l'aggiunta del trattamento con Tio induce effetti significativi solo nel caso di Atr, con moderate *upregulations* in NPO (+48%) e NRP (+40%; fig. 71).

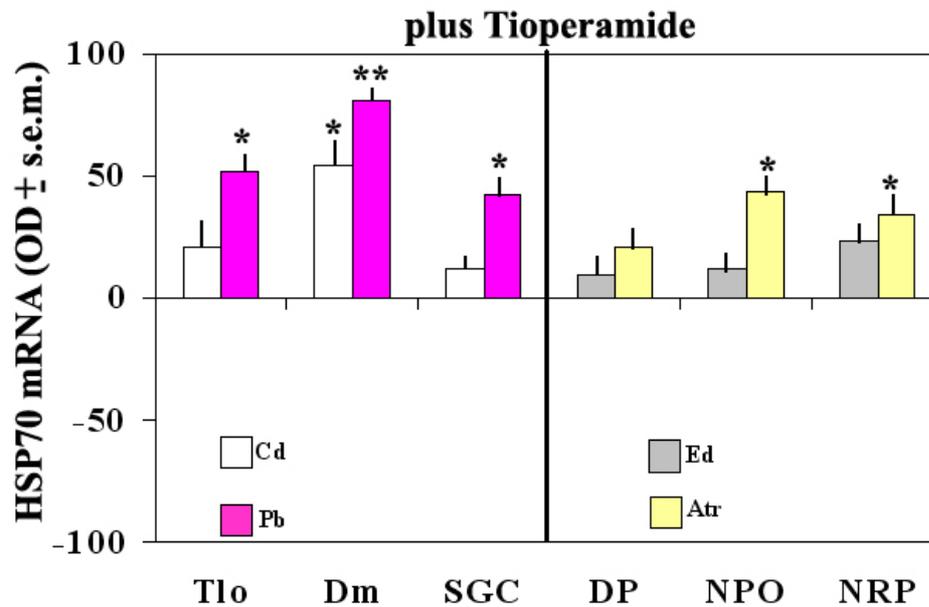


Fig. 71 Variazioni dell'mRNA per HSP70 in *Thalassoma pavo* trattato con Tio (10 mg/Kg di peso corporeo) ed esposto alle concentrazioni MAT di Cd²⁺, Pb²⁺, Ed e Atr. Le letture all'analizzatore sono state ripetute 5 volte su ogni nucleo o area encefalica ed i dati sono riportati come rapporto % dei valori medi (OD ± s.e.m.) calcolati nel gruppo di animali trattati con Cd+Tio (bianco), Pb+Tio (rosa); Ed+Tio (grigio) e Atr+Tio (giallo) rispetto agli animali controllo. Analisi Statistica: ANOVA one-way e Neuman-Keul's test, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Le analisi neurodegenerative condotte in *Thalassoma pavo* esposto a trattamento combinato con Tio e pesticidi hanno messo in evidenza che l'innalzamento dei livelli di espressione di HSP70 promosso da tali contaminanti si associa ad una consistente riduzione degli effetti

neurodegenerativi indotti dai singoli stressori, come dimostrato in particolare in aree diencefaliche per effetto del trattamento combinato Tio +Atr (fig. 72).

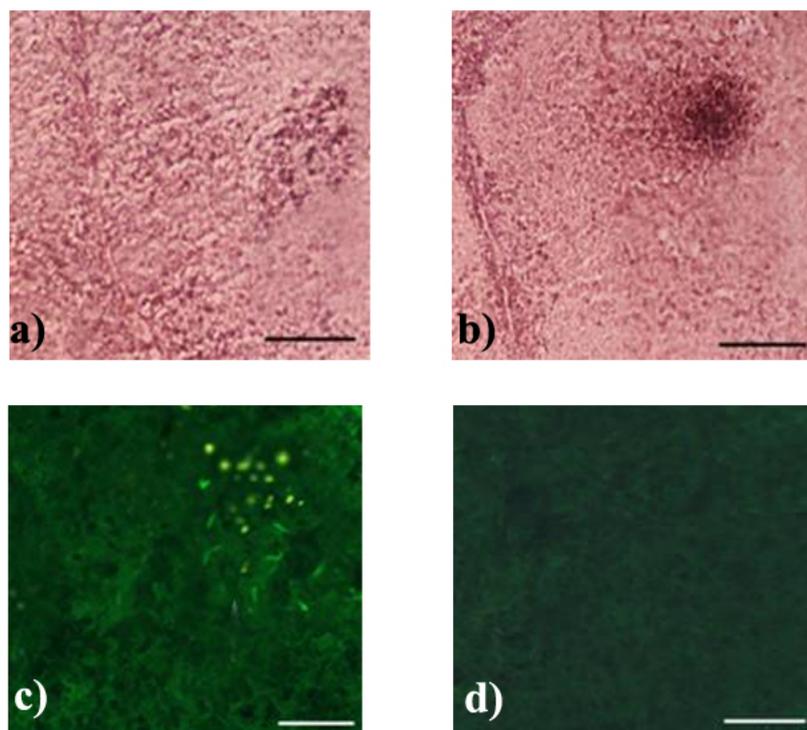


Fig. 72 Espressione dell'mRNA per HSP70 (a, b) e colorazione con Fluoro-Jade B (c,d) in NPO di *Thalassoma pavo* esposto alla concentrazione MAT di Atr (400 µg/L) e Tio (10 mg/Kg di peso corporeo). Scale bar: 60 µm.

Discussione

Questo lavoro rappresenta una diretta evidenza dei molteplici meccanismi neuroprotettivi messi in atto dal Teleosto *Thalassoma pavo* in condizioni di stress, fornendo un'integrazione funzionale di dati morfo-fisiologici, comportamentali e molecolari. L'estrema duttilità di tale animale ed il sorprendente repertorio di risposte adattative evidenziate in tale lavoro, confermano per *Thalassoma pavo* il suo ruolo di indicatore biologico e sensibile modello sperimentale nelle indagini neurodegenerative. In particolare, i risultati ottenuti dimostrano in tale specie il coinvolgimento del sistema recettoriale istaminergico nel mediare meccanismi neuroprotettivi attraverso una possibile interazione funzionale con altri fattori regolativi quali le HSPs. I fenomeni di plasticità neuronale comprendono modifiche trascrizionali, attivazione e/o inibizione della trasmissione neuronale e fenomeni di rimodellamento delle ramificazioni dendritiche ed assonali (Carmichael, 2003). In *Thalassoma pavo*, tali processi sono prettamente caratteristici di specifiche aree cerebrali, che risultano direttamente coinvolte nella modulazione di attività comportamentali quali il *feeding*, il nuoto e la predazione, il cui corretto esplicarsi diventa cruciale per la sopravvivenza degli animali acquatici (Dutta and Arends, 2003).

Nella prima parte di questo lavoro, sono stati valutati gli effetti neurotossicologici indotti dai metalli pesanti Cd^{2+} e Pb^{2+} e dai pesticidi Ed e Atr sulle attività comportamentali e neuronali nel Teleosteo *Thalassoma pavo*. Le elevate concentrazioni di tali contaminanti negli ambienti acquatici rappresentano un serio pericolo sia per l'equilibrio di tali habitat sia per gli effetti sulle principali attività fisiologiche quali la riproduzione e le funzioni neurocomportamentali (Vetillard and Bailache, 2005). L'esposizione a concentrazioni ecologicamente rilevanti di Cd^{2+} e Pb^{2+} in *Thalassoma pavo* induce significative alterazioni dei comportamenti motori, che si traducono nell'acquisizione di movimenti incontrollati o stereotipati ed in un generale stato di iperattività, che condiziona sensibilmente la *performance* motoria di tale animale. Tale risultato risulta essere in accordo con le alterazioni del comportamento esplorativo e di difesa riportate in un altro Teleosteo di acqua dolce, *Oncorhynchus mykiss* (Rademacher et al., 2003; Scott et al., 2003). L'effetto comportamentale riscontrato nel presente studio si correla fortemente agli eventi neurodegenerativi provocati da tali metalli nelle aree mesencefaliche e telencefaliche che risultano implicate nella modulazione delle risposte olfatto-mediate oltre che costituire siti di bioaccumulo dei metalli pesanti (Pillai et al., 2003). Accanto a tali alterazioni motorie, le anomalie nelle risposte telencefaliche olfatto-dipendenti provocate principalmente dall'azione dei due pesticidi, potrebbero essere determinanti per il comportamento alimentare di *Thalassoma pavo* che risulta sensibilmente diminuito in maniera paragonabile a quanto riportato in *Oncorhynchus mykiss* (Sloman et al., 2003). Questo effetto è supportato

dall'evidente neurodegenerazione xenoestrogeno-dipendente riscontrata nelle aree diencefaliche direttamente implicate nella modulazione del *feeding* (Kotz et al., 2002). Numerosi studi sperimentali evidenziano il ruolo dei metalli pesanti e pesticidi in qualità di neurotossine cerebrali, la cui azione risulta essere non solo correlata a processi apoptotici (Loikkanen et al., 2003), ma anche diretta alla neuromodulazione di sistemi neuronali quale quello serotonergico (Struzyńska et al., 2005) e somatostatinergerico (Giusi et al., 2006a). I meccanismi sfruttati dagli stressori nell'indurre queste alterazioni sono molteplici e comprendono danni ossidativi di membrana attraverso l'inattivazione dei gruppi tiolici essenziali nelle proteine di membrana (Herak-Kramberger and Sabolic, 2001) e modifiche nel metabolismo del Ca^{2+} , cui conseguono alterazioni nel rilascio dei neurotrasmettitori (Kumar and Gilula, 1996; Antonio and Leret, 2000). Inoltre, tali contaminanti ambientali possono interferire con i processi di replicazione del DNA, di trascrizione genica, di traduzione (Cooper et al., 2000; Hartwig, 2001).

In tale contesto, la seconda parte di questo lavoro fornisce nuovi risultati relativi al ruolo neuroprotettivo esercitato dal sistema istaminergico in condizioni di stress indotte dall'azione neurotossica di metalli pesanti e pesticidi. Per la determinazione di tali meccanismi, si è proceduto innanzitutto con la caratterizzazione molecolare e farmacologica di tale sistema neuronale in *Thalassoma pavo*, considerata la totale assenza di alcun dato relativo al sistema istaminergico in tale specie. I molteplici approcci metodologici messi in atto in questo lavoro hanno consentito la determinazione di sequenze geniche parziali codificanti per i sottotipi H_2R e H_3R in tale specie e successivamente la valutazione degli effetti comportamentali e trascrizionali indotti dal trattamento con gli antagonisti Cim e Tio selettivi per tali recettori (Giusi et al., 2006b). L'analisi molecolare di H_2R e H_3R ha rivelato un elevato grado di omologia con le corrispondenti sequenze nei Mammiferi, suggerendo una conservazione di determinati domini proteici e posizioni aminoacidiche che risultano determinanti per la funzione recettoriale (Hancock et al., 2003). In particolare, nella sequenza aminoacidica di H_2R è stato possibile evidenziare la conservazione delle posizioni 220 e 315, che nei Mammiferi appaiono estremamente mantenute e giocano un ruolo chiave nel meccanismo di trasduzione del segnale attivato da tale sottotipo (Kobayashi et al., 1996). Per quanto concerne la sequenza di H_3R risulta conservato in *Thalassoma pavo* il dominio aminocidico compreso tra gli aminoacidi 348-360 considerato necessario per la funzione di tale sottotipo, oltre al putativo sito di giunzione esone-introne in *i3*, suggerendo anche in tale specie la possibilità dell'esistenza di multiple isoforme, in accordo con quanto riportato nei Mammiferi (Drutel et al., 2001; Wellendorph et al., 2002; Chen et al., 2003). La caratterizzazione molecolare di questi recettori costituisce un primo ed unico dato relativo

all'identificazione delle sequenze geniche codificanti per i recettori istaminergici in un Vertebrato acquatico, considerato che le uniche evidenze sperimentali attualmente disponibili sono relative a studi di legame recettoriale in Teleostei, realizzati mediante analisi di competizione con agonisti selettivi (Peitsaro et al., 2000; Choich et al., 2004). I risultati dell'analisi molecolare, che consentono di ipotizzare il ruolo funzionale svolto da specifici domini proteici di H₂R e H₃R in *Thalassoma pavo*, sono stati integrati da uno studio farmacologico che ha previsto il blocco di tali sottotipi mediante antagonisti selettivi. L'inattivazione funzionale di H₂R per azione dell'antagonista Cim, ha generato in *Thalassoma pavo* un significativo incremento dell'assunzione del cibo, suggerendo per tale sottotipo un ruolo funzionale nella modulazione del *feeding*, in accordo con quanto riportato nel ratto (Magrani et al., 2004). Accanto a tale variazione comportamentale, il trattamento con tale antagonista promuove nel Teleosteo un crescente stato di inattività, dal momento che vengono compromesse specifiche attività modulate da H₂R, quali gli atteggiamenti di difesa e la predazione (Santos et al., 2003). E' interessante notare come il trattamento con l'antagonista selettivo per H₃R induce in *Thalassoma pavo* una forte riduzione dell'acquisizione del cibo, in accordo con evidenze sperimentali che riportano come un incremento di HA, conseguente al blocco del sottotipo H₃R, possa agire da potente soppressore del *feeding* (Ito et al., 1999). Inoltre, gli animali trattati con Tio manifestano un evidente incremento della loro normale attività di nuoto, acquisendo movimenti incontrollati ed in alcuni casi assolutamente privi di coordinazione. Tale dato comportamentale suggerisce che anche per i Vertebrati acquatici H₃R possa rappresentare il principale sottotipo implicato nella regolazione delle attività motorie e cognitive, considerato che nei Mammiferi alterazioni nella funzionalità di tale recettore sono da correlarsi a deficit sensoriali e motori, i quali costituiscono i sintomi caratterizzanti diverse patologie neurodegenerative (Fox et al., 2005).

L'espressione del sistema istaminergico appare essere sensibilmente condizionata dall'azione neurotossica esercitata dai contaminanti ambientali analizzati in questo lavoro. In particolare, gli effetti neurotossici indotti da metalli pesanti e pesticidi si esplicano in aree encefaliche distinte, suggerendo un'intima correlazione tra alterazioni comportamentali e modifiche trascrizionali in seguito all'azione di tali neurotossine. In particolare, gli effetti dei metalli pesanti sono caratteristici di aree strettamente implicate in attività motorie, quali le aree mesencefaliche, e si traducono in significativi decrementi dei livelli trascrizionali di H₂R (Giusi et al., 2005a; 2005b; 2006b). Tali effetti potrebbero rappresentare una condizione critica per l'esplicarsi dei meccanismi inibitori HA-dipendenti in aree motorie (Santos et al., 2003), condizionando determinati parametri quali la velocità del nuoto, la precisa

localizzazione di oggetti e l'elaborazione di mappe spaziali utili per l'orientamento (Xue et al., 2003). Nel caso del sottotipo H₃R, ambedue le categorie di contaminanti mostrano un'azione modulatrice dei livelli di espressione di tale sottotipo, che appare tuttavia essere regione-specifica. Gli effetti promossi dai pesticidi sono prevalentemente diretti alle aree ipotalamiche, dove promuovono un incremento dei livelli trascrizionali di H₃R; dato che potrebbe fornire un'interpretazione funzionale alla sensibile riduzione del comportamento alimentare osservato in *Thalassoma pavo* in seguito ad esposizione a tali pesticidi. Quest'evidenza sperimentale risulta in perfetto accordo con le alterazioni della *performance* motoria ed alimentare riscontrate nel salmone in seguito a trattamento con il pesticida diazinon (Scholz et al., 2000). A supporto di tali ipotesi, alcune evidenze sperimentali suggeriscono che il blocco del rilascio di HA per azione di H₃R potrebbe sopprimere l'appetito attraverso la stimolazione del sottotipo H₁R (Goudie et al., 2003).

Il ruolo neuroprotettivo svolto dai sottotipi H₂R e H₃R in tali condizioni di stress raggiunge la sua piena comprensione mediante analisi degli effetti indotti dal trattamento combinato di antagonisti istaminergici e contaminanti ambientali. I risultati di tale studio dimostrano infatti che il blocco di H₂R, provocato dall'azione di Cim, determina un'esacerbazione degli effetti neurotossici dipendenti dall'azione di metalli pesanti e pesticidi. Al contrario, l'inibizione dell'influenza di H₃R sui comportamenti motori anomali di *Thalassoma pavo* mediante il suo antagonista Tio, manifestano una riduzione delle variazioni di espressione genica stress-dipendenti ed un generale miglioramento del danno neuronale provocato da tali contaminanti (Giusi et al., 2006c). Tali risultati consentono di concludere che antagonisti diretti verso H₂R sembrano inclini prevalentemente ad un'accelerazione ed enfaticizzazione del danno cerebrale (Otsuka et al., 2003), condizione che sembra essere strettamente correlata ai bassi livelli di espressione di H₁R e H₂R in aree corticali di pazienti affetti da sintomatologie depressive (Kano et al., 2004). D'altra parte, la somministrazione di Tio sembra essere associata ad un ruolo protettivo in condizioni patologiche determinate da agenti convulsivi (Vohora et al., 2001) e neurotossine quali l'acido 3-nitropropionico (Canonaco et al., 2005) attraverso una riduzione della funzionalità di H₃R ed un aumento di HA nel SNC.

Le considerazioni finora illustrate sono rafforzate ed arricchite dai dati relativi all'azione delle HSPs nelle suddette condizioni di stress. È stato ampiamente documentato anche nei Pesci che l'attivazione trascrizionale di tali proteine risulta determinante per l'attuazione dei meccanismi di difesa cellulare contro agenti stressori di varia natura (Basu et al., 2002). I *chaperones* presi in considerazione in questo studio (HSP90 e HSP70) subiscono anche in *Thalassoma pavo* un consistente incremento dei livelli di espressione, in

maniera paragonabile a quanto osservato in altri Teleostei (Goligorsky, 2001). L'attivazione di tali proteine in specifiche aree cerebrali di *Thalassoma pavo* suggerisce che anche in tale specie le HSPs possano essere coinvolte non solo in processi fisiologici, inclusi lo sviluppo e la crescita, ma anche nei meccanismi di rinaturazione e di *refolding* delle proteine danneggiate (Rutherford and Zuker, 1994).

In maniera concomitante, la valutazione di una possibile alterazione della trascrizione genica delle HSPs indotta dagli antagonisti istaminergici costituisce il presupposto ideale per valutare l'eventuale interazione funzionale esistente tra molteplici meccanismi neuroprotettivi nella risposta allo stress. L'effetto dei trattamenti combinati, antagonisti istaminergici/contaminanti ambientali, promuove effetti diversificati su HSP90 e HSP70. Infatti, tali trattamenti inducono un andamento eterogeneo nel pattern di espressione della HSP90, che si traduce complessivamente in significative *up-* e *down-regulation* nelle aree ipotalamiche, mentre le aree extraipotalamiche appaiono caratterizzate esclusivamente da una sovraespressione di tale proteina. Nel caso della HSP70, tali trattamenti inducono unicamente un incremento dei suoi livelli di espressione in tutte le aree considerate. La risposta eterogenea messa in atto da tali *chaperones* suggerisce come la risposta a condizioni di stress indotte dai contaminanti possa essere estremamente variabile nel SNC di *Thalassoma pavo*, attraverso l'attivazione di molteplici sistemi di neuroprotezione in grado di agire in maniera concertata, al fine di determinare una complessiva riduzione del danno neuronale, come è possibile osservare anche mediante colorazione con Fluoro-Jade B. Un'interpretazione a tale fenomeno deriva dalle evidenze sperimentali che riportano un diretto controllo delle HSPs da parte del sistema endocrino, che com'è noto è a sua volta controllato anche dal sistema istaminergico. E' perciò possibile che in questo pattern intervengano anche diversi ormoni, quali cortisolo e adrenalina, dal momento che è stato dimostrato che il primo può aumentare i livelli cellulari di HSP70 nei Pesci (Basu et al., 2002), con azione anti-apoptotica (Beere, 2005). Infine, appare estremamente interessante osservare che le variazioni del pattern di espressione della HSP90, in alcuni casi sovrapponibili a quelle osservate per i sottotipi istaminergici, suggeriscono una possibile interazione funzionale tra HSP90 ed il sistema istaminergico, in maniera analoga a quanto riportato per il sistema glutammatergico (Gerges et al., 2004). In tale contesto, il ruolo della HSP90 potrebbe essere quello di mantenere la corretta conformazione dei recettori di membrana, contribuendo al successo del legame ligando-recettore.

In conclusione, il ruolo del sistema istaminergico in *Thalassoma pavo* risulta determinante per il mantenimento omeostatico delle attività comportamentali e neuronali in aree encefaliche critiche dal punto di vista funzionale. Le evidenze sperimentali raggiunte in questo studio dimostrano per la prima volta in un Teleosteo marino, nuovi aspetti molecolari e funzionali dei recettori istaminergici, suggerendo un loro diretto coinvolgimento nell'esplicarsi di funzioni complesse paragonabili a quelle dei Mammiferi. D'altra parte, l'interazione funzionale tra i sottotipi istaminergici ed il *network* delle HSPs si pone come un fattore neurofisiologico primario nella regolazione della risposta allo stress nei Teleostei. Tali processi sono paragonabili ai processi di attivazione di tali marker neuronali in condizioni fisiologiche vitali quali l'ibernazione nei Mammiferi (Sallmen et al., 2003), ma la completa definizione dei meccanismi molecolari e cellulari che intervengono in tali risposte risulta ancora incompleta. Un possibile meccanismo è illustrato in fig. 73.

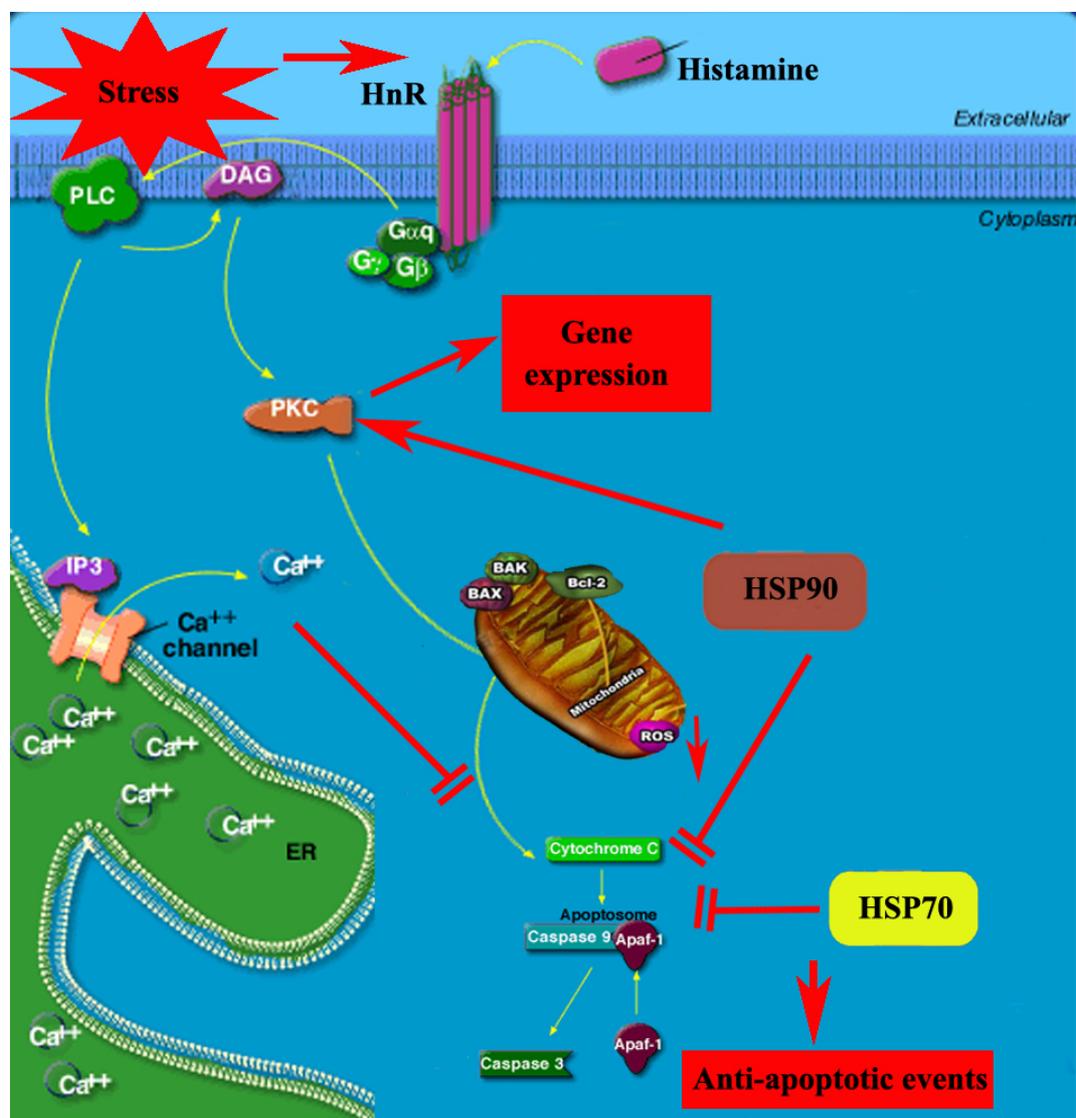


Fig. 73 Ipotesi di interazione funzionale tra il sistema istaminergico e le HSPs nella risposta allo stress in una cellula neuronale.

Si potrebbe ipotizzare che l'esposizione a fattori di stress determina la stimolazione funzionale del sistema istaminergico ed in particolare la sovra-espressione dei suoi sottotipi recettoriali. Tale sovra-espressione si traduce in un effetto neuroprotettivo nella cellula neuronale contribuendo al mantenimento del bilancio ionico intracellulare ed impedendo l'insorgere di stress ossidativo. Allo stesso tempo, l'innalzamento dei livelli trascrizionali delle HSP90 e HSP70 contribuisce all'attivazione dei complessi biosintetici che intervengono nei *pathways* anti-apoptotici, promuovendo meccanismi di riparo cellulare e, nel caso della HSP90, cooperando al mantenimento dei meccanismi di segnalazione neuronale.

Oltre 30 anni fa, le risposte allo stress termico osservate per la prima volta nel moscerino della frutta apparivano come semplici curiosità molecolari (Ashburner and Bonner, 1979): oggi sono al centro di un campo di ricerca attivo e vitale. Gli studi funzionali sui meccanismi di neuroprotezione hanno portato a nuove conoscenze su processi cellulari essenziali ed applicabili al campo medico ed ambientale, ma il mosaico della complessità strutturale di tali processi manca ancora di molti tasselli essenziali.

Bibliografia

- **Abe, H., Honma, S., Ohtsu, H., and Honma, K.** Circadian rhythms in behavior and clock gene expressions in the brain of mice lacking histidine decarboxylase. *Brain Res. Mol. Brain. Res.*, 124, 178-187 (2004).
- **Ackerman, P.A., Forsyth, R.B., Mazur, C.F., and Iwama, J.K.** Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. *Fish Physiol. Biochem.*, 23, 327-336 (2000).
- **Adachi N.** Cerebral ischemia and brain histamine. *Brain Res. Rev.*, 50, 275-286 (2005).
- **Agarraberes, F.A., Terlecky, S.R., and Dice, J.F.** An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J. Cell.Biol.*, 137, 825-834 (1997).
- **Airaksinen, M.S., Reinikainen, K., Riekkinen, P., and Panula, P.** Neurofibrillary tangles and histamine-containing neurons in Alzheimer hypothalamus. *Ag. Act.*, 33, 104-110 (1991).
- **Alonzo, S.H., and Warner, R.R.** Dynamic games and field experiment examining intra and intersexual conflict: explaining counter intuitive mating behaviour in Mediterranean wrasse, *Symphosus ocellatus*. *Behav. Ecol.*, 11, 56-70 (2000).
- **Alvarez, E.O., Ruarte, M.B., and Banzan, A.M.** Histaminergic system of the limbic complex on learning and motivation. *Behav. Brain. Res.*, 124, 195-202 (2001).
- **Anderson, K.J., Miller, K.M., Fugaccia, I., and Scheff, S.W.** Regional distribution of Fluoro-Jade B staining in the hippocampus following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.*, 193, 125-130 (2005).
- **Antonio, G.B., and Leret, M.L.** Study of the neurochemical alterations produced in discrete brain areas by perinatal low level lead exposure. *Life Sci.*, 67, 635-642 (2000).
- **Arai, A., Naruse, K., Mitani, H., and Shima, A.** Cloning and characterization of cDNAs for 70-kDa heat-shock proteins (Hsp70) from two fish species of the genus *Oryzias*. *Jpn. J. Genetic.*, 70, 423-433 (1995).
- **Arai, H., and Charo, L.F.** Differential regulation of G-protein mediated signalling by chemokine receptors. *J. Biol.Chem.*, 271, 21814-21819 (1996).
- **Argon, Y., and Simen, B.B.** Grp94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 10, 495-505 (1999).
- **Ashburner, M., and Bonner, J.J.** The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell*, 17, (1979).
- **Bakand, S., Khalil, C., and Hayes, A.** Toxicity assessment of industrial chemicals and airborne contaminants: transition from *in vivo* to *in vitro* test methods: a review. *Inhal. Toxicol.* 17, 775-87 (2005).
- **Bakker, R.A., Timmermann, H., and Leurs, R.** Histamine receptors: specific ligand, receptor biochemistry and signal transduction. *Clin. Allergy Immunol.*, 17, 27-64 (2002).
- **Bakker, R.A., Lozada, A.F., van Marie, A., Shenton, F.C., Drutel, G., Karlstedt, K., Hoffmann, M., Lintunen, M., Yamamoto, Y., van Rijin, R.M., Chazot, P.L., Panula, P., and Leurs, R.** Discovery of naturally occurring splice variants of the rat histamine H₃ receptor that acts as dominant-negative isoforms. *Mol. Pharmacol.*, 69, 1194-1206 (2006).
- **Basu, N., Todgham, A.E., Ackerman, P.A., Bibeau, M.R., Nakano, K., Schulte, P.M., and Iwama, G.K.** Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295, 173-183 (2002).
- **Basu, N., Nakano, T., Grau, E.G., and Iwama, G.K.** The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 124, 97-105 (2001).
- **Beere, H.M.** Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock proteins pathways. *J. Clin. Invest.*, 115, 2633-2639 (2005).
- **Bermak, J.C., and Zhou, Q.Y.** Accessory proteins in the biogenesis of G protein-coupled receptors. *Mol. Intervent.*, 1, 282-287 (2001).
- **Bisson, M., and Hontela, A.** Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 180, 110-117 (2002).
- **Blandina, P., Giorgetti, M., Bartolini, L., Cecchi, M., Timmermann, H., Leurs, R., Pepeu, G., and Giovannini, M.G.** Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H₃ receptor activation in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 119, 1656-1664 (1996).
- **Blandizzi, C., Colucci, R., Tognetti, M., De Paolis, B., and Del Tacca, M.** H₃ receptor mediated inhibition of intestinal acetylcholine release: pharmacological characterization of

- signal transduction pathways. *Naunyn Schmiederbergs Arch. Pharmacol.*, 363, 193-202 (2001).
- **Blencowe, B.J.** Exonic splicing enhancers: mechanisms of action, diversity and role in human genetic disease. *Trends Biochem. Sci.*, 25, 106-110 (2000).
 - **Bongers, G., Leurs, R., Robertson, J., and Raber, J.** Role of H₃-receptor-mediated signaling in anxiety and cognition in wild-type and Apoe^{-/-} mice. *Neuropsychopharmacology*, 29, 441-449 (2004).
 - **Bose, S., Weikl, T., Bugl, H., and Buchner, J.** Chaperone function of hsp90-associated proteins. *Science*, 274, 1715-1717 (1996).
 - **Brodin, L., Hokfelt, T., Grillner, S., and Panula P.** Distribution of histaminergic neurons in the brain of the lamprey *Lampetra fluviatilis* as revealed by histamine-immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.*, 292, 435-442 (1990).
 - **Brown, R.E., Stevens, D.R., and Haas, H.L.** The physiology of brain histamine. *Prog. Neurobiol.*, 63, 637-672 (2001).
 - **Brown, I.R.** Induction of heat shock genes in mammalian brain by hyperthermia and tissue injury. In: *Heat Shock Proteins in the Nervous System*. Mayer J., Brown I. (eds). Academic Press, New York pp:31-53 (1994).
 - **Brueske, C.C., and Barrett, G.W.** Dietary heavy metal uptake by the Least Shrew *Criptomys parva*. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 47, 205-210 (1991).
 - **Bulenger, S., Marullo, S., and Bouvier, M.** Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26, 131-137 (2005).
 - **Burger, J., Gaines, K.F., Boring, C.S., Stephens, W.L., Snodgrass, J., Dixon, C., McMahon, M., Shukla, S., Shukla, T., and Gochfeld, M.** Metal levels in fish from the Savannah River: potential hazards to fish and other receptors. *Env. Res. Section A*, 89, 85-97 (2002).
 - **Butler, A.B., and Hodos, W.** Vertebrate phylogeny and diversity in brain organization. In: *Comparative vertebrate anatomy (evolution and adaptation)*, New York Wiley-Liss, pp. 54-68 (2000).
 - **Calabrese, V., Bates, T.E., and Giuffrida Stella, A.M.** NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem. Res.*, 65, 1315-1341(2000).
 - **Calabrese, V., Scampagnini, G., Giuffrida Stella, A.M., Bates, T.E., and Clark, J.B.** Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevità. *Neurochem. Res.*, 26, 739-764 (2001).
 - **Calabrese, V., Scampagnini, G., Ravagna, A., Fardello, R.G., Giuffrida Stella, A.M., and Abraham N.** Regional distribution of heme oxygenase, Hsp70, and glutathione in brain: relevance for endogenous oxidant/antioxidant balance and stress tolerance. *J. Neurosci. Res.*, 67, 612-623 (2002).
 - **Campana, O., Sarasquete, C., and Blasco, J.** Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55, 116-125 (2003).
 - **Canonaco, M., Madeo M., Alò, R., Giusi, G., Granata, T., Carelli, A., Canonaco, A., and Facciolo, R.M.** The histaminergic signaling system exerts a neuroprotective role against neurodegenerative-induced processes in the hamster. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 315, 188-195 (2005).
 - **Cassar, S.** Cloning of the guinea pig H₃ receptor. *Neuroreport*, 11, 3-4 (2000).
 - **Carmichael, S.T.** Plasticity of cortical projections after stroke. *Neuroscientist*, 9, 64-75 (2003).
 - **Cattani, O., Serra, R., Isani, G., Raggi, G., Cortesi, P., and Carpena, E.** Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass *Dicentrarchus labrax*, exposed to cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113, 193-199 (1996).
 - **Cerda-Reverter, J.M., Zanuy, S., and Munoz-Cueto, J.A.** Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. *J. Morphol.*, 247, 217-228 (2001a).

- **Cerda-Reverter, J.M., Zanuy, S., and Munoz-Cueto, J.A.** Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). II. The diencephalon. *J. Morphol.*, 247, 229-251(2001b).
- **Charon, Y., Laniece, P., and Tricoire, H.** Radio-imaging for quantitative autoradiography in biology. *Nucl. Med. Biol.*, 25, 699-704 (1998).
- **Chen, J., Liu, C., and Lovenberg, T.W.** Molecular and pharmacological characterization of the mouse histamine H3 receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 467, 57-65 (2003).
- **Choich, J.A., El-Nabawi, A., and Silbergeld, E.K.** Evidence of histamine receptors in fish brain using an in vivo [¹⁴C]2-deoxyglucose autoradiographic method and an in vitro receptor-binding autoradiographic method. *Environ. Res.*, 94, 86-93 (2004).
- **Chiosis, G., Huezio, H., Rosen, N., Mimnaugh, E., Withesell, L., and Neckers, L.** 17AAG: low-target binding affinity and potent cell activity-finding and explanation. *Mol. Cancer Ther.*, 2, 123-129 (2003).
- **Cho, W.J., Cha, S.J., Do, J.W., Choi, Y.J., Lee, J.Y., Jeong, C.S., Cho, K.J., Choi, W.S., Kang, H.S., Kim, H.D., and Park, J.M.** A novel 90k-Da stress protein induced in fish cells by fish rhabdovirus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 233, 316-319 (1997).
- **Chomczynski, P., and Sacchi N.** Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159 (1987).
- **Cid, C., Alvarez-Cermeno, J.C., Camafeita, E., Salinas, M., and Alcazar, A.** Antibodies reactive to heat shock protein 90 induce oligodendrocyte precursor cell death in culture. Implication for demyelination in multiple sclerosis. *FASEB J.*, 18, 409-411 (2004).
- **Ciocca, D.R., Oesterreich, S., Chamness, G.C., McGuire, W.L., and Fuqua, S.A.** Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (hsp27). *J. Natl. Cancer Inst.*, 85, 1558-1570 (1993).
- **Claphman, J., and Kilpatrick, G.J.** Histamine H3 receptors modulate the release of [³H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex: evidence for the possible existence of H₃ receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.*, 107, 919-923 (1992).
- **Clark, J.M.** Insecticides as a tool in probing vital receptors and enzymes in excitable membranes. *Pest. Biochem. Physiol.*, 57, 235-254 (1997).
- **Cochrane, B.J., Irby, R.B., Snell, T.W.** Effects of copper and tributyltin on stress protein abundance in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98, 385-390 (1991).
- **Coelho, J.L., Medalha, C.C., and Mattioli, R.** Analysis of the effects of CPA and L-histidine on goldfish tested on a conditioned place preference model. *Behav. Brain Res.*, 124, 161-165 (2001).
- **Cogè, F., Guenin, S.P., Audinot, V., Renouard-Try, A., Beauverger, P., Macia, C., Ouvry, C., Nagel, N., Rique, H., Boutn, J.A., and Galizzi, J.P.** Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H3 receptor. *Biochem. J.*, 355, 279-288 (2001).
- **Cooper, R.L., Stoker, T.E., Tyrey, L., Goldman, J.M., and McElroy, W.K.** Atrazine disrupt the hypothalamic control of the pituitary-ovarian function. *Toxicol. Sci.*, 53, 297-307 (2000).
- **Copper, D.M.F.** Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem. J.*, 375, 517-529 (2003).
- **de Olmos, J.S., Beltramino, C.A., and de Olmos De Lorenzo, S.** Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia, and physical trauma. *Neurotox. Teratol.*, 16, 545-561 (1994).
- **Del Valle, J., and Gantz, I.** Novel insights into histamine H₂ receptor biology. *Am. J. Physiol.*, 36, 987-996 (1997).
- **Del Valls, T.A., Forja, J.M., and Gomez-Parra, A.** Seasonality of contamination, toxicity and quality values in sediment from litoral ecosystem in the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Chemosph.*, 46, 1033-1043 (2002).
- **Drutel, G., Peitsaro, N., Karlstedt, J., Wieland, K., Smit, M.J., Timmerman, H., Panula, P., and Leurs, R.** Identification of rat H₃ receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol. Pharmacol.*, 59, 1-8 (2001).
- **Duffy, L.K., Scofield, E., Rodgers, T., Patton, M., and Bowyer, R.T.** Comparative baseline levels of mercury, hsp70 and hsp60 in subsistence fish from the Yukon-Kuskokwim delta region of Alaska. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.*, 124, 181-186 (1999).

- **Dutta, H.M., and Arends, D.A.** Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ. Res.*, 91, 157-162 (2003).
- **Echobichon, D.J.** Toxic effects of pesticides. In Klaassen, C.D. (Ed.), Casarett and Doull's, Toxicology, the basic science of poisons, McGraw-Hill, New York, pp.643-689 (1996).
- **Eiland, M.M., Ramathan, L., Gulyani, S., Gilliland, M., Bergmann, B.M., Rechtschaffen, A., and Siegel, J.M.** Increase in amino-cupric-silver staining of the supraoptic nucleus after sleep deprivation. *Brain Res.*, 945, 1-8 (2002).
- **Ekstrom, P., Holmqvist, B.I., and Panula, P.** Histamine-immunoreactive neurons in the brain of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. Correlation with hypothalamic tyrosine hydroxylase- and serotonin-immunoreactive neurons. *J. Chem. Neuroanat.*, 8, 75-85 (1995).
- **Eriksson, K., Peitsaro, N., Karlstedt, K., Kaslin, J. and Panula P.** Development of the histaminergic neurons and expression of histidine decarboxylase mRNA in the zebrafish brain in the absence of all peripheral histaminergic systems. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 3799-3812 (1998).
- **Escher, B.I., and Hermens, J.L.** Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4201-4217 (2002).
- **Feder, M., and Hofmann, G.E.** Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. Physiol.*, 61, 243-282 (1999).
- **Felts, S.J., Owen, B.A.L., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D.B., and Toft, D.O.** The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *J. Biol. Chem.*, 275, 3305-3312 (2000).
- **Fitzsimons, C.P., Lazar-Molnar, E., Tomoskozi, Z., Buzás, E., Rivera, E.S., and Falus A.** Histamine deficiency induces tissue-specific down-regulation of histamine H₂ receptor expression in histidine decarboxylase knockout mice. *FEBS Lett.*, 508, 245-248 (2001).
- **Fox, G.B., Esbenshade, T.A., Pan J.B., Radek, R.J., Krueger K.M., Yao, B.B., Browman K.E., Buckley, M.J., Ballard, M.E., Komater V.A., et al.** Pharmacological properties of ABT-239 [4-(2-{2-[(2R)-2-methylpyrrolidinyl]-benzofuran-5yl) benzonitrile]: II. Neurophysiological characterization and broad preclinical efficacy in cognition and schizophrenia. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 313, 176-190 (2005).
- **Galigniana, M.D., Harrell, J.M., Housley, P.R., Patterson, C., Fisher, S.K., and Pratt, W.B.** Retrograde transport of the glucocorticoid receptor in neuritis requires dynamic assembly of complexes with the protein chaperone hsp90 and is linked to the CHIP component of the machinery for proteasomal degradation. *Mol.Brain Res.*, 123, 27-36 (2004).
- **Galigniana, M.D., Radanayi, C., Renoir, J.M., Housley, P.R., Pratt, and W.B.** Evidence that the peptidylpropyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J. Biol. Chem.*, 276, 14884-14889 (2001).
- **Garcia-Cardena, G., Fan,R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C.** Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by hsp90. *Nature*, 392, 821-824 (1998).
- **Garnier, C., Lafitte, D., Tsvetkov, P.O., Barbier, P., Leclerc-Devin, J., Millot, J-M., Briand, C., Makarov, A.A., Catelli, M.G., and Peyrot, V.** Binding of ATP to heat shock protein 90: evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.*, 277, 12208-12214 (2002).
- **Garza, A., Vega, R., and Soto, E.** Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med. Sci. Monit.*, 12, 57-65 (2006).
- **Gerges, N.Z., Tran, I.C., Backos, D.S., Harrell, J.M., Chinkers, M., Pratt, W.B., and Esteban, J.A.** Independent functions of hsp90 in neurotransmitter release and in the continuous synaptic cycling of AMPA receptors. *J. Neurosci.*, 24, 4758-4766 (2004).
- **Giovannini, M.G., Efoudebe, M., Passani, M.B., Baldi, E., Bucherelli, C., Giachi, F., Corradetti, R., and Blandinam, P.** Improvement in fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells. *J. Neurosci.*, 23, 9016-9023 (2003).

- **Giraldo, J., Martin, M., Campillo, M., and Pardo, L.** Theoretical studies on the histamine H₂ receptor: molecular mechanism of action of antagonists. *Mol. Pharmacol.*, 42, 373-381 (1992).
- **Giusi, G., Madeo, M., Alò, R., Raso, C., Carelli, A., Facciolo, R.M., and Canonaco, M.** Effects of environmental stressors on neuronal histaminergic and behavioral activities of the teleost *Thalassoma pavo*. *Horm. Behav.*, 46, 106 (2004).
- **Giusi, G., Facciolo, R.M., Alò, R., Carelli, A., Madeo, M., Brandmayr, P., and Canonaco, M.** 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 (2005a).
- **Giusi, G., Alò R., Canonaco M., Facciolo R.M.** Lead-induced neurobehavioral dimorphism in *Thalassoma pavo* is linked to histamine subtype2 expression differences. *J. Neurochem.*, 94(2), 234 (2005b).
- **Giusi, G., Facciolo, R.M., Canonaco, M., Alleva, E., Belloni, V., Dessì-Fulgheri, F., and Santucci, D.** The endocrine disruptor atrazine accounts for a dimorphic somato-statinergic neuronal expression pattern in mice. *Toxicol. Sci.*, 89, 257-264 (2006a).
- **Giusi, G., Alò, R., Carelli, A., Facciolo, R.M., and Canonaco, M.** Structural alterations and consequent abnormal behaviors of the teleost brain are related to the histaminergic H₂ receptor. *4th International Symposium Neuroprotection and Neurorepair: Cerebral Ischemia and Stroke*, Germany (2006b).
- **Giusi, G., Alò, R., Canonaco, M., and Facciolo, R.M.** Multiple neuroprotective mechanisms are involved in lead-dependent stress condition in the brain of the teleost *Thalassoma pavo*. *4th International Symposium Neuroprotection and Neurorepair: Cerebral Ischemia and Stroke*, Germany, (2006c).
- **Godwin, J., Sawby, R., Warner, R.R., Crews, D., and Grober, M.S.** Hypothalamic arginine vasotocin mRNA abundance variation across sexes and with sex change in a coral reef fish. *Brain Behav. Evol.*, 55, 77-84 (2000).
- **Goligorsky, M.S.** The concept of cellular “fight-or-flight” reaction to stress. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 280, 551-561 (2001).
- **Goodwin, T.H., Young, A.R., Holmes, M.G.R., Old, G.H., Hewitt, N., Leeks, G.J.L., Packman, J.C., and Smith, B.P.G.** The temporal and spatial variability of sediment transport and yields within the Bradford Beck catchment, West Yorkshire. *Sci. Total Env.*, 314, 475-494 (2003).
- **Gordon, S., Bharadwaj, S., Hnatov, A., Ali, A., and Ovsenek, N.** Distinct stress-inducible and developmentally regulated heat shock transcription factors in *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.*, 181, 47-63 (1997).
- **Gormley, K.L., and Teather, K.L.** Developmental, behavioural and reproductive effects experience by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54, 330-338 (2003).
- **Goudie, A.J., Harford, J.C.G., Dovey, T.M., Cooper, G.D., and Neill, J.C.** H₁-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology*, 28, 2210-2211 (2003).
- **Goyer, R.A.** Lead toxicity: current concerns. *Environ. Health Perspec.* 100, 177-188 (1993).
- **Graymore, M., Stagnitti, F., and Allison, G.** Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.*, 26, 483-495 (2001).
- **Green, D.R., and Reed, J.C.** Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312 (1998).
- **Haas, H., and Panula, P.** The role of histamine and tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat. Neurosci.*, 4, 121-130 (2003).
- **Hancock, A.A., Esbenshade, T.A., Krueger, K.M., and Yao, B.B.** Genetic and pharmacological aspects of histamine H₃ receptor heterogeneity. *Life Sci.*, 73, 3043-3072 (2003).
- **Hartwig, A.** Zinc finger proteins as potential target for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid. Redox. Signal*, 3, 625-634 (2001).
- **Hassanein, H.M.A., Banhaway, M.A., Soliman, F.M., Abdel-Rehim, S.A., Muller, W.E.G., and Schroder, H.C.** Induction of hsp70 by the herbicide oxifluoren (goal) in the Egyptian Nile fish, *Oreochromis niloticus*. *Arch. Env. Contain. Toxicol.*, 37, 78-84 (1999).

- **Hauptmann, G., and Gerster, T.** Regulatory gene expression patterns reveal transverse and longitudinal subdivisions of the embryonic zebrafish forebrain. *Mech. Dev.*, 91, 105-118 (2000).
- **Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., and Vonk, A.** Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 5476-5480 (2002).
- **Hecker, M., Tyler, C.R., Hoffmann, M., Maddix, S., and Karbe, L.** Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe River, Germany. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 2311-2321 (2002).
- **Herak-Kramberger, C.M., and Sabolic, I.** The integrity of renal cortical brush-border and basolateral membrane vesicles is damaged in vitro by nephrotoxic heavy metals. *Toxicology*, 156, 139-147 (2001).
- **Hill, S.J., Ganellin, C.R., Timmerman, H., Schwartz, J.C., Shanklet, N.P., Young, J.M., Schunack, W., Levi, R., and Haas, H.L.** International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol. Rev.*, 49, 253-278 (1997).
- **Hopkins, K.J., Wang, G., and Schmued, L.C.** Temporal progression of kainic acid induced neuronal and myelin degeneration in the rat forebrain. *Brain Res.*, 864, 69-80 (2000).
- **Hopkins, W.A., Staub, B.P., Snodgrass, J.W., Taylor, B.E., DeBiase, A.E., Roe, J.H., et al.** Responses of benthic fish exposed to contaminants in outdoor microcosms-examining the ecological relevance of previous laboratory toxicity tests. *Aquat. Toxicol.*, 68, 1-12 (2004).
- **Hough, L.B.** Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Mol. Pharmacol.*, 59, 415-419 (2001).
- **Huang, H.C., Sherman, M.Y., Kandror, O., and Goldberg, A.L.** The molecular chaperone DNAJ is required for the degradation of a soluble abnormal protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 276, 3920-3928 (2001).
- **Imai, J., and Yahara, I.** Role of hsp90 in salt stress tolerance via stabilization and regulation of calcineurin. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 9262-9270 (2000).
- **Imaizumi, M., Miyazaki, S., and Onodera, K.** Effects of betahistidine, a histamine H1 agonist and H3 antagonist, in a light/dark test in mice. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 18, 19-24 (1996).
- **Inagaki, N., Panula, P., Yamatodani, A., and Wada, H.** Organization of the histaminergic system in the brain of the teleost *Trachurus trachurus*. *J. Comp. Neurol.*, 310, 94-102 (1991).
- **Ito, C.** The role of brain histamine in acute and chronic stress. *Biomed. Pharmacother.*, 54, 263-267 (2000).
- **Ito, C., Shen, H., Toyota, H., Kubota, Y., Sakurai, E., Watanabe, T., and Sato, M.** Effects of acute and chronic stresses on the central histaminergic neuron system in Fischer rat. *Neurosci. Lett.*, 262, 143-145 (1999).
- **Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I., and Buchner, J.** Transient interaction of hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J. Biol. Chem.*, 270, 7288-7294 (1995).
- **Jensen, K.F.** Neuroanatomical techniques for labelling neurons and their utility in neurotoxicology, in Chang, L.W., Slikker Jr., W. (Eds), *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, Academic Press, San Diego, pp. 27-66 (1995).
- **Kang, K.S., Park, J.E., Ryu, D.Y., and Lee, Y.S.** Effect and neuro-toxic mechanism of 2,2', 4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl and Endosulfan in neuronal stem cells. *J. Vet. Sci.*, 63, 1183-1190 (2001).
- **Kano, M., Fukudo, S., Tashiro, A., Utsumi, A., Tamura, D., Itoh, M., Iwata, R., Tashiro, M., Mochizuki, H., Funaki, Y., Kato, M., Hongo, M., Yanai, K.** Decreased histamine H₁ receptor binding in the brain of depressed patients. *Eur. J. Neurosci.*, 20, 803-810 (2004).
- **Kaslin, J., and Panula P.** Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic system in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.*, 440, 342-377 (2001).
- **Kavlock, R.J., Daston, G.P., De Rosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Lustre, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., and Tilson, H.A.** Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the US EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.*, 104, 715-740 (1996).

- **Khan, I.A., and Thomas, P.** Disruption of neuroendocrin control of luteinizing hormone secretion by aroclar 1254 involves inhibition of hypothalamic tryptofan hydroxylase activity. *Biol. Reprod.*, 64, 955-964 (2000).
- **Kiang, J.G., and Tsokos, G.C.** Heat shock proteins 70kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.*, 80, 183-201 (1998).
- **Klassen, C.D.** Principles of toxicology. In: Gilman, A.G., Tall, T.W., Nies, A.S., and Taylor, P. (Eds.), *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed. McGraw Hill, pp. 49-61 (1991).
- **Ko, E.M., Estabrooked, I.V., McCarthy, M., and Scammell, T.E.** Wake-related activity of tuberomammillary neurons in rats. *Brain Res.*, 992, 220-226 (2003).
- **Kobayashi, T., Inove, I., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., and Watanabe, T.** Cloning, RNA expression and chromosomal location of a mouse histamine H₂ receptor gene. *Genomic*, 37, 390-394 (1996).
- **Kopito, R.R.** Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell. Biol.*, 10, 524-530 (2000).
- **Kotary, R.K., Burgess, E.A., and Candido, E.P.M.** The heat-shock phenomenon in cultured cells of rainbow trout: hsp70 mRNA synthesis and turnover. *Biochem. Biophys. Acta*, 783, 137-143 (1984).
- **Kotz, C.M., Teske, J.A., Levine, J.A., and Wang, C.F.** Feeding and activity induced by orexin A in the lateral hypothalamus in rats. *Reg. Pept.*, 104, 27-32 (2002).
- **Kregel, K.G.** Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.*, 92: 2177-2186 (2002).
- **Krone, P.H., and Sass, J.B.** Hsp90 α e hsp90 β genes are present in the zebrafish and are differentially regulated in developing embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204, 746-752 (1994).
- **Kukko-Lukjanov, T.K., and Panula, P.** Subcellular distribution of histamine, GABA and galanin in tuberomammillary neurons in vitro. *J. Chem. Neuroanat.*, 25, 279-292 (2003).
- **Kumar, N.M., and Gilula, N.B.** The gap junction communication channel. *Cell*, 84, 381-388 (1996).
- **Kurose, Y., and Terashima, Y.** Histamine regulates food intake through modulating noradrenaline release in the paraventricular nucleus. *Brain Res.*, 828, 115-118 (1999).
- **Lange, A., Ausseil, O., and Segner, H.** Alterations of 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 (2002).
- **Larson, E.T., Norris, D.O., and Summers, C.H.** Monoaminergic changes associated with socially induced sex reversal in the saddleback wrasse. *Neuroscience*, 119, 251-263 (2003).
- **Lawrence, A.J., and Hemingway, K.L.** Introduction and conceptual model. Effects of pollution on fish molecular effects and population responses. *Oxford, UK*, pp.1-13 (2003).
- **Lecklin, A., and Tuomisto, L.** The blockade of H₁ receptor attenuates the suppression of feeding and diuresis induced by inhibition of histamine catabolism. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 59, 753-758 (1998).
- **Lee, Y., and Davis, M.** Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis and the amygdala in the excitatory effects of corticotropin-releasing hormone on the acoustic startle reflex. *J. Neurosci.*, 17, 6434-6446 (1997).
- **Lee, K.E., Blazer, V.S., Denslow, N.D., Goldstein, R.M., and Talmage, P.J.** Use of biological characteristic of common carp (*Cyprinus carpio*) to indicate exposure to hormonally active agents in selected Minnesota streams. *Water Res. Invest. Rep.*, 4202, 1-47 (2000).
- **Lele, Z., Engel, S., and Krone, P.H.** Hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress-and tissue-specific manner in zebrafish embryos. *Dev. Genetic.*, 21, 123-133 (1997).
- **Leoni, S., Brambilla, D., Risuleo, G., de Feo, G., and Scarsella, G.** Effect of different whole body hyperthermic sessions on the heat shock response in mice liver and brain. *Mol. Cell. Biochem.*, 204, 41-47 (2000).
- **Leurs, R., Blandina, P., Tedford, C., and Timmermann, H.** Therapeutic potential of histamine H₃ receptor agonists and antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, 19, 177-183 (1998).
- **Leurs, R., Hoffman, M., Wieland, K., and Timmermann, H.** H₃ receptor gene is cloned at last. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21, 11-12 (2000).

- **Leurs, R., Bakker, R.A., Timmermann, H. And de Esch, I.J.P.** The histamine H₃ receptor: from gene cloning to H₃ receptor drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4, 107-120 (2005).
- **Liao, V.H., and Freedman, J.H.** Cadmium-regulated genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. *J. Biol. Chem.*, 273, 31962-31970 (1998).
- **Lin, J.S., Sakay, K., and Jouvet, M.** Hypothalamo-preoptic histaminergic projections in sleep-wake control in the cat. *Eur. J. Neurosci.*, 6, 618-625 (1994)
- **Liu, C., Wilson, S., Kuei, C., and Lovenberg, T.W.** Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H₄ receptors reveals substantial pharmacological species variation. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 299, 121-130 (2001).
- **Lloyd-Smith, J., Allinson, G., Stagnitti, F., Colville, S., and Cordell, S.** The fate of atrazine in forestry soil and groundwater. *Geophys. Res. Abstr.*, 1, 329 (1999).
- **Loikkanen, J., Chvalova, K.M., Naarala, J., Vahakangas, K.I., and Savolainen, K.M.** Pb²⁺ induced toxicity is associated with p53-independent apoptosis and enhanced by glutamate in GT1-7 neurons. *Toxicol. Lett.*, 144, 235-246 (2003).
- **Lovenberg, T.W., Roland, B.L., Wilson, S.J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, R., and Erlander, M.G.** Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol. Pharmacol.*, 55, 1101-1107 (1999).
- **Lozada, A., Munyao, N., Sallmen, T., Lintunen, M., Leurs, R., Lindsberg, P.J., and Panula, P.** Postischemic regulation of central histamine receptors. *Neuroscience*, 136, 371-379 (2005).
- **Lu, J., Greco, M.A., Shiromani, P., and Saper, C.B.** Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J. Neurosci.*, 20, 3830-3842 (2000).
- **Magrani, J., de Castro, E., de Castro, S., Varjao, B., Duarte, G., Ramos, A.C., Athanazio, R., Barbetta, M., Luz, P., and Fregoneze, J.B.** Histaminergic H₁ and H₂ receptors located within the ventromedial hypothalamus regulate food and water intake in rats. *Pharmacol. Biochem., Behav.*, 79, 189-198 (2004).
- **Malmberg-Aiello, P., Lambertini, C., Ghelardini, C., Giotti, A., and Bartolini, A.** Role of the histamine in rodent antinociception. *Br. J. Pharmacol.*, 111, 1269-1276 (1994).
- **Malmberg-Aiello, P., Ipponi, A., Bartolini, A., and Schunack, W.** Mouse light/dark box test reveals anxiogenic-like effects by activation of histamine H₁ receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 71, 321-326 (2002).
- **Manzerra, P., and Brown I. R.** Expression of heat shock genes (hsp70) in the rabbit spinal cord: localization of constitutive and hyperthermia-inducible mRNA species. *J. Neurosci. Res.*, 31, 606-615 (1992).
- **Marcuccilli, C.J., Mathur, S.K., Morimoto, R.I., and Miller, R.J.** Regulatory differences in the stress response of hippocampal neurons and glial cells after heat shock. *J. Neurosci.*, 16, 478-485 (1996).
- **Maruya, M., Sameshima, M., Nemoto, T., and Yahara, I.** Monomer arrangement in hsp90 dimer as determined by decoration with N and C-terminal region specific antibodies. *J. Mol. Biol.*, 285, 903-907 (1999).
- **Mayer R.J.** From neurodegeneration to neurohomeostasis: the role of ubiquitin. *Drug News Perspect.*, 16, 103-108 (2003).
- **McClellan, A. J., and Frydman J.** Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nature Cell. Biol.*, 3, 51-53(2001).
- **McEwen, B.S.** Structural plasticity of the adult brain: how animal help us to understand brain changes in depression and systemic disorders related to depression. *Dialog. Clin. Neurosci.*, 6, 315-329 (2004).
- **Merickel, A., and Edwards, R.H.** Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2. *Neuropharmacology*, 34, 1543-1547 (1995).
- **Miklós, I.H., and Kovács, K.J.** Functional heterogeneity of the response of histaminergic neuron subpopulation to various stress challenges. *Eur. J. Neurosci.*, 18, 3069-3079 (2003).
- **Minami, A., Takeda, A., Nishibaba, D., Takefuta, S., and Oku, N.** Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. *Brain Res.*, 894, 336-339 (2001).

- **Mochizuki, T., Yamatodani, A., Okakura, K., Horii, A., Inagaki, N., and Wada, H.** Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. *Physiol. Behav.*, 51, 391-394 (1992).
- **Molina, A., Biemar, F., Muller, F., Iyengar, A., Prunet, P., Maclean, N., Martial, J.A., and Muller, M.** Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. *FEBS Lett.*, 474, 5-10 (2000).
- **Monti, J.M.** Pharmacology of the histaminergic system. *Pharmacol. Sleep Handbook Exp. Pharmacol.*, 116, 117-142 (1995).
- **Morange, M.** Developmental control of heat shock and chaperone gene expression. *Cell. Mol. Life Science*, 53, 78-79 (1997).
- **Moreno-Delgado, D., Torrent, A., Gomez-Ramirez, J., de Esch, I., Blanco, I., and Ortiz, J.** Constitutive activity of H₃ autoreceptors modulates histamine synthesis in rat brain through the cAMP/PKA pathway. *Neuropharmacology*, 20, 1-7 (2006).
- **Morimoto, R.I., and Santoro, M.G.** Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacological targets for cytoprotection. *Nat. Biotechnol.*, 16, 833-838 (1998).
- **Morisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C.R., Schwartz, J.C., and Arrang, J.M.** High constitutive activity of native H₃ receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature*, 408, 860-864 (2000).
- **Munson, P.J., and Rodbard, D.** LIGAND: a versatile computerize approach for characterization of ligand-binding system. *Anal. Biochem.*, 107, 220-239 (1980).
- **Murakami, H., Sun-Wada, G.H., Matsumoto, M., Nishi, T., Wada, Y., and Futai, M.** Human histamine H₂ receptor gene: multiple transcription initiation and tissue-specific expression. *FEBS Lett.*, 451, 327-331 (1999).
- **Nathan, D.F., Vos, M.H., and Lindquist, S.** In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* hsp90 chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12949-12956 (1997).
- **Nakai, A., Kuroda, S., Kristian, T., and Siesjo, B.K.** The immunosuppressant drug FK506 ameliorates secondary mitochondrial dysfunction following transient focal cerebral ischemia in the rat. *Neurobiol. Dis.*, 4, 288-300 (1997).
- **Nakamura, T., Itadani, H., Hidaka, Y., Ohta, M., Tanaka, K.** Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor H₄R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 75-80 (2000).
- **Nemoto, T., Ohara-nemoto, Y., Takagi, T., and Yokoyama, K.** Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur. J. Biochem.*, 233, 1-8 (1995).
- **Neckers, L.** Hsp90 inhibitors as a novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol. Med.*, 8, 55-61 (2002).
- **Nguyen, T., Shapiro, D.A., George, S.R., Setola, V., Lee, D.K., Cheng, R., Rauser, L., Lee, S.P., Lunch, K.R., Roth, B.L., and O'Dowd, B.F.** Discovery of a novel member of histamine receptor family. *Mol. Pharmacol.*, 59, 427-433 (2001).
- **Nihei, M.K., Desmond, N.L., McGlothan, J.L., Kuhlmann, A.C., and Guilarte, T.R.** N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes are associated with lead-induced deficits of long-term potentiation and spatial learning. *Neuroscience*, 99, 233-242 (2000).
- **Nirenberg, M.J., Chan, J., Liu, Y., Edwards, R.H., and Pickel, V.M.** Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transport-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. *J. Neurosci.*, 16, 4135-4145 (1996).
- **Nover, L., and Shcharf, K.D.** The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription. *Cell Stress Chap.*, 1, 215-223 (1996).
- **Nowak, T.S., Bond, U., and Schlesinger, M.J.** 70 KDa heat shock RNA levels in brain and other tissues after hyperthermia and transient ischemia. *J. Neurochem.*, 54, 451-458 (1990).
- **Obermann, W.M.J., Sondermann, H., Russo, A.A., Pavletich, N.P., and Hartl, R F.U.** In vivo function of hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J. Cell. Biol.*, 143, 901-910 (1998).
- **Ottoni, E.B.** Etholog 2.2: a tool for the transcription and timing of behaviour observation sessions. *Behav. Res. Meth. Instrum. Comp.*, 32, 446-449 (2005).

- **Otsuka, R., Adachi, N., Hamami, G., Liu, K., Yorozuya, T. and Arai, T.** Blockade of central histaminergic system H₂ receptors facilitates catecholaminergic metabolism and aggravates ischemic brain damage in the rat telencephalon. *Brain Res.*, 974, 117-126 (2003).
- **Pan, G., and Dutta, H.M.** The inhibition of acetylcholinesterase activity of juvenile largemouth *Micropterus salmonides* by sublethal concentration of diazinon. *Environ. Res. Sect.*, 79, 133-137 (1997).
- **Pan, F., Zarate, J.M., Tremblay, G.C., and Bradley, T.M.** Cloning and characterization of salmon hsp90 cDNA: upregulation by thermal and hyperosmotic stress. *J. Exp. Zool.*, 287, 199-212 (2000).
- **Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H.** ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J.*, 17, 4829-4836 (1998).
- **Panula, P., Araiksinen, M.S., Pirvola, U., and Kotilainen, E.** A histamine-containing neuronal system in human brain. *Neuroscience*, 34, 127-132 (1990).
- **Panula, P., Takagi, H., Inagaki, N., Yamatodani, A., Tohyma, M., Wada, H., and Kotilainen, E.** Histamine-containing nerve fibers innervate human cerebellum. *Neurosci. Lett.*, 160, 53-56 (1993).
- **Panula, P., Rinne, J., Kuokkanen, K., Eriksson, K.S., Sallmen, T., Kalimo, H., and Relia, M.** Neuronal histamine deficit in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 82, 993-997 (1998).
- **Panula, P., Karlstedt, K., Sallmen, T. Peitsaro, N., Kaslin, J., Michelsen, K.A., Anichtchik, O., Kukko-Lokjanov, T., and Lintunen, M.** The histaminergic system in the brain: structural characteristics and changes in hibernation. *J. Chem. Neuroanat.*, 18, 65-74 (2000).
- **Palmisano, A.N., Winton, J.R., and Dickhoff, W.W.** Tissue specific induction of hsp90 mRNA and plasma cortisol response in Chinook salmon following heat shock, seawater challenge, and handling challenge. *Mar. Biotechnol.*, 2, 329-338 (2000).
- **Parmentier, R., Ohtsu, H., Djebbara-Hannas, Z., Valatx, J.L., Watanabe, T., and Lin, J.S.** Anatomical, physiological and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. *J. Neurosci.*, 22, 7695-7711 (2002).
- **Paul, V., and Balasubramaniam, E.** Effects of single and repeated administration of endosulfan on behaviour and its interaction with centrally acting drugs in experimental animals: a mini review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 3, 151-157 (1997).
- **Peitsaro, N., Anichtchik, O.V., and Panula, P.** Identification of a histamine H₃-like receptor in the zebrafish (*Danio rerio*) brain. *J. Neurochem.*, 75, 718-724 (2000).
- **Pillai, A., Priya, L., and Gupta, S.** Effects of combined exposure to lead and cadmium on the hypothalamic-pituitary axis function in proestrous rats. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 379-384 (2003).
- **Pillot, C., Heron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J.C., and Arrang, J.M.** A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcript in rat brain. *Neuroscience*, 114, 173-193 (2002).
- **Pinot, F., Kreps, S.E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M., and Polla, B.S.** Cadmium in the environment: sources, mechanisms of biotoxicity and biomarkers. *Rev. Environ. Health*, 15, 299-323 (2000).
- **Poirier, J.L., Capek, Y., and De Koninck, Y.** Differential progression of dark neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience*, 97, 59-68 (2000).
- **Portavella, M., Torres, B., and Salas, C.** Avoidance response in goldfish : emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *J. Neurosci.*, 24, 2335-2342 (2004).
- **Prasad, T.A.V., Srinivas, T., Reddy, J.S., and Reddy, D.C.** Atrazine toxicity on transport properties of hemocyanin in the crab (*Oziotelphusa senex*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 30, 124-126 (1995).
- **Prast, H., Tran, M.H., Fischer, H., Lamberti, C., Kraus, M., Grass, K., and Philippu, A.** Histaminergic neurons modulate acetylcholine release in the ventral striatum: role of H₃ histamine receptor. *Arch. Pharmacol.*, 360, 558-564 (1999).

- **Pratt, W.B., and Toft, D.O.** Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70- based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.*, 288, 111-133 (2003).
- **Pratt, W.B., and Toft, D.O.** Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, 18, 306-360 (1997).
- **Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brein, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H.** Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 90, 65-75 (1997).
- **Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Roe, S.M., Piper, P.W., and Pearl, L.H.** The ATPase cycle of hsp90 drives a molecular "clamp" via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J.*, 19, 4383-4392 (2000).
- Prodromou, C., and Pearl, L.H. Structure and *in vivo* function of hsp90. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10, 46-51 (2000).
- **Rabergh, C.M., Airaksinen, S., Soitamo, A., Bjorklund, H.V., Johannson, T., Nikinmaa, M., and Sistonen, L.** Tissue specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J. Exp. Biol.*, 203, 1817-1824 (2000).
- **Rademacher, D.J., Steinpreis, R.E., and Weber, D.W.** Effects of dietary lead and/or dimercaptosuccinic acid exposure on regional serotonin and serotonin metabolite content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Neurosci. Lett.*, 339, 156-160 (2003).
- **Raymond, J.R.** Multiple mechanisms of receptor G-protein signalling specificity. *Am. J. Physiol.* 269 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.*), 38, 141- 158 (1995).
- **Reinboth, R., and Brusle-Sicard, S.** Histological and ultrastructural studies on the effects of hCG on sex inversion in the protogynous teleost *Coris julis*. *J. Fish Biol.*, 51, 738-749 (1997).
- **Richter-Landsberg, C., and Goldbaum, O.** Stress proteins in neural cell: functional roles in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60, 337-349 (2003).
- **Rizk, A., Curley, J., Robertson, J., and Raber, J.** Anxiety and cognition in histamine H₃ receptor ^{-/-} mice. *Eur. J. Neurosci.*, 19, 1992-1996 (2004).
- **Roberge, M., Hakk, H., and Larsen, G.** Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxicol. Lett.*, 154, 61-68 (2004).
- **Robinson, A.J. and Dickenson, J.M.** Activation of p38 and p42/p44 mitogen-activated protein kinase families by the histamine H1 receptor in DDT1MF-2 cells. *Brit. J. Pharmacol.*, 133, 1378-1386 (2001).
- **Rodriguez, F.R., Lopez, J.C., Vargas, J.P., Gomez, Y., Broglio, C., and Salas, C.** Conservation of spatial memory function in the pallial forebrain of reptiles and ray-finned fishes. *J. Neurosci.*, 22, 2894-2903 (2002).
- **Rodriguez, V.M., Thiruchelvam, M., and Cory-Slechta, D.** Sustained exposure to the widely used herbicide atrazine: altered function and loss of neurons in brain monoamine systems. *Environ. Health Perspect.*, 113, 708-715 (2005).
- **Rogers, J.T., and Wood, C.M.** Characterization of branchial lead-calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.*, 207, 813-825 (2004).
- **Rogers, J.T., Patel, M., Gilmour, K.M., and Wood, C.M.** Mechanisms behind Pb-induced disruption of Na⁺ and Cl⁻ balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 289, 463-472 (2005).
- **Rostami, P., Hajizadeh-Moghaddam, A., and Zarrindast, M.R.** The effects of histaminergic agents in the ventral hippocampus of rats in the plus-maze test of anxiety-like behaviors. *Physiol. Behav.*, 87, 891-896 (2006).
- **Rouleau, A., Ligneau, X., Tardivel-lacombe, J., Morisset, S., Gbahou, F., Schwartz, J.C., and Arrang, J.M.** Histamine H₃-receptor-mediated [³⁵S]GTPγ[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H₃ receptors. *Brit. J. Pharmacol.*, 135, 383-392 (2002).
- **Rouleau, A., Héron, A., Véronique, C., Pilot, C., Schwartz, J.C., and Arrang, J.M.** Cloning and expression of the mouse histamine H₃ receptor: evidence for multiple isoforms. *J. Neurochem.*, 90, 1331-1338 (2004).
- **Ruffin, P., Demuynck, S., Hilbert, J.L., and Dhainaut, A.** Stress protein in the polychaete annelid *Nereis diversicolor* induced by heat shock or cadmium exposure. *Biochimie*, 76, 423-27 (1994).

- **Rutherford, S.L., and Zuker, C.S.** Protein folding and the regulation of signalling pathways. *Cell*, 79, 1129-1132 (1994).
- **Ryan, J.A., and Hightower, L.E.** Evaluation of heavy-metal ion toxicity in fish cells using a combined stress protein and cytotoxicity assay. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13, 1231-1240 (1994).
- **Saab, C.Y., and Willis, W.D.** The cerebellum: organization, functions and its role in nociception. *Brain Res. Rev.*, 42, 85-95 (2003).
- **Sakata, T., Yoshimatsu, H., and Kurokawa, M.** Hypothalamic neuronal histamine: implication of its homeostatic control of energy metabolism. *Nut.*, 13, 403-411 (1997).
- **Sakisaka, T., Meerlo, T., Matteson, J., Plutner, H., and Balch, W.E.** Rab-alphaGDI activity is regulated by a hsp90 chaperone complex. *EMBO J.*, 21, 6125-6135 (2002).
- **Sallmen, T., Lozada, A.F., Anichtchik, O.V., Beckman, A.L., Leurs, R., and Panula, P.** Changes in hippocampal histamine receptors across the hibernation cycle in ground squirrels. *Hippocampus*, 13, 745-754 (2003).
- **Santos, N.R., Huston, J.P., and Brandao, M.L.** Blockade of the histamine H2 receptors of the periaqueductal gray and inferior colliculus induces fear-like behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 75, 25-33 (2003).
- **Satcher, D.S.** The surgeon general on the continuing tragedy of child-lead poisoning. *Public Health Rep.* 115, 579-580 (2000).
- **Sathiyaa, R., Campbell, T., and Vijiayan, M.M.** Cortisol modulates hsp90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 129, 679-685 (2001).
- **Scheibel, T., and Buchner J.** The HSP90 complex-a super-chaperone machine as a novel drug target. *Biochem. Pharmacol.*, 56, 675-682 (1998).
- **Scheibel, T., Siegmund, H.I., Jaenicke, R., Ganz, P., Lilie, H., and Buchner, J.** The charged region of hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1297-1302 (1999).
- **Schlicker, E., Fink, K., Detzner, M., and Gorther, M.** Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H₃ receptors. *J. Neural Transm.*, 93, 1-10 (1993).
- **Schmidt, W.F., Hapeman, C.J., Fettinger, J.C., rice, C.P., Bilboulia, S., Coulson, D., McGillivray, L., and Pauli, B.** Structure and asymmetry in the isomeric conversion of β - to α -endosulfan. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1023-1026 (1997).
- **Schmued, L.C., and Hopkins, K.J.** Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874, 123-130 (2000).
- **Scholz, N.L., Truelove, N.K., French, B.L., Berejikian, B.A., Quinn, T.P., Casillas, E. et al.** Diazinon disrupt antipredator and homing behaviours in Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 57, 1911-1918 (2000).
- **Scott, G.R., Sloman, K.A., Rouleau, C., Wood, C.M.** Cadmium disrupt behavioral and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, 206, 1779-1790 (2003).
- **Seyedi, N., Mackins, C.J., Machida, T., Reid, A.C., Silver, R.B., and Levi, R.** Histamine H₃-receptor-induced attenuation of norepinephrine exocytosis: a decreased protein kinase A activity mediates a reduction in intracellular calcium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312, 272-280 (2005).
- **Sharp, F.R., Massa, S.M., and Swanson R.A.** Heat shock protein protection. *Trends Neurosci.*, 22, 97-99 (1999).
- **Sherin, J.E., Elmquist, J.K., Torrealba, F., and Saper, C.B.** Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J. Neurosci.*, 18, 4705-4721 (1998).
- **Shin, C., and Manley, J.L.** Cell signaling and the control of pre-mRNA splicing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5, 727-738 (2004).
- **Sidera, K., Samiotaki, M., Yfanti, E., Panayotou, G., and Patsavoudi, E.** Involvement of cell surface hsp90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system. *J. Biol. Chem.*, 279, 45379-45388 (2004).
- **Siegel, J.M., Nienhuis, R., Gulyani, S., Ouyang, S., Wu, M.F., Mignot, E., Switzer, R.C., McMurry, G., and Cornford, M.** Neuronal degeneration in canine narcolepsy. *J. Neurosci.*, 19, 248-257 (1999).

- **Sloman, K.A., Baker, D.W., Ho, C.G., McDonald, D.G., and Wood, C.M.** The effects of trace metals exposure on agonistic encounters in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.*, 63, 187-196 (2003).
- **Sorell, T.L., and Graziano, J.H.** Effects of oral cadmium exposure during pregnancy on maternal and fetal zinc metabolism in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 102, 537-545 (1990).
- **Sőti, C., Ràcz, A., and Csermeley, P.** A nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of hsp90: N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket. *J. Biol. Chem.*, 277, 7066-7075 (2002).
- **Spieler, R.E., Nelson, C. A., Huston, J.P. and Mattioli, R.** Post-trial administration of H₁ receptor blocker improves appetitive reversal learning and memory in goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci. Lett.*, 277, 5-8 (1999).
- **Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U., and Pavletich, N.P.** Crystal structure of an hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, 89, 239-250 (1997).
- **Steinert, S.A., and Pickwell, G.V.** Expression of heat shock proteins and metallothionein in mussels exposed to heat stress and metal ion challenge. *Mar. Environ. Res.*, 24, 211-14 (1998).
- **Steininger, T.L., Gong, H., McGinty, D., and Szymusiak, R.** Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal-related monoaminergic cell groups. *J. Comp. Neurol.*, 429, 638-653 (2001).
- **Struzynska, L., Chalimoniuk, M., and Sulkowski, G.** Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in lead-exposed adult rat brain. *Neurochem. Int.*, 47, 326-333 (2005).
- **Takeshita, Y., Watanabe, T., Sakata, T., Munakata, M., Ishibashi, H., and Akaike, N.** Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus. *Neuroscience*, 87, 797-805 (1998).
- **Tanabe, S., Watanabe, M., Minh, T.B., Kunisue, T., Nakanishi, S., Ono, H., et al.** PCDDs, PCDFs, and coplanar PCB in albatross from the North Pacific and Southern Oceans: levels, patterns, and toxicological implications. *Environ. Sci. Technol.* 38, 403-413 (2004).
- **Tanguay, R.M., Wu, Y., and Khandjian, E.W.** Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev. Genet.*, 14, 112-118 (1993).
- **Tardivel-Lacombe, J., Rouleau, A., Heron, A., Morisset, S., Pillot, C., Cochois, V., Schwartz, J.C., and Arrang, J.M.** Cloning and cerebral expression of the guinea pig histamine H₃ receptor: evidence for two isoforms. *Neuroreport*, 11, 755-759 (2000).
- **Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., and Anderson, R.L.** A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell. Stress Chap.*, 1, 23-28 (1996).
- **Tobaben, S., Thakur, P., Fernandez-Chacon, R., Sudhof, T.C., Rettig, J., and Stahl, B.** A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron*, 31, 987-999 (2001).
- **Tokita, S., Takahashi, K., and Kotani, H.** Recent advances in molecular pharmacology of the histamine system: physiology and pharmacology of histamine H₃ receptor, roles in feeding regulation and therapeutic potential for metabolic disorders. *J. Pharmacol. Sci.*, 101, 12-18 (2006).
- **Torrent, A., Moreno-Delgado, D., Gomez-Ramirez, J., Rodriguez-Agudo, D., Rodriguez-Caso, C., Sanchez-Jimenez, F., Blanco, I., and Ortiz, J.** H₃ autoreceptors modulate histamine synthesis through calcium/calmodulin- and cAMP- dependent protein kinase pathways. *Mol. Pharmacol.*, 67, 195-203 (2005).
- **Toscano, C.D., McGlothlan, J.L., and Guilarte, T.R.** Lead exposure alters cyclic-AMP response element binding protein phosphorylation and binding activity in the developing rat brain. *Dev. Brain Res.*, 145, 219-228 (2003).
- **Toscano, C.D., and Guilarte, T.R.** Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain Res. Rev.*, 49, 529-554 (2005).
- **Traiffort, E., Leurs, R., Arrang, J., Tardivel-Lacombe, J., Diaz, J., Schwartz, J.C. and Ruat, M.** Guinea-pig histamine H₁-receptor: I. gene cloning, characterization and tissue expression revealed by in situ hybridization. *J. Neurochem.*, 62, 507-518 (1994).

- **Tsuda, K., Yoshimatsu, H., Nijima, A., Chiba, S., Okeda, T., and Sakata, T.** Hypothalamic histamine neurons activate lipolysis in rat adipose tissue. *Exp. Biol. Med. (Mayhood)*, 227, 208-213 (2002).
- **Trentacoste, S.V., Friedmann, A.S., Youker, R.T., Breckenridge, C.B., and Zirkin, B.R.** Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male in rats. *J. Androl.*, 22, 142-148 (2001).
- **Tsuchiya, D., Hong, S., Matsumori, Y., Shiina, H., Kayama, T., Swanson, R.A., Dillman, W.H., Liu, J., Panter, S.S., and Weinstein, P.R.** Overexpression of rat heat shock protein 70 is associated with reduction of early mitochondrial cytochrome C release and subsequent DNA fragmentation after permanent focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 23, 718-727 (2003).
- **Unno, K., Asakura, H., Shibuya, Y., Kaiho, M., Okada, S., and Oku, N.** Increase in basal level of Hsp70, consisting chiefly of constitutively expressed Hsp70 (Hsc70) in aged rat brain. *J. Gerontol.*, 55, 329-335 (2000).
- **van der Goot, H., and Timmerman, H.** Selective ligands as tools to study histamine receptors. *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 5-20 (2000).
- **van Meer, P., and Raber, J.** Mouse behavioral analysis in systems biology. *Biochem. J.*, 389, 593-610 (2005).
- **Vetillard, A., and Bailhache, T.** Cadmium: an endocrine disrupter that affects gene expression in the liver and brain of juvenile rainbow trout. *Biol. Reprod.*, 72, 119-126 (2005).
- **Videira, R.A., Antunes-Madeira, M.C., Lopez V.I., and Madeira, V.M.C.** Changes induced by malathion, metylparathion on membrane lipidic physicochemical properties correlate with their toxicity. *Biochem. Biophys. Acta*, 1511, 360-368 (2001).
- **Vijayan, M.M., Pereira, C., Kruzynski, G., and Iwama, G.K.** Sublethal concentration of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids. *Aquat. Toxicol.*, 40, 101-108 (1998).
- **Vizi, E.S.** Role of high-affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 52, 63-89 (2000).
- **Vohora, D., Pal, S.N., and Pillai, K.K.** Histamine and selective H3-receptor ligands: a possible role in the mechanisms and management of epilepsy. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 68, 735-741 (2001).
- **Vonderschen, K., Bleckmann, H., and Hoffmann, M.H.** A direct projection from the cerebellum to the telencephalon in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci. Lett.*, 320, 37-40 (2002).
- **Waalkes, M.P., Coogan, T.P., and Barter, R.A.** Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22, 175-201 (1992).
- **Walsh, D., Li, Z., Wu, Y., and Nagata, K.** 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 (1997).
- **Wang, L.D., Hoeltzel, M., Butler, K., Hare, B., Todisco, A., Wang, M. and Del Valle, J.** Activation of the human histamine H₂ receptor is linked to cell proliferation and c-fos gene transcription. *Am. J. Physiol.*, 273, 2037-2045 (1997).
- **Weber, D.** Exposure to sublethal levels of waterborne lead alters reproductive behavior patterns in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Neurotoxicology*, 14, 347-358 (1993).
- **Weber, D.N., and Dingel, W.M.** Alterations in neurobehavioral responses in fishes exposed to lead and lead-chelating agents. *Amer. Zool.*, 37, 354-362 (1997).
- **Weber, D.N., and Spieler, R.E.** Behavioral mechanisms of metal toxicity in fishes. In: Malins, D.C., and Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquat. Toxicol.: Biochem. Cell. Perspect.*, CRC Press, London (UK), pp. 421-467 (1994).
- **Weikl, T., Muschler, P., Richter, K., Veit, T., Reinstein, J., and Buchner, J.** C-terminal regions of hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle. *J. Mol. Biol.*, 303, 583-592 (2000).
- **Wellendorph, P., Goodman, M.W., Burstein, E.S., Nash, N.R., Brann, M.R., and Weiner, D.M.** Molecular cloning and pharmacology of functional distinct isoforms of the human histamine H₃ receptor. *Neuropharmacology*, 42, 929-940 (2002).
- **Wendelaar Bonga, S.E.** The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591-625 (1997).

- **Wiedemann, P., Goodman, M.W., Burstein, E.S., Nash, N.R., Brann, M.R., and Weiner, D.M.** Structure of the human histamine H3 receptor gene (HRH) and identification of naturally occurring variations. *J. Neural Transm.*, 109, 443-453 (2002).
- **Wieland, K., Bongers, G., Yamamoto, Y., Hashimoto, T., Yamatodani, A., Menge, W., Timmerman, H., Lovenberg, T.W., and Leurs, R.** Constitutive activity of histamine H3 receptors stably expressed in SK-N-MC cells: display of agonism and inverse agonism by H3 antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 299, 908-914 (2001).
- **Willey, J.B., and Krone, P.H.** Effects of endosulfan and nonyphenol on the primordial germ cell population in pre-larval zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.*, 54, 113-123 (2001).
- **Williams, J.H., Farag, A.M., Stansbury, M.A., Young, P.A., Bergman, H.L., and Petersen, N.S.** Accumulation of hsp70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to metal contaminated water and/or diet. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 1324-1328 (1996).
- **Wood, C.M.** Toxic responses of the gill. In: Schlenk, D., and Benson, W.H. (Eds.), Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. Taylor and Francis, London (UK), pp. 1-89 (2001).
- **Workman, P.** Auditing the pharmacological accounts for hsp90 molecular chaperone inhibitors: unfolding the relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Mol. Canc. Ter.*, 2, 131-138 (2003).
- **Wu, C.** Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 11, 441-469(1995).
- **Wullmann, M.F., and Puelles, L.** Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains. *Anat. Embriol.*, 199, 329-348 (1999).
- **Xue, H.G., Yamamoto, N., Yang, C.Y., Kerem, G., Yoshimoto, M., Imura, K. et al.** Fiber connections of the torus longitudinalis and optic tectum in holocentrid teleosts. *J. Comp. Neurol.*, 462, 194-212 (2003).
- **Yahara, I.** Structure and function of the 90-KDa stress protein Hsp 90. In: Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins. Fink A., Goto Y. (eds), Dekker, New York, pp:183-192 (1998).
- **Yenari, M.A., Giffard, R.G., Sapolsky, R.M., Steinberg, G.K.** The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol. Med. Today*, 5, 525-531 (1999).
- **Yoshimatsu, H., Ysuda, K., Nijima, A., Tatsukawa, M., Chiba, S., and Sakata, T.** Histidine induces lipolysis through sympathetic nerve in white adipose tissue. *Eur. J. Clin. Invest.*, 32, 236-241 (2002).
- **Young, J.C., Schneider, C., and Hartl, F.U.** *In vitro* evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett.*, 418, 139-143 (1997).
- **Young, J.C., and Hartl, F.U.** Polypeptide release by hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J.*, 19, 5930-5940 (2000).
- **Young, J.C., Moarefi, I., and Hartl, F.U.** Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *Cell. Biochem.*, 154, 267-273 (2001).
- **Yuzurihara, M., Ikarashi, Y., Ishige, A., Sasaki, H., Kuribara, H., and Maruyama, Y.** Effects of drugs acting as histamine releasers or histamine receptor blockers on an experimental anxiety model in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 67, 145-150 (2000).
- **Zander, C.D., and Sotje, I.** Seasonal and geographical differences in cleaner fish activity in the Mediterranean Sea. *Helgol. Mar. Res.*, 55, 232-241 (2002).
- **Zawilska, J.B., Woldan-Tambor, A. and Nowak, J.Z.** Histamine H₂-like receptors in chick cerebral cortex: effects on cyclic AMP synthesis and characterization by [³H]tiotidine binding. *J. Neurochem.*, 81, 935-946 (2002).
- **Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., and Voellmy, R.** Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*, 94, 471-480 (1998).
- **Zhu, Y., Michalovich, D., Wu, H-L., Tan, K.B., Dytko, G.M., Mannan, IJ., Boyce, R., Alston, J, Tierney, L.A. and Li, X.** Cloning expression and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol. Pharmacol.*, 59, 434-441 (2001).