

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA AVANZATA

Indirizzo: Biologia Evoluzionistica
XXI ciclo 2005/2008

ALTERAZIONI MORFOLOGICHE E MOLECOLARI DELLO
SVILUPPO EMBRIONALE DI *PODARCIS SICULA* IN SEGUITO AD
ESPOSIZIONE AL CADMIO

Coordinatore

Ch.mo Prof. Laura Fucci

Relatore

Ch.mo Prof. Silvana Filosa

Candidato

Dott. Simoniello Palma

ANNO ACCADEMICO 2007/2008

CAPITOLO 1: IL CADMIO	4
1.1 L'INQUINAMENTO DA METALLI	4
1.2 IL CADMIO.....	5
1.2.1 Storia e proprietà del cadmio	5
1.2.2 Distribuzione e utilizzo del cadmio	5
1.2.3 Effetti e tossicità del cadmio	7
1.2.4 Meccanismi d'azione del cadmio.....	8
1.2.5 I geni coinvolti nella risposta al cadmio	9
1.2.6 Le proteine a funzione protettiva	9
1.2.7 Il destino della cellula dopo l'intossicazione da cadmio.....	12
1.2.8 Effetti del cadmio sulla riproduzione.....	14
1.2.9 Effetti del cadmio sullo sviluppo embrionale	15
CAPITOLO 2: LE PROTEINE A FUNZIONE PROTETTIVA	19
2.1 LE METALLOTIONEINE	19
2.2 IL RUOLO DELLE METALLOTIONEINE	21
2.3 LOCALIZZAZIONE DELLE METALLOTIONEINE	23
2.3.1 Localizzazione delle MT negli ovociti e negli embrioni	24
2.3.2 Localizzazione delle MT nei tessuti adulti	26
2.4 INDUZIONE DELLE METALLOTIONEINE.....	27
CAPITOLO 3: LA REGOLAZIONE DELLO SVILUPPO	30
3.1 I GENI CHE CONTROLLANO LO SVILUPPO EMBRIONALE	30
3.2 I GENI MATERNI.....	30
3.3 I GENI "MASTER" REGOLATORI: I GENI 'HOMEBOX'	31
3.3.1 I geni HOX.....	32
3.3.2 I geni PAX	34
3.3.3 I geni Otx	36
3.4 I GENI REGOLATORI DEL CICLO CELLULARE	38
CAPITOLO 4	40
4.1 SCOPO DEL LAVORO	40
4.2 MODELLO SPERIMENTALE	40
CAPITOLO 5: MATERIALI E METODI	42
5.1 ANIMALI ADULTI	42
5.2 EMBRIONI.....	42
5.3 TRATTAMENTO SPERIMENTALE.....	42
5.4 PRELIEVO	43
5.5 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA MICROSCOPIA OTTICA	44
5.6 MARCATURA DELLA SONDA	46
5.7 ISOLAMENTO DELL'RNA	46
5.8 PRODUZIONE DEI CDNA A SINGOLA ELICA.....	46
5.9 AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION).....	47
5.10 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO.....	47
5.11 PRODUZIONE DEL PLASMIDE RICOMBINANTE	47
5.12 TRASFORMAZIONE DI CELLULE BATTERICHE CON IL PLASMIDE RICOMBINANTE	48
5.13 PURIFICAZIONE DEL PLASMIDE RICOMBINANTE	48

5.14	SEQUENZIAMENTO DEI CDNA.....	48
5.15	ANALISI DI NORTHERN BOT	48
5.16	ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI ED ELABORAZIONE DELLE TAVOLE.....	49
CAPITOLO 6: EFFETTI DEL CADMIO SULLO SVILUPPO EMBRIONALE		50
6.1	ANALISI MACROSCOPICA DEGLI EMBRIONI (IN TOTO)	50
6.1.1	Embrioni di controllo	50
6.1.2	Embrioni trattati	50
6.2	ANALISI MICROSCOPICA	51
6.2.1	Effetti del cadmio sullo sviluppo dell'encefalo	52
6.2.2	Effetti del cadmio sullo sviluppo dell'occhio	54
CAPITOLO 7: EFFETTI DEL CADMIO SULL'ESPRESSIONE E LA LOCALIZZAZIONE DELLE METALLOTIONEINE		66
7.1	LOCALIZZAZIONE DELL'MT-MRNA NEL FOLLICOLO OVARICO	66
7.2	LOCALIZZAZIONE DELL'MT-MRNA NELLA DISCOBLASTULA	66
7.3	LOCALIZZAZIONE DELL'MT-MRNA NEGLI EMBRIONI DI CONTROLLO.....	67
7.4	QUANTIFICAZIONE DEI LIVELLI DI MT-MRNA IN EMBRIONI CONTROLLO E TRATTATI.....	68
7.5	LOCALIZZAZIONE DELL'MT-MRNA NEGLI ORGANI INTERNI DI EMBRIONI TRATTATI.	69
7.6	LOCALIZZAZIONE DELL'MT-MRNA NEL SISTEMA NERVOSO E NELLA RETINA DI EMBRIONI TRATTATI.....	69
CAPITOLO 8: EFFETTI DEL CADMIO SULLA ESPRESSIONE DEI GENI COINVOLTI NELLO SVILUPPO EMBRIONALE: Pax6, Otx2 e Fzr		84
8.1	PAX6	84
8.1.1	Clonaggio e sequenziamento	84
8.1.2	Quantificazione dell'espressione in embrioni di controllo o trattati.....	84
8.1.3	Localizzazione del messaggero e della proteina in embrioni di controllo o trattati ..	84
8.2	OTX2.....	93
8.2.1	Clonaggio e sequenziamento	93
8.2.2	Quantificazione dei livelli di espressione in embrioni di controllo o trattati.....	93
8.2.3	Localizzazione del messaggero in embrioni di controllo o trattati	93
8.3.1	Espressione del messaggero per Fzr in embrioni di controllo o trattati.....	101
8.3.2	Determinazione degli indici di proliferazione	102
CAPITOLO 9: DISCUSSIONE		104
CAPITOLO 10: BIBLIOGRAFIA		111

CAPITOLO 1: IL CADMIO

1.1 L'INQUINAMENTO DA METALLI

Negli ultimi tre secoli molti paesi, soprattutto dell'emisfero settentrionale, sono andati incontro a notevoli cambiamenti dovuti ad un esponenziale incremento delle attività industriali ed agricole. Al rapido incremento di queste attività, purtroppo, non è seguito un altrettanto rapido incremento dei controlli e della prevenzione dei danni causati dalle attività messe in atto. Per questo, nei paesi più industrializzati, si misurano oggi i più alti livelli di inquinamento ambientale; fertilizzanti, erbicidi, scarichi industriali si accumulano nelle aree fortemente mettendo a rischio lo stato dell'ambiente in generale ed in particolare la salute dell'uomo.

Tra le cause di inquinamento una nota a parte meritano i cosiddetti metalli pesanti quali, per esempio, Cr, Pb, Zn, Cd, Al. Questi elementi, che sono componenti minori ed ubiquitari della biosfera, hanno trovato vasta applicazione nel campo industriale (il Pb nella benzina; il Cr nelle vernici; il Cd nelle pile) e, per questo, sono entrati di prepotenza nella vita dell'uomo moderno. Gli effetti dell'aumento della concentrazione di questi metalli sono stati magnificati dal concomitante aumento dell'acidificazione dei terreni che ha determinato un drastico aumento della loro biodisponibilità per tutte le specie vegetali e animali, uomo incluso.

Alcuni metalli sono richiesti dagli organismi in quantità limitata, i metalli Zn, Cu, Fe, e Mg anche se presenti a basse concentrazioni svolgono una serie di attività fondamentali per la cellula, comportandosi come micronutrienti essenziali (Riggio et al., 2002), e partecipano a numerosi processi biochimici responsabili della crescita e della vita cellulare. Lo zinco, per esempio, è coinvolto nei processi di replicazione, trascrizione e traduzione (Hanas et al., 1983; Grummt et al., 1986), funge da cofattore per oltre 200 metalloenzimi (Dixon e Webb, 1979) e svolge funzioni regolative, come nel caso della modulazione della trasmissione sinaptica (Bryce-Smith, 1989). Il rame, a basse concentrazioni, è essenziale per la respirazione, per la difesa dai radicali liberi e per la sintesi e rilascio dei neurotrasmettitori (Cousins, 1985; Prohaska et al., 1990).

Altri metalli, come Cd, Cr, Al e Pb, invece, non sono normalmente presenti nelle cellule neanche in tracce e pertanto, anche a basse concentrazioni risultano molto tossici: questi metalli, infatti, possono causare ritardi nello sviluppo embrionale (Guillou et al., 2000; Au et al., 2001),

nella crescita (Sunderman et al., 1995; Hanna et al., 1997; Calevro et al., 1998; Oskarsson et al., 1998) nonché una lunga serie di patologie, cancro incluso (Lyon, 1993; Frenkel et al., 1994; Hartwing, 1994).

Tra questi metalli, altamente tossici, merita particolare attenzione il Cd non solo per la sua incrementata diffusione ma anche perché è ampiamente utilizzato in molte produzioni industriali poco o per nulla controllate.

1.2 IL CADMIO

1.2.1 Storia e proprietà del cadmio

Il cadmio (Cd) (dal latino cadmia, a sua volta dal greco kadmeia, calamina) è un elemento che si trova in condizioni naturali sulla crosta terrestre. Fu scoperto nel 1817 dal chimico tedesco Friedrich Stromeyer che lo individuò nelle incrostazioni presenti all'interno di una fornace di zinco, tra le impurità della calamina, un minerale a base di carbonato di zinco, notando che alcuni campioni impuri di calamina cambiavano colore per riscaldamento, a differenza della calamina pura. E' un metallo di colore argento-bianco, raro e tossico, con peso atomico di 112,4g mol/l, densità pari 8,64 g/cm³, fonde a 321°C, bolle a 765°C. E' un metallo malleabile, duttile e tenero al punto che può essere tagliato con un normale coltello. Sotto molti aspetti assomiglia allo zinco ma tende a formare composti più complessi di quest'ultimo. Nei suoi composti ha numero di ossidazione +2 può presentarsi sottoforma di acetato, solfuro (pigmento giallo), solfuro di selenio (pigmento rosso) ossido di stearato, carbonato, solfato e cloruro. Molti composti inorganici del Cd, sono molto più solubili in acqua, ad esempio, il cadmio acetato, cloruro e solfato; l'ossido di cadmio e solfuro sono invece praticamente insolubili. L'ossido di cadmio e il carbonato di cadmio possono, tuttavia, essere solubili al pH gastrico. A temperatura ambiente si conserva inalterato per lungo tempo, ma se riscaldato in presenza d'aria si incendia facilmente e si trasforma nel corrispondente ossido, CdO, generando una fiamma brillante.

1.2.2 Distribuzione e utilizzo del cadmio

In natura, il cadmio non si trova allo stato nativo. I minerali di cadmio sono rari e si trovano in piccole quantità e pertanto poco sfruttabili a livello industriale. La Greenockite (CdS), l'unico

minerale di cadmio importante, è quasi sempre associata alla sfalerite (ZnS). Perciò il cadmio viene estratto in genere come sottoprodotto dell'estrazione e della raffinazione dello zinco e, in minor misura, del piombo e del rame. Piccole quantità di cadmio (circa il 10% del consumo totale) provengono dal riciclaggio di rottami di ferro e d'acciaio. La produzione di cadmio negli Stati Uniti iniziò nel 1907, ma l'uso corrente di questo elemento iniziò soltanto dopo la prima guerra mondiale

Dal 1840, i composti del cadmio sono prodotti industrialmente e grazie ai colori brillanti che vanno dal giallo pallido all'arancio intenso, sono oggi utilizzati per la produzione di pigmenti nella preparazione delle vernici. Il cadmio viene anche usato in pelletteria, come agente per la concia.

Il cadmio viene usato soprattutto nella cadmiatura, un trattamento metallurgico mediante il quale esso viene depositato su superfici metalliche, in modo particolare dell'acciaio, per ottenere un sottile strato protettivo. In lega con piombo, stagno e bismuto viene utilizzato per preparare metalli fusibili che trovano impiego nella produzione di varie apparecchiature elettriche; inoltre, in lega con lo zinco, viene usato nella fabbricazione di cuscinetti e nella saldatura.

Il cadmio metallico, grazie all'elevato potere di assorbimento dei neutroni, viene utilizzato nelle barre di controllo per i reattori nucleari. I sali di cadmio trovano impiego in campo fotografico e nella fabbricazione di fuochi artificiali, gomme, vernici fluorescenti, vetri e porcellane. Il solfuro (CdS), un composto giallo chiaro che si ottiene come precipitato da soluzioni di sali di cadmio in cui si faccia gorgogliare solfuro di idrogeno, è usato come pigmento e trova applicazione anche nella realizzazione di celle fotovoltaiche; le celle elettrochimiche a nichel-cadmio inoltre sono ampiamente utilizzate in settori specialistici viene inoltre utilizzato per la produzione delle sigarette

Il suo utilizzo massiccio nel campo industriale lo rende biodisponibile nei diversi ambienti nel suolo, nell'acqua e nell'aria. La sua presenza deriva, infatti,:

- ✓ dalla disgregazione del materiale originario del suolo (rocce)
- ✓ dai fertilizzanti chimici
- ✓ dalla distribuzione dei pesticidi
- ✓ dalle acque di irrigazione, dalla distribuzione dei reflui organici (zootecnici, fanghi di depurazione, composti ed ammendanti)
- ✓ dai residui di processi della combustione
- ✓ dalle industrie siderurgiche e metallurgiche

Il cadmio presente nel suolo deriva dai canali di scarico delle industrie che finiscono principalmente nei terreni e come scoria dai fertilizzanti (ad esempio i fertilizzanti artificiali di fosforo) usati durante le coltivazioni. Dal terreno può passare nella materia organica ed entrare nella catena alimentare diventando estremamente pericoloso.

Nei terreni acidificati il cadmio passa nelle piante e quindi negli animali erbivori accumulandosi nelle loro cellule, tessuti ed organi. Negli organismi, i lombrichi ad esempio, ed i microrganismi che vivono nel terreno sono estremamente sensibili all'intossicazione da cadmio, di conseguenza si influenzano i processi che questi svolgono nel terreno, minacciando l'intero ecosistema del suolo.

Negli ecosistemi acquatici il cadmio può bioaccumularsi in mitili, ostriche, gamberi, aragoste e pesci. La resistenza a tale metallo può variare notevolmente fra gli organismi acquatici: organismi di acqua salata sono più resistenti all'intossicazione da cadmio rispetto agli organismi di acqua dolce.

Nell'aria invece il cadmio viene rilasciato dai processi di combustione (domestica) dei rifiuti e dei combustibili fossili.

1.2.3 Effetti e tossicità del cadmio

Il cadmio è un metallo altamente tossico la cui pericolosità dipende sia dalla notevole capacità di penetrazione nella cellula, sia dal suo lento smaltimento da parte dell'organismo (Nordberg et al., 1994; Schilderman et al., 1997). Il cadmio, infatti, ha un'emivita biologica di circa 30 anni (Usai et al., 1994) e si può quindi facilmente accumulare nei tessuti.

Le indagini eseguite negli anni passati su specie differenti di invertebrati e vertebrati hanno dimostrato che il Cd penetra nell'organismo principalmente attraverso le vie respiratorie (inalazioni di polveri, fumo di sigaretta) e digerenti (alimenti contaminati) e che, da qui, è distribuito, per via ematica, un po' a tutti gli organi (Leroyer et al., 2001). Con l'incremento di concentrazione aumentano significativamente i rischi di patologie e la mortalità (Sorahan et al., 1995; Jarup et al., 1998, Formicki et al., 2008). Il cadmio, può indurre gravi disturbi renali (Stinson et al., 2003), respiratori (Soharan e Esmen, 2004), epatici (Pourahmad et al., 2000), cardiocircolatori (Chmielnicka e Cherian, 1986) e neurologici; ed inoltre è carcinogeno (Sunderman et al., 1992; Iarc, 1993; Yuan et al., 2000) potendo indurre tumori all'intestino

(Martin Mateo et al., 1997), al rene (Waalkes et al., 1992), al sistema riproduttivo maschile (Waalkes e Rehm, 1998; Hoffmann et al., 1988) e al sistema respiratorio (Oberdorster, 1986).

1.2.4 Meccanismi d'azione del cadmio

Il cadmio penetra nella cellula utilizzando i canali del calcio voltaggio dipendenti (Craig et al., 1999) o, in alternativa, i canali associati a recettori transmembrana (Smith et al., 1994; Benders et al., 1996; Beyersmann e Hechtenberg, 1997). Una volta internalizzato esso va a legarsi ai costituenti citoplasmatici e nucleari. In particolare, il cadmio, essendo simile chimicamente allo zinco e al calcio, riesce ad interferire con la loro omeostasi addirittura sostituendoli nei meccanismi di trasporto e nei siti di legame (Gachot e Poujeol, 1992; Kiss e Osipenko, 1994). Il cadmio, si lega direttamente ai residui cisteinici delle proteine (Kagi, 1991) e, con alta affinità, anche ai domini Zinc-binding di molte metalloproteine, interferendo o addirittura bloccando le funzioni cellulari Zn-dipendenti (Gachot e Poujeol, 1992). Ancora, agendo a livello delle membrane, lo ione cadmio causa perossidazione dei lipidi (Gaubin et al., 2000) e, nel nucleo induce strand breaks nel DNA (Hassoun e Stohs, 1996) e inibizione dei meccanismi di riparo (Dally e Hartwich, 1997; Calevro et al., 1998).

È stato dimostrato, inoltre, che il Cd interferisce con i mitocondri alterando l'equilibrio delle specie ossigeno reattive (ROS) (Hassoun e Stohs, 1996; Stohs et al., 2001) e/o inducendo un abbassamento dei livelli di vari enzimi (Casalino et al., 2002) e di fattori antiossidanti quali il glutatione (Chin e Templeton, 1993; Shimizu et al., 1997).

Dalla letteratura disponibile emerge che concentrazioni citotossiche di cadmio esercitano marcati effetti anche sulla sintesi proteica che risulta in alcuni casi inibita (Cohen et al., 1991), in altri marcatamente aumentata. Ne sono un tipico esempio proteine quali i proto-oncogeni (jun, fos e myc) (Jin e Ringertz, 1990; Achanzar et al., 2000; Garrett et al., 2002), i geni soppressori tumorali (p53) (Zheng et al., 1996) e varie proteine a funzione protettiva, come le metallotioneine (Scudiero et al., 1998; 2000; Sato e Kondoh, 2002), le heat shock proteins (Schroder et al., 1999; Somji et al., 1999), la SOD, la catalasi e l'ubiquitina (Muller-Taubenberger et al., 1988). Queste proteine nelle cellule intossicate agiscono con meccanismi diversi: alcune chelano il metallo prevenendone così gli effetti tossici (Sato e Kondoh, 2002); altre rimuovono le specie ossigeno reattive prodotte (Shohs et al., 2001); altre riparano i danni

causati alle membrane plasmatiche e al DNA (Hassoun e Stohs, 1996), o rinaturano le proteine denaturate o degradano quelle irreparabilmente danneggiate (Schroder et al., 1999).

1.2.5 I geni coinvolti nella risposta al cadmio

Grazie all'introduzione di nuove tecniche, come la differential display-PCR e il DNA microarray, negli ultimi anni è stato possibile dimostrare che il cadmio interferisce direttamente con l'attività di numerosi geni e che le varie specie mostrano una differente resistenza al cadmio. In linee cellulari di mammifero, per esempio, il metallo causa l'aumento dell'espressione di circa 80 geni e ne inibisce 28 (Tsangaris et al., 2002); in *Caenorabditis elegans*, invece, il Cd modifica l'espressione di soli 49 geni (Liao et al., 2002).

E' stato ipotizzato che tali alterazioni siano direttamente riconducibili alle variazioni indotte dallo ione sulla concentrazione di cAMP e di calcio intracellulare (Liao et al., 2002) e che l'espressione dei diversi geni sia influenzata dalla specificità cellulare, dallo stadio di sviluppo dell'organismo oltre che da fattori proteici e/o ormonali (Tsangaris e Tzortzatou-Stathopoulou, 1998; Kataranovski et al., 1999; Ishido et al., 1999).

I meccanismi con cui il Cd modula i livelli di espressione dei geni rimangono in gran parte oscuri. In alcuni casi, però, è chiaro che la trascrizione è attivata grazie alla presenza di specifici elementi regolativi che sono localizzati nei promotori dei geni responsivi al metallo. Ne sono un tipico esempio le sequenze MREs (Metal Regulatory Elements) presenti nei promotori dei geni per le MT (Scudiero et al., 2001) e gli elementi responsivi al Cd che sono stati evidenziati nel promotore del gene per l'eme-ossigenasi (Takeda et al., 1994).

1.2.6 Le proteine a funzione protettiva

Notevoli difficoltà nella comprensione dei meccanismi d'azione del Cd derivano anche dal fatto che la risposta della cellula dipende dal tipo di linea cellulare (Beyersmann e Hechtenberg, 1997; Tsangaris e Tzortzatou-Stathopoulou 1998; Kataranovski et al., 1999), dalla concentrazione e dai tempi di esposizione (Tsangaris e Tzortzatou-Stathopoulou, 1998) oltre che dal fatto che nella cellula sono presenti innumerevoli fattori protettivi che esplicano il loro effetto a vari livelli.

Sebbene il meccanismo d'azione del cadmio non sia ancora del tutto noto, quello che è certo è che la cellula è dotata di meccanismi di protezione che, riescono in una certa misura a bloccarne gli effetti. Tra questi meccanismi spicca la funzione di due classi di proteine anti stress: le metallotioneine (MT) e le heat shock proteins (HSPs). Le prime hanno un'azione più specifica anti- metallo (Hamer, 1986), le seconde un'azione più generica anti stress (Giudice et al., 1999).

Le MT sono proteine a basso peso molecolare (6-7 kDa), in grado di complessarsi ai metalli pesanti grazie alla presenza di numerosi residui cisteinici lungo la loro catena (Kagi, 1991). Esse rappresentano una famiglia di proteine altamente conservate, già presenti nei procarioti ed ereditate dagli eucarioti sia vegetali che animali (Hamer, 1986; Scudiero et al., 1994, 1995; 1997; Scudiero, 1997); essendo normalmente espresse nelle cellule, in condizioni fisiologiche, esse svolgono il ruolo fondamentale di sequestrare/rilasciare gli ioni zinco e rame presenti nella cellula, svolgendo così la funzione di modulatori dell'effettiva concentrazione intracellulare di questi due metalli essenziali (Jacob et al., 1998; Maret, 2000). Le MT sono presenti in quasi tutti i tessuti e tipi cellulari anche se sono particolarmente abbondanti nei tessuti parenchimatosi, quali il fegato e il rene (Scudiero et al., 2000) dove svolgono una funzione detossificante.

Oltre alla funzione omeostatica diretta nei confronti dei metalli essenziali, le MT riescono a svolgere la loro funzione detossificante anche nei confronti di metalli non essenziali, come il Cd, che legano neutralizzandoli (Palmiter, 1998). Le MT sono in grado di proteggere la cellula dai danni provocati dal cadmio anche riducendo gli effetti negativi dello stress ossidativo Cd indotto. Queste proteine, infatti, sono in grado di fungere da scavengers dei radicali liberi (Palmiter, 1998). Una delle caratteristiche salienti, certamente fondamentale per la funzione biologica svolta dalle MT, è il fatto che la loro sintesi possa essere indotta in seguito all'esposizione a concentrazioni elevate di metallo delle cellule o dell'organismo stesso. I geni che codificano per le MT hanno, nella regione del promotore, una o più sequenze oligonucleotidiche, lunghe da 12 a 15 paia di basi, note come "Metal Regulatory Elements" (MRE). E' stata formulata l'ipotesi che le sequenze MRE funzionino riconoscendo le proteine specifiche in grado di essere attivate dai metalli pesanti e di legarsi, dopo l'attivazione, al DNA in prossimità del promotore del gene di MT, inducendone l'espressione (Andrews, 1990). Heuchel e coll. (1994) hanno recentemente dimostrato che il fattore di trascrizione MTF-1 si lega specificamente agli MRE attivando la trascrizione del gene delle MT (Andrews, 1990).

Le HSPs costituiscono una categoria di proteine specializzate che proteggono la cellula (Giudice et al., 1999; Garrido et al., 2001). Scoperte recenti hanno dimostrato che la loro funzione protettiva si estende anche agli effetti del Cd (Bauman et al., 1993), anche se i meccanismi effettivi della loro azione non sono ancora del tutto chiariti (Samali e Cotter, 1996). In numerosi vertebrati ed invertebrati è stato dimostrato, per esempio, che l'espressione delle hsp70 (Güven e DePomerai, 1995), hsp 60 e hsp27 aumenta in presenza di cadmio (Kammenga et al., 1998; Schroder et al., 1999; Kim et al., 2001) e, in particolare, che l'espressione dell'hsp60 aumenta in seguito ad esposizione acuta (Curtis et al., 1996). Per quanto riguarda la hsp27, si è visto che, dopo contaminazione, non solo aumenta il suo livello di espressione ma va anche incontro a fosforilazione, catalizzata dalla p38MAP kinase-activated protein kinase (Kato et al., 2001).

Numerosi studi hanno dimostrato che la sintesi delle HSP inizia nella cellula nel momento in cui essa, in condizioni di stress, accumula proteine anormali o denaturate (Hightower, 1991; Anathan et al., 1986; Lee and Hahn, 1988). Infatti, il primo meccanismo che si verifica nella cellula in caso di tossicità, causata da condizioni chimiche e fisiche avverse, è la denaturazione delle proteine mediante indebolimento dei legami polari ed esposizione dei loro gruppi idrofobici (Wedler, 1987). Riferendoci agli effetti che il cadmio esercita sulle proteine, è noto che esso può interagire con i gruppi tiolici delle stesse, e sostituirsi allo zinco (Vallec e Ulmer, 1972). La sintesi delle HSP è regolata dal legame delle HSP stesse, già presenti nelle cellule, alle proteine denaturate determinando il rilascio del fattore di trascrizione (HSF) dal complesso (HSP-HSF) inattivo. È noto, dunque, che l'HSF pur essendo presente nelle cellule animali non stressate, si attiva, solo in risposta allo stress, mediante un processo post-trascrizionale (Güven e De Pomerap, 1995). L'HSF attivo, infatti, migra nel nucleo e si lega al promotore del gene delle HSP attivandone la trascrizione (Morimoto, 1993). Le HSP così prodotte, si legano alle proteine cellulari, e le stabilizzano.

Nella cellula sono presenti molte altre molecole che svolgono funzione omeostatica e che, pertanto, possono entrare in gioco nel momento in cui il cadmio inizia a causare alterazioni significative. Tra queste meritano di essere citati il glutathione, per il suo coinvolgimento diretto nel controllo dei radicali liberi, e i vari membri della famiglia di bcl2, la cui funzione è legata all'omeostasi del calcio. Il ruolo di questi due fattori durante l'intossicazione da cadmio sarà descritta più avanti.

1.2.7 Il destino della cellula dopo l'intossicazione da cadmio

Le proteine a funzione protettiva svolgono un ruolo fondamentale per la cellula, ma i loro effetti non sempre sono sufficienti a bloccare l'azione del metallo. In relazione all'entità degli effetti subiti, può la cellula ritornare alla condizione iniziale o andare incontro ad un'alterazione del normale ciclo cellulare e avviare, in alternativa, processi di proliferazione o di morte (Tsangaris e Tzortzatou-Stathopoulou, 1998; Hart et al., 1999; Zou et al., 1999; Habeebu et al., 2000; Somji et al., 2002). In particolare, nel fegato, è stato dimostrato che un'esposizione acuta al Cd induce morte (apoptosi e necrosi) mentre un'esposizione cronica induce morte (apoptosi) e proliferazione (rigenerazione e iperplasia) (Habeebu et al., 1998; 2000).

Il fatto che il cadmio interferisca con l'omeostasi tissutale ha suggerito, tra l'altro, che il metallo alteri, o meglio inibisca, le gap junctional intercellular communication (GJIC) (Jeong et al., 2000). Queste non solo sono essenziali per una corretta omeostasi (Guthrie e Gilula, 1989; Holder et al., 1993; Trosko et al., 1998), ma la loro assenza risulta chiaramente legata all'insorgenza di moltissimi tumori (Yamasaki et al., 1991; 1999). Jeong et al. (2000) hanno dimostrato chiaramente che nel fegato il cadmio induce una riduzione dose- e tempo- dipendenti delle due principali componenti proteiche della GJIC, la connessina 26 (Cx26) e la connessina 32 (Cx32) (Temme et al., 1998). Non è chiaro, al momento, se tale riduzione dipende da una alterazione dello stato di fosforilazione della proteina, da una riduzione dell'espressione e/o della stabilità dei messaggeri o, piuttosto, da una aumentata degradazione della proteina stessa (Baker et al., 1995; Cesen et al., 1998; Saez et al., 1998; Temme et al., 1998).

Esperimenti condotti sulle cellule di fegato e di cervello di ratto (Beyersmann et al., 1994) hanno suggerito che il cadmio esercita il suo effetto proliferativo interagendo con la protein chinasi C, enzima noto per il suo ruolo nei meccanismi di crescita e differenziamento cellulare (Beyersmann et al., 1994). Si presuppone, infatti, che il cadmio si sostituisca allo zinco nel dominio regolatore della PKC favorendo il legame dell'enzima ad una proteina di 105kDa.

Per quanto riguarda la morte cellulare è stato dimostrato che il Cd, come altri metalli, può causare fenomeni di necrosi e di apoptosi. La necrosi è un processo di morte caratterizzato dalla permeabilizzazione della membrana plasmatica, dalla rapida lisi cellulare con liberazione degli enzimi (Robertson e Orrenius, 2000) e conseguente risposta infiammatoria del tessuto circostante. L'apoptosi, invece, è un meccanismo in cui i materiali cellulari si disintegrano all'interno di un corpo apoptotico, senza insorgenza di risposta infiammatoria (Oberhammer et

al., 1992). Per molto tempo si è ritenuto che questi due processi fossero in qualche modo alternativi: in particolare, che l'apoptosi fosse una forma di suicidio cellulare innescata da un segnale molecolare e realizzata sotto lo stretto controllo di specifici geni di morte (Wyllie et al., 1980). Per questo motivo, l'apoptosi è sempre stata associata a fenomeni fisiologici di mantenimento e rimodellamento tissutale. Al contrario, la necrosi, considerata un meccanismo patologico di risposta, pur verificandosi senza un controllo genetico diretto da parte della cellula, è sempre indotto da eventi tossici non fisiologici, quali l'esposizione a contaminanti, radiazioni o agenti patogeni. Evidenze recenti hanno dimostrato che, almeno in determinate linee cellulari, si verificano alcuni eventi molecolari che, sebbene siano ritenuti caratteristici dell'apoptosi, in realtà si attuano anche nella cellula in necrosi. Attualmente si pensa che i due processi siano manifestazioni alternative della morte cellulare (Chautan et al., 1999; Proskuryakov et al., 2003).

Al momento non è chiaro come le alterazioni indotte dal cadmio attivino la morte cellulare tuttavia sono state ipotizzate due vie: quella mitocondriale e quella del reticolo endoplasmatico, che sono verosimilmente interconnesse e che trasferiscono entrambe il segnale di morte a valle, sulla cascata delle caspasi (Thornberry e Lazebnik, 1998). Il primo meccanismo prevede che il cadmio determini, direttamente o indirettamente, danni al DNA, attraverso stress ossidativo (Hassoun e Stohs, 1996) e/o riduzione dei livelli intracellulari di glutathione (Shimizu et al., 1997). Come conseguenza si verificherebbe una sovra-espressione di p53 e, quindi, di Bax (Beyersmann e Hechtenberg, 1997) che, passando dal citosol al mitocondrio, favorirebbe il rilascio del citocromo c (Kondoh et al., 2001) e dei fattori AIF (Arnoult et al., 2002) e, l'attivazione della caspasi 9 (Zou et al., 1999; Watjen et al., 2002) e, quindi a cascata, della caspasi 3 esecutrice (Green e Reed, 1998; Kondoh et al., 2002). Il ruolo dei ROS (reactive oxygen reattive) nella risposta al Cd è confermato dall'osservazione che la tossicità dello ione è ridotta dalla presenza di specifici antiossidanti che lavorano come scavengers, come DMSO, mannitolo, catalasi e SOD (Pourahmad et al., 2000; Ercal et al., 2001). Il secondo meccanismo prevede che il Cd, legandosi ad un metallo-recettore di membrana, mobiliti il calcio dal reticolo endoplasmatico (Beyersmann e Hechtenberg, 1997), e la conseguente traslocazione della calpaina nel reticolo e l'attivazione, via caspasi 12, della cascata delle caspasi (Nakagawa et al., 2000; Nakagawa e Yuan, 2002). Delle due ipotesi, tuttavia, nessuna è sostenuta da evidenze sperimentali conclusive, infatti, ulteriori complicazioni sono determinate dalle variazioni del calcio, citosolico che possono attivare la morte cellulare interferendo direttamente con l'attività dei mitocondri attraverso l'aumento della loro permeabilità (Gunter e Gunter, 2001).

La concentrazione intracellulare dei ROS é regolata dal glutatione (GSH), che agisce come cofattore della glutatione-S-trasferasi, come agente riducente della perossidasi o come scavenger dei radicali liberi (Reed, 1991). Il cadmio interferisce con l'equilibrio fisiologico tra forma ridotta e ossidata di glutatione principalmente attraverso due vie: direttamente, mediante legame con le molecole di GSH ed inibizione dell'attività e/o dell'espressione di enzimi coinvolti nella sintesi del glutatione o, indirettamente, tramite induzione di stress ossidativo e perossidazione lipidica delle membrane (Gaubin et al., 2000).

Un'altra molecola con proprietà antiossidanti che da tempo è nota per le sue funzioni anti morte, è Bcl-2 (Garcia et al., 1992; Hockenbery et al., 1993). Questa sembra esercitare un ruolo protettivo anche nei confronti della morte cadmio-indotta (Kim et al., 2000; Biagioli et al., 2001) ma i meccanismi con cui essa esplica tale ruolo non sono ancora del tutto noti.

Tra le molecole che modulano gli effetti del cadmio vanno, infine, menzionati, per la loro importanza, anche i fattori di crescita/ormonali. Questi, normalmente, sono indispensabili per la sopravvivenza cellulare perché ne regolano il metabolismo e la funzionalità controllando così anche i meccanismi di crescita e morte (Kummer et al., 1997; Gleichmann et al., 2000). È stato dimostrato che, nelle cellule trattate con cadmio, la sintesi, l'azione (Telford et al., 1997) e il rilascio (Paksy et al., 1997; Mueller et al., 1998; McAleer e Tuan, 2001) di tali fattori possono subire variazioni significative e che queste, a loro volta, modificano profondamente il destino cellulare.

1.2.8 Effetti del cadmio sulla riproduzione

Il cadmio esercita effetti considerevoli anche sulla riproduzione, sia maschile che femminile. Distribuito dal circolo sanguigno, raggiunge direttamente gli organi coinvolti nel processo riproduttivo. Tale metallo è stato ritrovato nelle gonadi dei pesci (Tilton et al., 2003), dei rettili (Rie et al., 2001), dei mammiferi (Piasek e Laskey, 1994), e vi si accumula, alterando i processi di sintesi e rilascio degli ormoni e, in particolare di quelli steroidei (McLachlan, 2001; Stoica et al., 2000). Il cadmio, infatti, sarebbe in grado di inibire le vie di trasduzione del segnale nell'ipofisi e nelle gonadi stesse (Singhal et al., 1985; Piasek e Laskey, 1994; Thomas, 1999) e di inibire direttamente gli enzimi coinvolti nella steroidogenesi (Singhal et al., 1985). Il cadmio gioca il ruolo di distruttore chimico endocrino (EDC) andando a mimetizzare o inibire l'azione degli estrogeni endogeni (McLachlan, 2001). Il cadmio, infine, interferisce direttamente con i

recettori degli estrogeni sia legandosi ai recettori stessi sia inibendone la trascrizione (Le Guèvelet et al., 2000; Stoica et al., 2000), sostituendosi allo zinco nei motivi zinc-finger.

L'esposizione al cadmio causa un significativo accumulo di tale ione anche nelle uova. Questo risulta particolarmente significativo nelle uova di tipo teleolecitico nelle quali si verifica un massiccio accumulo di materiali nutritivi essenziali per l'embrione. I metalli entrano passivamente in queste uova legati alle VTG, la più nota molecola nutrizionale, che è sintetizzata nel fegato e trasportata all'ovocita mediante il torrente circolatorio. È stato recentemente dimostrato che il cadmio altera l'espressione delle VTG (Foran et al., 2001) e che si accumula nell'ovocita (Ghosh e Thomas, 1995).

Anche nei maschi, il cadmio altera le normali funzioni degli organi riproduttori riducendone significativamente la fertilità. Kech et al., (1995) conducendo esperimenti sull'uomo hanno dimostrato che la concentrazione di cadmio nel plasma seminale dipende dalle condizioni lavorative, dall'alimentazione e dal fumo di sigarette: la sua concentrazione aumenta, infatti, significativamente nei soggetti più esposti, i quali sono meno fertili. Studi in vitro hanno evidenziato che il cadmio altera la motilità degli spermatozoi e la loro capacità di penetrazione nella cellula uovo, (Dwivedi et al 1995; Alabi et al., 1995) in quanto esso agisce sull'enzima acetilcolina trasferasi e sull'uptake dell'ossigeno, alterandoli.

Il cadmio agisce anche sulla vascolarizzazione testicolare; nei ratti, (Laskey et al., 1995) si verifica una diminuzione del volume testicolare, oltre che una diminuzione della concentrazione dello sperma, ed un aumento della concentrazione di FSH nel siero, nonché una diminuzione della concentrazione di testosterone nelle cellule di Leydig (Danielsson et al., 1995; Laskey et al., 1995).

1.2.9 Effetti del cadmio sullo sviluppo embrionale.

Lo sviluppo embrionale è un processo finemente regolato da fattori sia interni (fattori di crescita) che esterni (luce, temperatura).Variazioni di uno o più fattori possono portare ad alterazioni del normale sviluppo embrionale.

Numerosi studi, inoltre, hanno dimostrato che il Cd ha un effetto teratogeno o, addirittura letale, correlato alla dose e al tempo d'esposizione (Perez-Coll et al., 1985; Meinelt et al., 2001; Gomot, 1998).

La modalità con cui il cadmio raggiunge l'embrione è diversa a seconda delle specie, vivipare ed ovipare. Nelle prime il cadmio raggiunge l'embrione soprattutto durante le fasi molto precoci dell'organogenesi, quando cioè esso è a contatto diretto con l'utero (Ahokas e Dilts, 1979) visto che, successivamente, la placenta costituisce un'efficace barriera al passaggio del cadmio dalla madre al feto (Ahokas e Dilts, 1979; Trotter et al., 2002). Nelle forme ovipare sottoposte ad esposizione diretta, le membrane ovariali, invece, non sembrano in alcun momento avere effetti protettivi di rilievo. In un rettile lacertiliano, per esempio, è stato chiaramente dimostrato che esse sono permeabili allo ione che, così, si accumula nell'embrione (Brasfield et al., 2004).

Analisi più approfondite hanno dimostrato che il cadmio altera e addirittura blocca le prime fasi embrionali in una grande varietà di organismi (Congiu et al., 1994; Perez-Coll et al., 1986; Fernandez et al., 2003; Spahn e Sherry, 1999; Kertesz e Francsi, 2003). A tale proposito sono state condotte analisi su diverse specie. Nei pesci, per esempio, soprattutto quando il dosaggio del contaminante raggiunge livelli elevati (Hansen et al., 2002), si verifica un aumento esponenziale della mortalità (Garcia et al., 1999). In diverse specie di teleostei (Sangalang e O'Halloran, 1972; Brown et al., 1994; Cheng et al., 2000) è stato dimostrato che da uova intossicate nascono embrioni con evidenti anomalie nello sviluppo e con limitata vitalità per cui la mortalità è elevata (Cheng et al., 2000). Recenti studi hanno evidenziato che gli embrioni di *Danio rerio*, incubati con Cd, sono soggetti ad un'elevata mortalità, quelli che invece riescono a sopravvivere presentano malformazioni più o meno visibili (Weir et al., 1990). Tramite analisi di microscopia confocale associata ad analisi di microscopia a fluorescenza si è potuto notare che in queste specie, sebbene non si notino significative variazioni a livello delle branchie, degli occhi, e della lunghezza del corpo, sono presenti congenite malformazioni dell'aorta (Cheng et al., 2000).

Negli anfibi, invece, è stato dimostrato che il cadmio blocca la metamorfosi e, con essa, tutti i processi differenziativi connessi (Flament et al., 2003). Nei mammiferi (Baranski, 1984) e negli uccelli (Spahn e Sherry, 1999) l'esposizione causa la nascita di piccoli sottopeso e con ritardi nelle capacità locomotorie.

L'alta mortalità embrionale comunque sembra essere legata all'insorgenza di malformazioni interne ed esterne (Salvatori et al., 2004). Cambiamenti ottenuti nei topi, dopo esposizione al cadmio si manifestano sottoforma di alterazioni nella pigmentazione (Plownan et al., 1994; Nguyen e Janssen, 2002), nello sviluppo ed organizzazione della muscolatura, a livello dei somiti

(Hen Chow e Cheng 2003), dell'occhio (Sunderman et al., 1991), delle cinture e degli arti (Plownan et al., 1994; Padmanabhan e Hameed, 1990; Layton e Layton, 1979), e della volta buccale (Mulvihill et al., 1970; Sunderman et al., 1991). Nei mammiferi elevate concentrazioni di cadmio alterano la formazione dello smalto dei denti (Gerlach et al., 2000), il metabolismo del gruppo eme nel fegato (Prasad e Datta, 1984) e induce evidenti displasie in rene, intestino e cuore (Plownan et al., 1994). Queste malformazioni non sono tipiche solo dei vertebrati ma si riscontrano anche in numerosi invertebrati (Gomot, 1998).

L'esposizione al metallo durante la vita embrionale, provoca danni anche all'individuo adulto che può mostrare, per esempio, evidenti alterazioni nella capacità riproduttiva. In questi casi si osservano alterati livelli di steroidi (Baranski, 1984; Foran et al., 2002; Salvatori et al., 2004) e/o un ridotto sviluppo e differenziamento della gonade, caratterizzato da una considerevole scarsità di cellule germinali e da una difettosa maturazione dei gameti (Tam e Liu, 1985).

Le maggiori alterazioni Cd-indotte che si manifestano nell'embrione sono soprattutto legate ad un aumento della frequenza di cellule in apoptosi (Chan e Cheng, 2003). In effetti, è stato dimostrato che dopo trattamento con Cd si verifica una up-regulation di p53, p21 e bax associata ad una down-regulation di Bcl-2 (Fernandez et al., 2003). Questo effetto sarebbe legato, tra l'altro, alla capacità del cadmio di danneggiare il DNA (Fernandez et al., 2003).

Ulteriori indagini hanno dimostrato che il Cd può determinare anche alterazioni che riguardano la capacità delle cellule di controllare la proliferazione ed il differenziamento. A tale proposito è stato dimostrato che nei topi il trattamento con cadmio può indurre inibizione (Nayak et al., 1989) e stimolazione (Konecki et al., 2000; Misra et al., 2003) dei processi mitotici. L'azione può essere esercitata mediante l'attivazione di alcuni oncogeni ed inibizione di altri (Fang et al., 2002).

Un ulteriore e importante meccanismo con cui il cadmio può alterare lo sviluppo embrionale è modificare la capacità delle cellule di legarsi e interagire tra loro. È stato dimostrato, infatti, che il metallo non solo riduce l'adesione cellulare (Thompson e Bannigan, 2001), alterando la produzione di caderine in diversi distretti dell'embrione (Pearson et al., 2003; Chen e Hales, 1994), ma riduce anche il numero di giunzioni gap (Jeon et al., 2001).

È noto comunque che gli effetti del cadmio sullo sviluppo embrionale possono essere attenuati dalla presenza di numerosi fattori protettivi. Innanzitutto, dalle metal binding proteins e, in particolare, dalla presenza di metallotioneine e/o del loro messaggero. Questa è stata documentata negli embrioni di varie specie di vertebrati (Riggio et al., 2003). Un ulteriore effetto

protettivo è esercitato anche dalle proteine antistress. Gli embrioni, infatti, sebbene normalmente contengano heat shock proteins (hsp), ne aumentano considerevolmente la produzione quando vengono in contatto con il metallo (Papaconstantinou et al., 2003; Roccheri, et al., 2004).

Infine, è stato dimostrato che gli effetti del cadmio sugli embrioni sono strettamente dipendenti dai livelli cellulari di calcio (Gill e Epple, 1992; Meinelt et al., 2001) e zinco (Webb, 1987; Barlow e Sullivan, 1981; Warner et al., 1984; Herkovits e Perez-Coll, 1990). Quando questi due elementi sono presenti in dosi elevate viene esercitato un marcato effetto protettivo in quanto essi competono con il cadmio stesso direttamente o, indirettamente, inibendo i processi apoptotici (Fernandez et al., 2003).

CAPITOLO 2: LE PROTEINE A FUNZIONE PROTETTIVA

2.1 LE METALLOTIONEINE

Le metallotioneine sono un gruppo di proteine di origine molto antica, la cui struttura si è conservata quasi immutata nel corso dell'evoluzione. Ciò suggerisce che queste proteine sono coinvolte in processi fisiologici di importanza fondamentale per la cellula. Le metallotioneine (MT) sono le più note tra un vasto gruppo di enzimi, denominati “metal-binding-protein”, in grado di interagire con i metalli. Sebbene la loro funzione biologica non sia ancora del tutto chiara, è noto che esse giocano un ruolo importante nell'omeostasi dei metalli traccia, quali lo zinco e il rame e che esercitano un'azione detossificante nei confronti dei metalli pesanti (Palmiter, 1978).

Sono proteine a basso peso molecolare (6-8 Kda) hanno una tipica composizione aminoacidica con elevato contenuto in cisteina, e assenza o basso contenuto in aminoacidi aromatici; una struttura primaria con una distribuzione delle cisteine caratteristica (Cys-X-Cys); elevato contenuto in metalli pesanti.

Le metallotioneine furono scoperte nel 1957 da ricercatori interessati allo studio dei costituenti cellulari responsabili dell'accumulo di cadmio nelle cellule renali equine (Margoshes e Vallee, 1957). Il termine “metallotioneina” fu coniato per indicare una proteina isolata dalla corteccia renale equina (Kagi e Vallee, 1960), ricca di zolfo, contenente cadmio e zinco; successivamente è stato utilizzato per individuare tutte le proteine a basso peso molecolare con caratteristiche simili alla metallotioneina equina.

In un primo momento le MT furono suddivise in 3 classi: nella classe I le MT con struttura primaria correlabile a quella delle MT dei mammiferi, nella II le MT la cui sequenza non presentava omologia con le MT dei mammiferi, e nella III classe i metallopeptidi atipici costituiti da unità gamma-glutamil-cisteiniche aventi alcune proprietà in comune con le MT. Successivamente le metallotioneine sono state classificate sulla base della omologia di sequenza ed alle relazioni filogenetiche, da Binz e Kagi come una superfamiglia suddivisa in famiglie (MT dei vertebrati) e sottofamiglie (es. MT dei teleostei, MT dei mammiferi) (Binz e Kagi 1999).

In tutti i vertebrati, il gene che codifica per le MT ha una struttura tripartita costituita da tre esoni intervallati da due introni alle posizioni aminoacidiche 9 e 31 o 32 (Gedamu, 1993).

Nella maggior parte delle specie studiate, le MT mostrano polimorfismo genetico. Le isoforme codificate da geni non allelici, possono essere separate mediante cromatografia a scambio ionico o elettroforesi (Richards, 1991) e si è convenuto di identificarle con le sigle MT 1, MT 2 etc. Nei mammiferi sono state identificate quattro isoforme di MT (MT1, MT2, MT3, MT4) (Binz e Kagi 1999). Le due principali isoforme MT1 ed MT2 sono presenti nella maggior parte degli organi e possono essere indotte da una vasta gamma di stimoli, come ioni metallici e citochine. Tuttavia le MT3 ed MT4 sono specificamente espresse nel sistema nervoso centrale, e nell'epidermide, rispettivamente e non hanno alcuna risposta agli induttori (Hamer 1986; Palmiter 1987). In particolare dal tessuto renale di feto umano è stata purificata una isoforma, denominata MT-0 (Soumillion, 1992); nel tessuto cerebrale umano e' stata caratterizzata una MT, detta MT3, costituita da 68 aminoacidi, abbondante nel cervello di individui sani. Nel 1990 Uchida e collaboratori mentre conducevano studi sul morbo di Alzheimer, scoprirono che i cervelli estratti da pazienti affetti da tale morbo contenevano una quantità ridotta di MT3 (Uchida , 1991); e topi che non esprimevano tale forma di MT erano più suscettibili a processi neurodegenerativi associati ad epilessia indotta. Infine, una MT denominata MT 4, codificata da un gene ancora diverso dai precedenti, è stata isolata dal tessuto epiteliale murino e umano(Quaife,1994).La diversa distribuzione e regolazione nei tessuti suggerisce che tali proteine possono svolgere funzioni diverse.

La composizione aminoacidica delle MT è caratterizzata dalla presenza di residui cisteinici, che rappresentano circa la terza parte del totale degli aminoacidi. La maggior parte delle MT contiene anche quantità apprezzabili di aminoacidi basici come la lisina e, occasionalmente, l'arginina. La restante composizione aminoacidica è variabile e non contiene di norma aminoacidi aromatici o istidina (Uccida, 1991).

La struttura primaria, determinata mediante le tecniche convenzionali di sequenziamento delle proteine, è nota per varie decine di MT di vertebrati. Tutte le MT dei vertebrati fin ora caratterizzate risultano costituite da una singola catena polipeptidica contenente da 60 a 68 aminoacidi. Le MT di ciascuna classe di vertebrati presentano una sequenza N-terminale indicativa della classe di appartenenza: le MT di Pesci, Uccelli e Mammiferi hanno, rispettivamente, 3, 5 e 4 residui aminoacidici localizzati a monte del primo residuo cisteinico. Tutte le MT dei Vertebrati hanno 20 residui cisteinici, 19 dei quali sono completamente conservati. La maggior parte di essi sono organizzati in motivi Cys-Cys,Cys-X-Cys e Cys-X-Y-Cys in cui X e Y sono residui aminoacidici diversi dalla cisteina. Nelle MT di mammifero,

che sono le più numerose presenti nelle banche dati, oltre 30 residui sono invariati e le posizioni dei residui basici sono completamente conservate; le sostituzioni aminoacidiche interessano soprattutto la metà amminotermine della proteina (Uchida, 1991).

L'abbondanza di cisteina e la sua disposizione in sequenze caratteristiche predispongono le MT a formare complessi con gli ioni dei metalli pesanti. La presenza del metallo determina la struttura tridimensionale della proteina, come è stato dimostrato mediante indagini strutturali di diffrazione cristallografica ai raggi x e risonanza magnetica nucleare (NMR) (Waalkes, 1988). La formazione di legami metallotiolici tra le cisteine e gli atomi di metallo causa il ripiegamento della catena polipeptidica che non presenta alfa eliche e foglietti beta. Le 20 cisteine presenti in una catena formano ponti con ioni di metalli adiacenti costituendo due distinti clusters: un cluster N-terminale, denominato beta, che contiene 9 cisteine e lega 3 ioni metallici bivalenti, ed un cluster C-terminale, denominato alfa che contiene 11 cisteine e lega 4 ioni metallici bivalenti, formando una struttura tipo biciclonoanano. La formazione dei complessi metallotiolici è un processo ordinato che inizia nel cluster C-terminale. Solo dopo la saturazione dei siti disponibili in tale cluster, i metalli complessano i residui cisteinici del cluster N-terminale. La struttura a cluster, dove gli ioni metallici sono disposti tetraedicamente mediante i ponti e le cisteine terminali, è importante per la funzione delle metallotioneine (Winge e Miklossy 1982).

Le MT di mammifero legano essenzialmente zinco ma possono legare altri metalli in relazione al tessuto di origine, all'età e allo stadio di sviluppo (Webb, 1987). Per esempio è noto che le MT isolate dal rene contengono più rame e cadmio rispetto a quelle del fegato dello stesso organismo (Suzuki, 1979; Zelazowski, 1980). La quantità di metallo per mole di proteina è costante ed ammonta a 7 equivalenti di zinco o cadmio (Kojima, 1976).

2.2 IL RUOLO DELLE METALLOTIONEINE

Le metallotioneine sono presenti in quasi tutti i tipi cellulari e svolgono il ruolo fondamentale di sequestrare/rilasciare gli ioni zinco e rame presenti nella cellula, svolgendo così la funzione di modulatori dell'effettiva concentrazione intracellulare di questi due metalli essenziali (Jacob, 1998; Maret, 2000).

In particolar modo, in condizioni naturali, il ruolo delle MT è quello di sequestrare zinco, mantenendo bassa la concentrazione di zinco libero nella cellula; il ruolo delle MT, però, può cambiare da accettore a donatore di ioni zinco quando gli ioni sono richiesti in quantità massiva dalla cellula, per esempio durante la proliferazione cellulare (Vallee e Maret,1993).

Si ritiene che le MT fungano da deposito e da trasportatori intracellulari di zinco e che siano in grado di rilasciare e ridistribuire lo zinco nella cellula in situazioni di emergenza (Cheria e Chan,1993). Sebbene il legame delle MT con lo zinco sia molto forte, la proteina può cedere almeno uno dei suoi atomi di metallo ad apoenzimi. Inizialmente erano stati ipotizzati meccanismi di trasferimento diretto dei metalli dalle MT ai metalloenzimi (Udom e Brady,1980), ma in seguito le evidenze sperimentali hanno dimostrato che la distribuzione cellulare dei metalli è realizzata secondo processi più complessi: i clusters metallotiolici delle MT possono interagire con appropriati ligandi tra i quali il più studiato è il glutatione. Il glutatione è una molecola capace di mobilitare i metalli in base al suo stato redox. La Zn-MT da fegato di coniglio può interagire con il glutatione ossidato con concomitante rilascio di zinco (Maret, 1994). Viceversa il complesso MT-glutatione ridotto protegge i gruppi metallotiolici bloccando il rilascio dello zinco. La concomitante presenza della coppia redox glutatione ridotto/glutatione ossidato incrementa di dieci volte la capacità di rilascio dello zinco da parte della metallothioneina (Jiang 1998). Il ciclo di ossidoriduzione del glutatione e la sua interazione con le MT espletano un ruolo chiave nella distribuzione cellulare dei metalli.

Le MT hanno un ruolo anche nella modulazione del ciclo di ossido-riduzione del rame: in condizioni riducenti (Cu/ascorbato) esse legano efficacemente il rame, mentre possono rilasciarlo in condizioni ossidanti (Cu/ascorbato + H₂O₂) (Fabisiak,1999).

Il ruolo biologico delle MT è stato chiarito studiando l'effetto dell'inattivazione dei geni codificanti le MT nei topi e l'effetto dell'amplificazione genica delle MT in linee cellulari isolate. E' stato dimostrato che topi transgenici che non esprimono le MT si sviluppano in maniera del tutto normale, ma mostrano un'aumentata sensibilità agli effetti tossici del cadmio (Mstars,1994;Beach e Palmiter,1981). Cellule in coltura, in cui i geni codificanti le MT sono amplificati, sono più resistenti al cadmio rispetto alle cellule di controllo (Masters,1994;Beach e Palmiter ,1981). La correlazione tra la resistenza al cadmio e i livelli cellulari delle MT è supportata da altre evidenze sperimentali. Topi neonati, il cui fegato esprime costitutivamente livelli cellulari elevati di MT, sono particolarmente resistenti agli

effetti citotossici del cadmio (Wong, 1980). Inoltre, l'azione tossica del cadmio può essere ridotta quando animali adulti vengono pretrattati con basse dosi di cadmio (Goering e Klaassen, 1984) o di zinco (Leber e Miya, 1976), capaci di promuovere la sintesi di MT. Studi condotti su popolazioni umane viventi in zone altamente contaminate da metalli pesanti dimostrano che anche nell'uomo le MT svolgono un'azione protettiva nei confronti dei metalli tossici. E' stato osservato che carcinomi dovuti all'esposizione al cadmio sono molto frequenti negli organi (prostata e gonadi), nei quali la concentrazione delle MT è costitutivamente bassa (Waalkes, 1991).

Le MT giocano anche un ruolo di difesa dagli effetti nocivi degli agenti ossidanti: cellule in coltura, provenienti da topi che non esprimono le MT, risultano più sensibili allo stress ossidativo rispetto alle cellule prelevate da animali non transgenici (Lazo, 1995). Anche in questo caso, il pretrattamento in vivo con agenti capaci di indurre la sintesi delle MT determina un aumento della resistenza delle cellule ad agenti chimici che generano stress ossidativi (Sato, 1995). E' stato dimostrato che l'espressione della MT eterologa di scimmia in ceppi di lievito che difettano della superossido dismutasi (SOD) protegge le cellule dagli effetti nocivi dei radicali liberi (Thornally e Vasak, 1985). A tal proposito è stato proposto che i residui di cisteina delle MT possono comportarsi da riducenti rilasciando il metallo in situazioni di stress ossidativo (MeretVallee, 1998).

2.3 LOCALIZZAZIONE DELLE METALLOTIONEINE

Le MT sono proteine ubiquitarie presenti in alcuni procarioti, nei microrganismi eucarioti, in molti vegetali e in numerosi phyla del mondo animale (Hamer, 1986; Scudiero et al., 1994, 1995, 1997; Scudiero, 1997). Negli eucarioti le MT si riscontrano già a partire dalle forme più semplici. Studi effettuati sul protista unicellulare *Tetrahimena pigmentosa* mettono in evidenza un accumulo di rame e cadmio nella cellula, riconducibile a due diverse isoforme di MT, tipiche di questi eucarioti, costituite da 96 aminoacidi tra i quali vi sono 28 residui cisteinici; si ritiene che queste due isoforme siano espresse in maniera specifica dal proprio metallo di induzione (rame o cadmio) (Santovito e coll., 2003).

2.3.1 Localizzazione delle MT negli ovociti e negli embrioni

Una classe di macromolecole fortemente accumulate dall'ovocita durante l'ovogenesi è quella degli mRNA, la maggior parte dei quali non prende parte attivamente alla sintesi proteica dell'ovocita ma viene immagazzinata nelle particelle RNP citoplasmatiche che saranno utilizzate dall'embrione in sviluppo (Robash e Ford, 1974). Ricerche effettuate sul rettile terrestre *Podarcis sicula* dimostrano che l'mRNA della metallotioneina è espresso costitutivamente nell'ovaio in tutti i periodi del ciclo ovarico, ma il messaggero si accumula nell'ovocita principalmente durante il periodo riproduttivo, quando l'ovaio contiene grandi follicoli vitellogenici (Riggio et al., 2003). Il contenuto totale in metalli presente nell'estratto derivato dagli ovociti e dalle uova in ovulazione è associato con proteine ad elevato peso molecolare, mentre nessun metallo è legato a costituenti a basso peso (tipico delle MT). Da questi risultati, è evidente che, malgrado la mancanza di MT nell'ovaio e nelle uova, un mRNA dell' MT non traducibile si accumula in questi compartimenti. Studi indicano che molecole di mRNA traduzionalmente inattivo sono comunemente presenti negli ovociti e nelle uova (Spirin, 1994; Vassalli and Stutz, 1995; Seydoux, 1996; Stebbins-Boaz and Richter, 1997), e che l'attivazione traduzionale di queste molecole avviene dopo la fecondazione. Queste scoperte suggeriscono che il significato fisiologico dell' MT-mRNA non traducibile sia in relazione alla presenza, nell'embrione, di un sistema di omeostasi dei metalli attivo, che però non agisce prima della fecondazione. In più, l'induzione della sintesi delle MT che segue un trattamento con cadmio suggerisce che il blocco che rende l'mRNA non traducibile è rimosso in qualche modo dal metallo. Una situazione simile è stata osservata nel fegato di un Osteitto antartico, che contiene l' mRNA della MT senza che la proteina si accumuli. Tuttavia, un grande accumulo di MT è stato rilevato in questo pesce dopo il trattamento con cadmio (Carginale et al., 1998). Poiché uno dei ruoli attribuito comunemente alle MT è la difesa dagli effetti nocivi prodotti dai metalli pesanti e dai radicali superossido, questi dati dimostrano che, anche se normalmente non presente nell'ovaio di *Podarcis sicula*, la sintesi di MT può essere indotta dopo esposizione a cadmio, in modo da fornire la difesa necessaria dall'effetto tossico di questo metallo (Riggio et al., 2003).

Per quel che concerne la localizzazione delle MT negli embrioni, evidenze sperimentali dimostrano che in embrioni di Echinodermi lo zinco può agire da induttore delle MT. In embrioni di riccio di mare allo stadio di plutei è stata determinata la localizzazione delle MT

esclusivamente nelle cellule dell'ectoderma aborale. Un trattamento con zinco determina una più ampia distribuzione della proteina che in questo caso si ritrova nelle cellule dell'ectoderma aborale, in quelle del mesoderma ed in quelle dell'ipoblasto. In embrioni trattati con zinco in stadi successivi di sviluppo, le MT possono essere osservate anche nelle cellule dell'intestino presuntivo e in quelle dell'ectoderma orale (Angerer e coll., 1986).

Un accumulo differenziale di MT è stato studiato anche in embrioni di topo in rapporto al sesso e all'età. Negli embrioni di topo, usando tecniche immunofluorescenti, sono state localizzate le MT nel rene, nell'intestino e nel fegato; in questi organi, è stato dimostrato che la presenza delle MT varia con il procedere dello sviluppo embrionale.

Nel rene di feti di 20 giorni, una forte immunofluorescenza è localizzata nel citoplasma e nel nucleo delle cellule epiteliali dei tubuli convoluti prossimali. Nei topi neonati di quattro giorni, nessuna marcatura si riscontra nella corteccia renale in differenziamento. Nei topi neonati di 11 giorni, la marcatura si osserva nella parte diritta dei tubuli prossimali (a livello dei raggi midollari) e nei tubuli prossimali vicini alla corteccia esterna (che al quarto giorno era in differenziamento). Inoltre, le MT sono state evidenziate anche nelle cellule dell'ansa di Henle, ma non nei dotti collettori. Nei topi di diciotto giorni di vita, le MT sono localizzate soprattutto nelle cellule tubulari della parte profonda della corteccia renale, tale marcatura non è più riscontrabile al ventesimo giorno. Nel topo di 2 mesi, infine, la presenza delle MT è osservabile nei bordi a spazzola e nelle cellule dei tubuli convoluti prossimali, e tale localizzazione perdura anche negli individui adulti (Bhaer e Thomas, 1991).

La localizzazione delle MT nell'intestino non varia dalla nascita fino al diciottesimo giorno di vita: la marcatura è presente nelle cellule epiteliali colonnari dei villi, nelle cellule caliciformi mucipare e nelle cellule del Paneth. Nei topi di venti giorni di vita, le MT sono presenti soprattutto nelle cellule caliciformi mucipare. Nei topi di 2 mesi, la distribuzione delle MT corrisponde a quella descritta nell'animale adulto (Bhaer e Thomas, 1991).

Nel fegato di feti di topo di venti giorni e nei neonati di quattro giorni, una forte immunofluorescenza è stata osservata nel citoplasma e nel nucleo degli epatociti. Con la crescita post natale (tra i diciotto e i ventisette giorni di vita), la MT tende a scomparire: prima dal nucleo e poi dal citoplasma. In topi di due mesi, la MT viene di nuovo sintetizzata, infatti un segnale immunofluorescente è di nuovo presente nel citoplasma e nel nucleo della gran parte degli epatociti (Bhaer e Thomas, 1991).

Studi effettuati su feti di pecora, hanno evidenziato che le MT sono presenti nell'encefalo nelle isoforme I e II. In embrioni di 72-73 giorni di vita (la gestazione è di 150 giorni) le due isoforme sono presenti nelle zone ventricolari in proliferazione e successivamente negli oligodendrociti e negli astrociti gliali radiali e nelle regioni corticali (A. F. Halloway, 1996).

2.3.2 Localizzazione delle MT nei tessuti adulti

Ci sono numerose evidenze che le MT sono presenti in molti organi e principalmente nel fegato di molti vertebrati durante la vita adulta. E' stato dimostrato che le MT sono presenti negli Osteitti e che nel Teleosteo *Mugil cephalus* è stato riscontrato che l'accumulo di MT a livello epatico è in grado di complessare il rame soprattutto a livello del citosol delle cellule parenchimali (Linde e coll., 2005).

Negli Anfibi è stata dimostrata la presenza delle MT in numerosi organi quali fegato, ovaie ed encefalo (Mounajik e coll.,2002). Nelle salamandre *Proteus anguinus* e *Neotenic maculosus* è stata identificata un'unica isoforma di MT complessata ai metalli pesanti cadmio, rame e zinco. La localizzazione del complesso metallo-MT, nell'ambito della cellula, varia in funzione del metallo legato: il complesso Zn-MT e il complesso Cd-MT sono localizzati soprattutto nel citosol dell'epatocita, la forma Cu-MT è localizzata soprattutto a livello nucleare (Dobrovoljic e coll., 2003).

Nei rettili, Trinchella et al. (2006), hanno dimostrato, che nel lacertiliano *Podarcis sicula*, c'è un diverso accumulo di messaggero per la MT nei diversi organi esaminati in relazione all'accumulo di cadmio ed al tipo di trattamento effettuato. In particolare è stato dimostrato (Trinchella et al 2006) che l'accumulo del messaggero per la metallotioneina, in fegato, rene, intestino encefalo ed ovaio, dipende dal tipo di trattamento acuto e/o cronico ,e dalla via di somministrazione intraperitoneale e/o alimentare. In particolare già dopo un singolo trattamento acuto, c'è correlazione tra la concentrazione di cadmio accumulato e la sintesi di messaggero per la Mt, nel fegato, rene, ovaio. Dopo trattamento cronico c'è una positiva correlazione tra l'incremento del messaggero per la metallotioneina ed accumulo di cadmio in intestino, ovaio e rene, tale correlazione non si osserva nel fegato e nell'encefalo.

Nei Mammiferi adulti, le MT sono particolarmente abbondanti nei tessuti parenchimatosi, quali fegato e rene (Nath et al, 1984), ma esse sono state trovate anche nelle cellule

dell'epitelio olfattivo, nelle ghiandole mammarie, olfattorie, perianali e tiroidee, nelle cellule intestinali e dello stomaco e nelle cellule epiteliali dei follicoli piliferi (Shimada 1997). Le MT sono anche presenti nei monociti (Pauwels, 1994) e, recentemente, abbinando tecniche istochimiche e marcatura con doppia fluorescenza, sono state rinvenute due diverse forme di MT negli astrociti e nelle cellule della linea mielomonocitica (Penkowa, 1999).

La tessuto-specificità dell'espressione delle MT è stata studiata dettagliatamente nel topo adulto: mediante tecniche immunostochimiche sono stati rilevati contenuti apprezzabili di MT anche nel sistema nervoso centrale (Spirin, 1994) e nel rene (nel citoplasma e in modo variabile nel nucleo delle cellule dei tubuli prossimali), ma la maggiore presenza della proteina è stata dimostrata nel fegato (soprattutto nel citoplasma degli epatociti). A livello encefalico sono state isolate tre isoforme di MT (I, II e III), espresse costitutivamente in varie regioni dell'encefalo (bulbi olfattivi, corteccia, ippocampo, talamo e cervelletto), la marcatura è riscontrabile in tutte le regioni, anche se la più forte presenza delle tre isoforme di MT è stata rinvenuta nei bulbi olfattivi. Inoltre mediante esperimenti di ibridazione in situ è stata evidenziata una elevata concentrazione di MT nelle cellule ependimali, negli elementi gliali subito a contatto con le cellule del Purkinje e nelle cellule dell'epitelio corioideo, (Choundhuri, 1995; Niscimura e coll., 1992).

2.4 INDUZIONE DELLE METALLOTIONEINE

Una caratteristica delle MT, fondamentale per la loro funzione biologica, è l'inducibilità, meccanismo che costituisce la difesa più rapida ed efficiente da parte degli organismi viventi all'esposizione dei metalli tossici. La sintesi delle MT è associata a numerose situazioni di stress, essa può essere indotta in seguito all'esposizione delle cellule o dell'organismo stesso ai metalli ed in particolare se in concentrazioni elevate. L'espressione del messaggero e la sintesi delle MT è indotta oltre che dai metalli, anche da fattori di crescita, prodotti di oncogeni, secondi messaggeri come c-AMP e diacilglicerolo, vitamine e ormoni e molti agenti chimici citotossici (Samson e Gedamu, 1998). In pratica l'induzione della metallotioneina è stata proposta come un importante meccanismo adattativo in risposta agli stimoli ambientali.

Tra i numerosi agenti capaci di regolare la sintesi di MT, i metalli restano sicuramente i più potenti induttori. Il primo effetto dei metalli pesanti misurabile nella cellula è proprio la sintesi dell'mRNA MT. L'inducibilità delle Mt in seguito all'esposizione degli organismi ai metalli pesanti, e l'incremento dei livelli di mRNA MT nella cellula, sono stati utilizzati per monitorare l'inquinamento ambientale in campioni biologici raccolti in campo (Ryan e Hightower, 1996; Isani et al., 2000; Rotchell et al., 2001). La risposta induttiva dell'espressione della metallotioneina all'esposizione ai metalli pesanti è ben documentata in diversi phyla (Andrews, 1990; Scudiero et al., 2001). Negli ofidi e negli organismi di terra come i lombrichi che vivono nei suoli contaminati da metalli, l'induzione delle metallotioneine è concomitante all'accumulo di metalli (Dallingher et al., 2000, 2004; Sturzenbaum et al., 2004).

L'azione protettiva delle metallotioneine in seguito ad induzione prodotta da metalli è stata ampiamente studiata. Lavori condotti su topi hanno dimostrato che l'induzione della metallotioneina è un importante meccanismo adattativo che protegge contro la tossicità prodotta dai metalli, come il cadmio, e/o da sostanze chimiche come il carbonio tetraclorato (Klaassen e Liu 1998). Esperimenti invece condotti su Mtl/II di topo dimostrano che la deficienza in Mt rende questi animali più sensibili alla tossicità indotta dal cadmio (Habeebu et al 2000).

Nel rettile *Podarcis sicula*, in seguito ad esposizione al cadmio, si ha induzione del messaggero per la MT, in relazione alla tipologia di trattamento. In particolare, dopo esposizione acuta (somministrazione per via intraperitoneale) il cadmio induce l'mRNA MT in rene, ovaio e fegato; dopo esposizione cronica (somministrazione per via intraperitoneale) il metallo induce in intestino ovaio e rene. Per entrambe i trattamenti non si ha induzione di espressione della metallotioneina nell'encefalo (Trinchella et al 2006)

I geni codificanti le MT condividono, nella regione del promotore, motivi oligonucleotidici presenti in copie multiple, noti come "metal regulatory elements" (MRE). I motivi MRE consistono di un "core" conservato di sette nucleotidi (TGC(G/A)CNC) fiancheggiato da una sequenza semiconservata. E' stata formulata l'ipotesi che le sequenze MRE funzionino riconoscendo fattori di trascrizione specifici, che, quando attivati da metalli pesanti, si legano al DNA in prossimità del promotore del gene delle MT, inducendone l'espressione (Andrews,1990).

E' noto che, in alcune linee cellulari umane, i geni codificanti le MT sono espressi in misura diversa in risposta ai metalli Zn, Cu e Cd, e le concentrazioni ottimali necessarie per la massima induzione delle MT differiscono per ciascun metallo (Jahroudi,1990). La differente risposta ai metalli non e' sorprendente considerato il diverso ruolo dei "metalli traccia" che si legano alle MT: alcuni di essi, come il cadmio, non assolvono ad alcuna funzione biologica e sono tossici; altri, come lo zinco, sono coinvolti in numerosi processi biologici e quindi necessari (Hamer, 1986; Thiele, 1992). Poiche' le MT mostrano diversa affinita' per i vari metalli, e' possibile che anche gli stessi fattori di trascrizione che legano i metalli esibiscano diversa affinita' per questi ultimi. E' stato anche ipotizzato che siano presenti nelle cellule fattori di trascrizione specifici per ciascun metallo, che mostrano diversa affinita' per gli MRE (Samson e Gedamu, 1998). Sebbene si ritenga che le MT siano principalmente regolate a livello trascrizionale (Karin,1980) mediante l'interazione dei fattori di trascrizione con i promotori, il quadro relativo alle "MRE binding proteins" e' attualmente poco chiaro essendo stati descritti fattori che riconoscono differenti MRE e/o rispondono in maniera diversa ai metalli in vivo o in vitro. Heuchel e coll.(1994) hanno dimostrato che il fattore di trascrizione MTF-1 si lega specificamente agli MRE attivando la trascrizione delle MT. MTF-1 ha tutte le caratteristiche di una zinc-finger protein e funziona anche da sensore dello zinco, in quanto la sua capacita' di legarsi al DNA aumenta in seguito all'esposizione allo zinco.

Oltre agli MRE, i promotori delle MT contengono sequenze che rispondono ad altri fattori di trascrizione. Il promotore dei geni codificanti la MT-IIa e' uno dei piu' complessi: esso contiene siti di legame per fattori di trascrizione attivati da fattori di crescita e attivatori di proteine chinasi A e C (Gedamu,1993). Piu' recentemente sono state riconosciute regioni interne ai promotori che contengono elementi che rispondono all'induzione da agenti ossidanti quali perossido di idrogeno (Rushmore,1991). Cio' supporta il possibile ruolo delle MT come agenti antiossidanti (Samson e Gedamu,1998).

CAPITOLO 3: LA REGOLAZIONE DELLO SVILUPPO

3.1 I GENI CHE CONTROLLANO LO SVILUPPO EMBRIONALE

Lo sviluppo embrionale è un processo estremamente complesso che avviene sotto lo stretto controllo del patrimonio genetico. La proliferazione ed il differenziamento delle cellule che si originano da un'unica cellula, lo zigote, richiedono l'attivazione/disattivazione ordinata e coordinata di numerosi geni specifici. Soli così le cellule riescono a disporsi secondo un preciso ordine anatomico e a formare le strutture dell'individuo.

È stato dimostrato che il controllo della proliferazione/differenziamento inizia in fasi estremamente precoci, talvolta già nell'uovo. L'ovocita accumula molecole informative, messaggeri, che saranno in parte utilizzate dall'ovocita stesso nel corso dell'ovogenesi e in parte conservati e trasferiti all'embrione stesso che li utilizzerà soprattutto durante le fasi precoci dello sviluppo quando le cellule sono attivamente impegnate nella duplicazione (Patel, 1994).

Durante l'ovogenesi e dopo durante lo sviluppo embrionale si attivano geni che regolano lo sviluppo embrionale: geni materni, geni "master" regolatori e geni esecutori. L'attività di questi geni è innescata in serie ma in alcuni casi possono anche essere espressi contemporaneamente. I geni materni controllano il differenziamento iniziale e le prime fasi dell'organizzazione del corpo. Successivamente entrano in gioco geni "master" regolatori che, lavorando a valle, si occupano del differenziamento delle regioni individuate. A questi geni, seguiranno poi geni che lavorano in maniera più fine, i geni esecutori, che dirigono il differenziamento a livello locale, permettendo il differenziamento dei singoli tessuti e organi.

3.2 I GENI MATERNI

È stato dimostrato che messaggeri destinati all'embrione sono accumulati nell'uovo in siti specifici con formazione di gradienti tipici. L'mRNA di bicoid, per esempio, è localizzato nella regione anteriore dell'uovo non fecondato ed è ancorato al citoscheletro (Dubawy, 1998). Esso codifica per la proteina bicoid (Dubawy, 1998), un fattore di trascrizione coinvolto nel differenziamento delle strutture cefaliche e toraciche dell'embrione di *Drosophila*. Questo mRNA dopo la fecondazione è tradotto in proteina, la proteina diffonde verso la regione posteriore

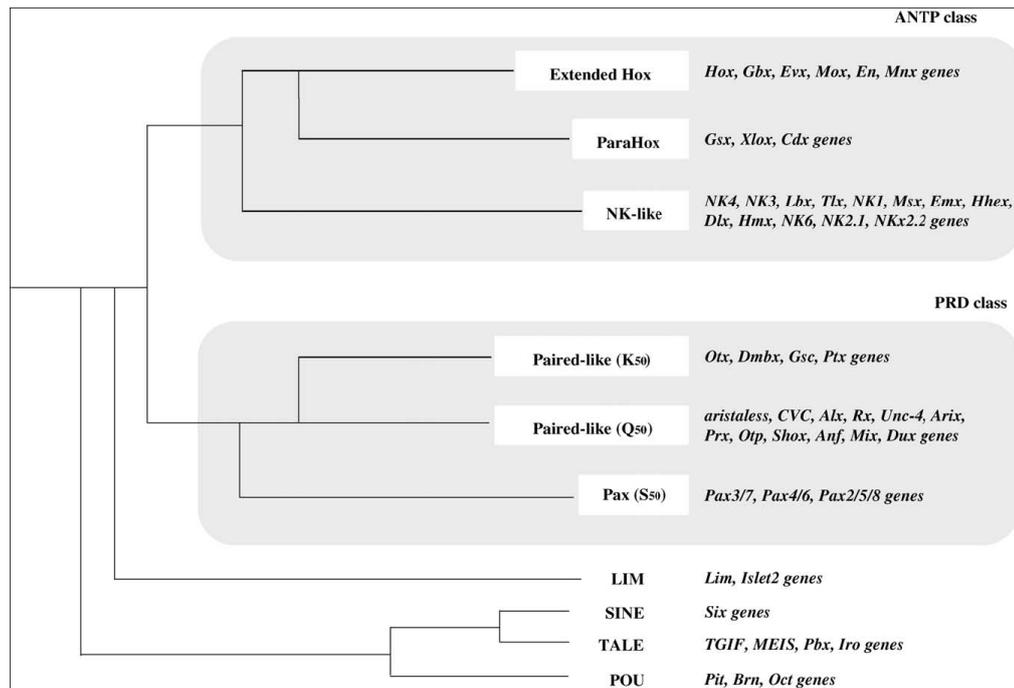
dell'embrione e, nel diffondere, viene degradata. Questa degradazione è alla base della formazione di un gradiente che ha la concentrazione più alta all'estremità anteriore dell'embrione, corrispondente al sito in cui avviene la traduzione di bicoid. (Wolpert L.1998). Quando l'embrione raggiunge lo stadio di blastoderma sinciziale, il gradiente antero-posteriore della proteina bicoid (Braat A.K., 2001) attiva l'espressione sequenziale di un importante gruppo di geni 'gap'. Inizialmente *gap hunchback* che a sua volta accende i geni *gap* "pairrule" e "segment polarity". Questi geni determinano la formazione di segmenti, stabilendone il numero e la polarità.

3.3 I GENI "MASTER" REGOLATORI: I GENI 'HOMEBOX'

Tra i geni master regolatori giocano un ruolo importante i geni cosiddetti selettori omeotici o geni homeobox. Questi sono espressi in diverse combinazioni lungo l'asse A/P, e hanno il ruolo di stabilire l'identità dei singoli segmenti.

I geni "homeobox" (omeotici) sono stati scoperti nel 1983 nel moscerino della frutta *Drosophila melanogaster* da Garber e collaboratori. Il termine omeotico (dal greco omeosis), deriva dall'osservazione che questi geni, se mutati, provocano la sostituzione di una parte del corpo con un'altra. Per esempio, un segmento normalmente privo di ali, in seguito a mutazione omeotica si può trasformare in un segmento provvisto di ali. L'azione di questi geni deriva dal fatto che codificano per fattori di trascrizione e, pertanto, sono in grado di regolare l'espressione di altri geni. I geni HOX hanno un motivo molto conservato di circa 180 bp chiamato "homeobox" (McGinnis et al.1984; Scott e Weiner 1984) che codifica per una regione lunga circa 60 aminoacidi, o omeodominio, in grado di legare il DNA grazie alla presenza di un caratteristico motivo elica-ansa elica (helix-turn-helix) (Lewin 2000).

In base all'analisi filogenetica della sequenza dell'omeodominio e della struttura del dominio delle proteine i geni homeobox sono stati classificati, come riportato nella figura, in 11 classi geniche (ANTP, PRD, LIM,POU, HNF, SINE, TALE, CUT, PROS, ZF e CERS) comprendenti in tutto 100 famiglie (Holland et al. 2007).



Le diverse famiglie geniche controllano aspetti diversi dello sviluppo (Burglin 1994) mentre i geni di una stessa famiglia tendono ad avere funzioni collegate. Ad esempio, i geni della famiglia HOX, CDX, e EVX intervengono nell’embriogenesi precoce; le famiglie PAX6, SEI, VAX, EMX sono coinvolte nello sviluppo degli occhi, mentre le famiglie LIM e HMX sono importanti per lo sviluppo dei neuroni (Duboule 1994).

Lo sviluppo di regioni complesse, come per esempio, il cervello è di solito sotto il controllo di più famiglie geniche che intervengono in maniera coordinata, spesso mostrando una espressione regione specifica. Otx (Otx1, Otx2) ed Emx (Emx1, Emx2), per esempio, hanno un ruolo cruciale nel differenziamento dell’encefalo anteriore e del mesencefalo, i geni delle famiglie di Dmbx1, Gbx, En e Pax-2/5/8 invece, risultano organizzatori delle regioni del mesencefalo e dell’encefalo posteriore.

3.3.1 I geni HOX

I geni HOX sono una famiglia di geni appartenenti alla classe Extended HOX. Sono particolarmente famosi perché sono i primi geni omeotici ad essere stati scoperti nel 1983 in *Drosophyla melanogaster*, un modello ideale per lo studio dei meccanismi che regolano i processi dello sviluppo. In questa specie, nelle prime fasi dello sviluppo, i geni zigotici gap, paillure e

segment polarity dirigono la suddivisione dell'embrione in segmenti stabilendone numero e polarità (Patel, 1994) mentre i geni hox intervengono più tardi a determinarne l'identità.

I geni hox, definiti HOM in *Drosophyla*, sono raggruppati in due regioni sul cromosoma 3: il complesso Antennapedia (ANT-C) e il complesso Bithorax (BX-C). Il complesso ANT-C comprende cinque geni omeotici: labial (lab) proboscipedia (pb), Deformed (dfb), sex combs reduced (scr) e Antennapedia (Antp) (Kaufman et al., 1990). I geni lab e dfb specificano i segmenti del capo mentre scr e Antp contribuiscono a conferire l'identità dei segmenti toracici. Il complesso BX-C comprende tre geni omeotici Ultrabithorax (Ubx), Abdominal A (abdA) e Abdominal B (AbdB) (Karch et al., 1985; Regulski et al., 1985; Sanchez-Herrero et al., 1985). Ubx è necessario per il differenziamento del terzo segmento toracico; i geni abdA e AbdB sono responsabili dell'identità segmentale dei segmenti addominali (Sánchez-Herrero et al., 1985).

Mutazioni a carico di questi geni risultano in tipiche trasformazioni omeotiche. La mutazione del gene Antennapedia, per esempio provoca la trasformazione delle antenne in un paio di zampe, in quanto il segmento della testa acquisisce l'identità di un segmento più posteriore (Schneuwely e Gehring, 1985).

I geni omeotici individuati in *Drosophila* hanno suscitato molto interesse e in breve tempo si è scoperto che questi geni sono altamente conservati e che geni simili sono presenti nel genoma di tutti i Metazoi, anche in forme evolutivamente molto lontane tra loro, come ad esempio i funghi e le piante.

Questo indica che questi geni hanno origini molto antiche e comuni. In effetti, Lappin et al (2006) hanno proposto che il primo gene hox si sarebbe originato circa un miliardo di anni fa. Tale gene ancestrale, oggi ancora presente nelle piante e nelle spugne, si sarebbe duplicato formando 2 geni protohox attualmente presenti negli cnidari (Hydra). Successivamente, in seguito a processi di divergenza e duplicazione, si sarebbero organizzati in caratteristici cluster. Nel nematode *Caenorhabditis. elegans* e nell'Anfiosso è presente un singolo cluster con rispettivamente 5 e 10 geni omeotici (Garcia-Fernandez e Holland, 1994).

Nei vertebrati, l'intero complesso ancestrale sarebbe andato incontro ad ulteriori duplicazioni che avrebbero portato alla formazione di quattro complessi indipendenti, molto simili tra loro (Kappen et al., 1989) che nei tetrapodi sono stati raggruppati in quattro complessi, HoxA, HoxB, HoxC e HoxD, localizzati su cromosomi differenti. Nell'uomo i clusters A-D sono localizzati sui cromosomi 7p15, 17q21.2, 12q13, e 2q31. (Duboule 1992).

La profonda omologia e le caratteristiche di espressione dei geni Hox/Hom riflettono l'alto grado di conservazione della funzione di queste proteine anche in specie filogeneticamente distanti (Slack et al., 1993). Questi geni condividono, infatti, un ruolo fondamentale nel controllo della morfogenesi precoce e, in particolare, nella specificazione dell'identità regionale lungo l'asse antero-posteriore (A/P).

Una caratteristica peculiare che accomuna i geni Hox/Hom è la correlazione tra la loro posizione sul cromosoma ed il corrispondente dominio spaziale e temporale con cui questi sono espressi lungo l'asse A/P dell'embrione. Questa caratteristica viene definita colinearità spaziale e temporale: i geni localizzati in 3' sul cromosoma mostrano un'espressione precoce ed un limite di espressione più rostrale rispetto a quelli localizzati più vicino all'estremità 5' (Lewis, 1978; Dolle et al., 1991; Hunt et al., 1991; Izpisua-Belmonte et al., 1991).

3.3.2 I geni PAX

I geni Paired box (Pax) sono fattori di trascrizione tessuto specifici, contenenti un omoedominio e un dominio paired, molto conservato, contenenti tre alfa eliche ed un helix-turn-helix (HTH) ed un octapeptide.

Sulla base della struttura delle proteine, dell'organizzazione genomica e del pattern di espressione i membri della famiglia Pax sono stati suddivisi in quattro gruppi

gruppo 1 (Pax1 e 9)

gruppo 2 (Pax2, 5, e 8)

gruppo 3 (Pax3 e 7)

gruppo 4 (Pax4 e 6)

Tutte queste proteine giocano un ruolo importante per la specificazione dei vari tessuti durante gli stadi precoci dello sviluppo. Ad esempio Pax2 è espresso durante lo sviluppo dei mammiferi nel rene e nel nervo ottico; Pax3 nell'occhio, nel cuore e nella faccia; Pax4 nel pancreas; Pax5 nello sviluppo neuronale e nella spermatogenesi; Pax8 nella tiroide.

Pax6 è presente in varie specie di vertebrati in cui è altamente conservato (Holt et al., 1988; Dorsky et al., 1995). *Pax6* codifica una proteina di 422 aa (Hever et al 2006), che contiene i due domini che legano il DNA, il paired dominio bipartito (PRD, Treisman et al., 1991) e

l'omeodominio (HD), ed una regione carbossiterminale ricca di prolina serina e treonina (PST-rich).

Il dominio paired box è costituito da 128 aa, è localizzato all'estremità amminotermine della proteina, è stato descritto per la prima volta nei geni *paired* di *Drosophila* (Baumgartner et al., 1987). Tutto il dominio è presente solo in Pax6, -3 e -7, gli altri membri della famiglia Pax ne posseggono solo un frammento o ne sono privi (Hill e Hanson, 1992).

All'estremità carbossiterminale della proteina c'è il dominio PST-rich, che è simile alla regione del fattore di trascrizione ubiquitario Otc-1 (Sturm et al., 1988). I ratti e topi mutanti mancanti della regione PST-rich hanno un tipico "small eye" (Hill et al., 1991; Matsuo, 1993).

Omologhi di pax6 sono stati identificati in numerosi Metazoi, inclusi *C. elegans*, (Chisom e Horvitz 1995), zebrafish (Goulding et al., 1993), topo (Walther e Gruss, 1991) e uomo (Ton et al., 1991). Nella *Drosophila* esiste un omologo, il gene *eyeless* (*ey*) che funziona da gene master nel controllo della morfogenesi degli occhi composti (Gehring 1996), senza il quale il gene non è espresso.

Circa la sua funzione, Pax6 sembra essere coinvolto a molteplici livelli in diversi processi come nell'induzione, nel controllo della mitosi e del differenziamento (Hitchcock et al., 1996; *Xenopus*, Hirsch e Harris 1997). Mutazioni di questo gene causano malformazioni quali anidria, cataratta congenita, anoftalmia o microftalmia (Glaser et al., 1994).

Certamente Pax6 rappresenta il gene chiave per la formazione degli occhi (Halder et al., 1998) anche se è coinvolto nello sviluppo del sistema nervoso centrale e dell'epitelio olfattivo (Walther e Gruss 1991). Indagini di ibridazioni in situ o immunocitochimica dimostrano infatti che Pax6 è espresso prima nel solco ottico, poi nella vescicola ottica, quindi nello strato interno della coppa, della lente e della cornea (Hitchcock et al., 1996). Nelle fasi tardive dello sviluppo l'espressione di Pax6 si riduce e si limita alle cellule attive mitoticamente dello strato interno della retina (*Carassius*, Hitchcock et al., 1996; *Xenopus*, Hirsch e Harris 1997; topo, Davis et al., 1996; pollo, Kawakami e Kimura-Kawakami 1997): nei vertebrati adulti l'espressione di Pax-6 nella retina è limitata alle cellule gangliari e alle cellule dello strato nucleare interno (INL) (Fischer e Reh, 2000).

Pax6 è espresso in molti invertebrati e vertebrati: l'osservazione che Pax6 sia coinvolto nello sviluppo degli occhi dei vertebrati e degli ommatidi degli artropodi ha portato ad ipotizzare una origine evolutiva comune degli occhi (Zuker, 1994). Questa argomentazione trova supporto nel lavoro di Halder e collaboratori nel 1995, i quali hanno dimostrato che l'espressione alterata

dell'omologo murino di Pax6 nelle ali di *Drosophyla* causa la formazione di occhi ectopici nelle strutture adulte, un fenotipo identico a quello prodotto dalla espressione alterata del gene *eyeless*. Il gene murino, causando lo sviluppo di occhi composti invece che lenticolari, dimostra che gli step precoci dello sviluppo dell'occhio sono conservati, mentre la tarda specificazione della struttura è modificata da fattori specie specifici (Halder et al., 1995). Questo esperimento, dimostra che Pax6 non solo è necessario per lo sviluppo dell'occhio, ma che almeno in *Drosophyla*, è anche sufficiente (Halder et al., 1995). Hirsch e Haris (1996) hanno dimostrato invece che in *Xenopus*, Pax 6 è necessario ma non sufficiente, per la formazione degli occhi. L'alterata espressione precoce di Pax-6 risulta in difetti assiali, ma non sono stati osservati specifici fenotipi dell'occhio.

Il meccanismo cellulare attivato da Pax6 non è stato ancora determinato ma si hanno evidenze che possa regolare vari geni tessuto specifici, incluso possibili gene target, quali per esempio, il gene della molecola di adesione cellulare neuronale (N-CAM) (Holst et al 1997), il gene *crystallin*, (Cvekl e Piatigorsky 1996), l'r-caderina (Stoykova 1997) e la rodopsina (Sheng et al 1997).

3.3.3 I geni Otx

L'identificazione dei geni murini Hox e la dimostrazione che l'inattivazione di questi induce trasformazioni omeotiche ha destato un grande interesse per i meccanismi che stabiliscono il piano strutturale del corpo e, in particolare, dell'encefalo (Krumlauf, 1993, 1994). I meccanismi genetici di base sono ancora sconosciuti anche se un certo numero di geni regolatori, sono stati identificati e specificamente espressi nelle regioni del proencefalo e del mesencefalo (Rubenstein et al., 1994). Tra questi giocano un ruolo importante i geni Otx (Otx1 ed Otx2), omologhi del gene *orthodenticle* (*otd*) di *Drosophyla* (Finkelstein e Perrimon, 1991; Cohen e Jürgens, 1990) che sono geni omeotici contenenti nei vertebrati un omeodominio bicoid-like (Finkelstein e Boncinelli, 1994; Simeone, 1998).

Otx2 nei mammiferi è localizzato sul cromosoma 14q, contiene un omeodominio altamente conservato, ed è organizzato in 5 esoni, dei quali solo tre sono traslati. Tale gene durante l'embriogenesi mostra un pattern di espressione ristretto principalmente a specifiche regioni della

testa, in particolare nell'encefalo anteriore e mediano (Simeone et al., 1992a, Acampora et al., 1995).

Otx2 è trascritto precocemente nell'epiblasto ed il suo dominio di espressione regredisce quindi progressivamente alla regione anteriore durante la gastrulazione (Simeone et al., 1993; Bally-Cuif et al., 1995; Pannese et al., 1995). In *Xenopus* e nel pollo il gene viene trascritto oltre che nel neuroectoderma anteriore, anche nel mesoderma anteriore (Bally-Cuif et al., 1995), nel meso-endoderma precordale e nel labbro dorsale del blastoporo (Pannese et al., 1995). Sia il labbro dorsale del blastoporo in *Xenopus* (Spemann e Mangold, 1924) che il nodo di Hensen nel pollo (Waddington, 1932) mostrano una notevole proprietà: quando sono trapiantati in una altra regione dell'embrione, essi sono capaci di indurre la formazione di un secondo asse dorsale. Lo stadio in cui questa capacità organizzativa viene acquisita corrisponde precisamente al momento in cui Otx2 inizia ad essere espresso e questo suggerisce che questo gene abbia un ruolo conservato nella specificazione del neuroectoderma nei vertebrati, così come è conservata la sua sequenza nucleotidica durante l'evoluzione (Acampora et al., 1995). Questo ruolo è confermato dal fatto che mutanti Otx2^{-/-} risultano mancanti della regione anteriore del tubo neurale (mesencefalo ed encefalo anteriore).

Otx2 è un gene molto importante anche per la formazione dell'occhio come dimostra il fatto che mutazioni di questo gene causano microftalmia ed anoftalmia, in molte specie di vertebrati, uomo compreso (Ragge et al., 2005)

Il suo coinvolgimento nello sviluppo dell'occhio è stato stabilito confrontando la sua espressione in occhi mutanti e normali in diversi modelli animali (Matsuo et al., 1995; Zuber et al., 2003; Simeone et al. 1993; Martinez-Morales et al., 1993; Martinez-Morales et al., 2003). Otx2 è ampiamente espresso nella vescicola ottica e gioca un ruolo nel direzionare l'evaginazione della vescicola ottica a contatto con l'ectoderma. La prima indicazione che l'espressione di Otx2 sia responsivo all'interazione induttiva si è avuta effettuando esperimenti di espanto in embrioni di topo durante la gastrulazione (Martinez-Morales et al., 1993) dopo la specificazione dell'occhio l'espressione di Otx2 è ristretta allo strato epiteliale pigmentato della retina (RPE), dove è mantenuto durante la vita adulta.

L'analisi di topi Otx2^{-/-} ha mostrato anche che la compartimentalizzazione di Otx2 nello sviluppo dell'occhio è essenziale per la specificazione del strato epiteliale della retina e che la perdita della funzione di Otx2 risulta in un'aberrante organizzazione della coppa ottica (Martinez-Morales et al., 1993).

3.4 I GENI REGOLATORI DEL CICLO CELLULARE

I geni regolatori dello sviluppo hanno la fondamentale funzione di specificare il destino e organizzare le vari parti del corpo. Il loro lavoro si affianca necessariamente a quello dei geni house-keeping che mantengono l'integrità e la funzionalità delle cellule e dei geni responsabili del controllo del ciclo cellulare. Il differenziamento di organi/tessuti, infatti, richiede che le cellule concludano la fase proliferativa ed escano dal ciclo cellulare e si specializzino o, talora, addirittura che avviano i processi di morte programmata. Tutto questo richiede un preciso coordinamento tra segnali che dirigono la formazione di specifici tessuti e meccanismi che regolano il ciclo cellulare (Ohnuma e Harris, 2003).

Negli eucarioti un ruolo importante nel controllo del ciclo cellulare è svolto dalla proteolisi, mediata da ubiquitina, delle cicline A e B. Grazie alla presenza nella loro regione N-terminale di un "destruction box", costituito da una sequenza molto conservata di nove amminoacidi (Hershko et al., 1991; Glotzer et al., 1991) le cicline vengono degradate permettendo alla cellula di completare la mitosi (Gallant et al., 1992).

La componente chiave per l'ubiquitinazione dei substrati del "destruction box" è un complesso di 12 subunità di circa 1500 kDa chiamato ciclosoma o complesso che promuove l'anaphase (APC) (Sudakin et al., 1995, King et al., 1995). L'attività del ciclosoma non si limita alla mitosi ma persiste in tutta la fase G1, anche nella fase G0 e nelle cellule differenziate (Brandeis et al., 1996). Nel lievito (Visintin et al., 1998; Matsumoto et al., 1997) e in *Drosophila* (Sigrist et al., 1995; 1997) sono state identificate altre proteine che hanno un ruolo importante nella regolazione del ciclosoma, e che sono state divise in due gruppi. Il primo, Fzy, include Cdc20 (*S. cerevisiae*), Slp1 (*S. pombe*), Fizzy (*Drosophila*) e p55cdc (mammiferi); il secondo gruppo, Fzr, include Cdh1/Hct1 (*S. cerevisiae*) Fizzy-related (*Drosophila*, *Xenopus* e mammiferi). Queste proteine attivano il ciclosoma in differenti fasi del ciclo cellulare mediante diversi substrati (Morgan et al., 1999). Fzy è coinvolto nella degradazione durante la transizione metafase-anaphase e nel controllo del fuso mitotico (Lorca et al., 1998; Kallio et al., 1998), Fzr nella degradazione in tarda mitosi e nella fase G1. I pattern di trascrizione di Fzy e Fzr durante l'embriogenesi di *Drosophyla* sono molto distinti. L'espressione di Fzy è correlato alla progressione del ciclo cellulare. I trascritti di Fzr sono up regolati quando la cellula è nella fase

postmitotica. Le analisi genetiche hanno chiaramente dimostrato che l'up-regolazione è legata al blocco della proliferazione in determinate fasi dello sviluppo embrionale (Sigrist et al., 1997).

CAPITOLO 4

4.1 SCOPO DEL LAVORO

Gli studi condotti finora hanno dimostrato che il cadmio ha effetti teratogeni durante lo sviluppo embrionale. Le notizie raccolte in merito riguardano principalmente specie acquatiche ovipare che depongono le uova in acqua. Tra le specie terrestri gli studi sono stati rivolti a specie vivipare, ai mammiferi in particolare. Poco è noto, perciò, sugli effetti del cadmio sullo sviluppo embrionale di specie ovipare che depongono le uova nel terreno, quali i rettili.

L'interesse della mia ricerca rientra in questa problematica e gli studi che ho condotti sono mirati a definire la tossicità di questo metallo ed i suoi effetti durante lo sviluppo embrionale.

A tale scopo ho seguito un programma sperimentale organizzato in 3 punti:

1) determinare le alterazioni macro e microscopiche indotte dal cadmio sull'organogenesi. Sperimentalmente ho utilizzato varie colorazioni istologiche che mi hanno permesso di individuare gli organi più sensibili all'azione del metallo e gli effetti su di essi esercitati.

2) determinare la relazione esistente tra le alterazioni morfologiche osservate e l'espressione di proteine a funzione protettiva. Sperimentalmente ho utilizzato tecniche di ibridazione in situ per rilevare la presenza di messaggero per la metallotioneina, una proteina chelante il cadmio (REF).

3) determinare la relazione esistente tra alterazioni morfologiche registrate e l'attivazione o inattivazione di alcuni geni coinvolti nello sviluppo embrionale. Per questo punto del progetto ho utilizzato tecniche di immunocitochimica, Northern blot e di ibridazioni in situ. In particolare, ho analizzato l'espressione di: a) un gene coinvolto nella proliferazione cellulare, un Fizzy - related (Fzr) gene, che controlla il ciclo cellulare regolando l'attivazione del ciclosoma, un pathway di proteolisi mediato da ubiquitina (REF); b) due geni coinvolti nello sviluppo e nel differenziamento neuronale: Pax-6 e Otx2. Questi geni, altamente conservati nel corso dell'evoluzione (Nishina et al 1999), sono coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso centrale e dell'occhio (Walther e Gruss 1991; Simeone et al., 1994; Acampora et al., 1995).

4.2 MODELLO SPERIMENTALE

Il materiale biologico utilizzato è la *Podarcis sicula*, un Rettile Lacertiliano appartenente all'ordine degli Squamati, le cui forme più antiche risalgono alla fine del Permiano. I rettili sono buoni bioindicatori perché sono adattati a vivere in habitat differenti, hanno un'ampia distribuzione geografica, sono relativamente sedentari e a causa dello stretto contatto con il suolo vengono a contatto con diversi agenti chimici (Crain e Guillette, 1998).

La scelta di *Podarcis* deriva dal fatto che vive anche in aree antropizzate e, di conseguenza, rappresenta una potenziale vittima delle diverse forme di inquinamento, incluso il cadmio. La contaminazione può verificarsi fin dagli stadi precoci di sviluppo in quanto è una specie che depone le sue uova nel terreno. Queste sono protette da un guscio di tipo membranoso, alquanto permeabile, che lascia passare le sostanze con le quali viene a contatto incluso il cadmio (Brasfield et al., 2004).

Anche se è una specie a riproduzione stagionale, la *Podarcis* è un buon modello sperimentale per studiare lo sviluppo embrionale ed i fattori che lo regolano o lo alterano. Gli animali adulti si riproducono anche in cattività e le uova deposte si sviluppano regolarmente, anche se incubate in laboratorio. Per questo motivo, sia gli adulti che gli embrioni possono essere tenuti in laboratorio anche per tempi lunghi e manipolati con facilità.

CAPITOLO 5: MATERIALI E METODI

5.1 ANIMALI ADULTI

Per le indagini sui tessuti (ovaio e fegato) sono state utilizzate femmine adulte di *Podarcis sicula*, opportunamente trattate e mantenute in stabulario in condizioni naturali di temperatura e fotoperiodo, e nutrite con esche vive ed acqua.

Le ovaie sono state prelevate nel periodo primaverile, riproduttivo, da femmine tenute in stabulario in condizioni naturali.

5.2 EMBRIONI

Gli embrioni sono stati ottenuti, per via naturale, da femmine mature nel periodo primaverile compreso tra maggio e giugno. Gli embrioni sono stati prelevati dopo apertura delle membrane ovariali.

Gli stadi di sviluppo degli embrioni sono stati definiti in base alle tavole di Dufaure e Hubert (1966), relative allo sviluppo embrionale di *Lacerta vivipara*, una congenere di *Podarcis sicula*. Gli embrioni utilizzati per questo studio sono stati prelevati a tempi regolari dalla deposizione e corrispondono ai seguenti stadi di sviluppo delle tavole di Dufaure e Hubert:

- **embrioni di 5 giorni** (stadio 24 di Dufaure e Hubert): l'embrione è lungo 3,6 mm, i somiti sono 15 paia, la doccia nervosa è chiusa e le pareti laterali del tronco sono fuse ventralmente;

- **embrioni di 10 giorni** (stadio 28-31 di Dufaure e Hubert): l'embrione è lungo 7,2 mm, i somiti sono 35 paia. L'occhio è a coppa (ferro di cavallo) e nella retina sono evidenti granuli di pigmento. L'encefalo è prominente; in posizione dorsale della testa sono riconoscibili, per trasparenza attraverso la cute, l'epifisi e l'occhio parietale. Il cuore in questa fase è estruso e sporge ventralmente;

- **embrioni di 15 giorni** (stadio 32 di Dufaure e Hubert): l'embrione è lungo 17 mm, presenta arti differenziati in stilopodio, zeugopodio autopodio e quest'ultimo si presenta a paletta;

- **embrioni di 20 giorni** (stadio 34 di Dufaure e Hubert):l'embrione è lungo 20 mm, nell'autopodio si abbozzano le dita. L'occhio presenta le papille sclerotiche.

- **embrioni di 25 giorni** (stadio 35 di Dufaure e Hubert): l'embrione è lungo 22 mm, le dita sono completamente formate, l'arto è palmato per la presenza di membrana interdigitale. Sono presenti gli abbozzi delle palpebre;

- **embrioni a 38 giorni** (stadio 37 di Dufaure e Hubert): l'embrione è lungo 25 mm, le dita sono separate senza membrana interdigitale, le unghie e le scaglie sono formate e l'encefalo è ricoperto da una calotta completa per cui non è più prominente; **embrioni di 55 giorni** (stadio 40 di Dufaure e Hubert): l'embrione è lungo 40 mm, la pelle è pigmentata, l'occhio è ricoperto da palpebre scagliose.

5.3 TRATTAMENTO SPERIMENTALE

5.3.1 Trattamento cronico con CdCl₂ in esemplari adulti

Ad esemplari adulti di *P. sicula* è stato somministrato CdCl₂ ad una concentrazione di 1µg/g di peso corporeo mediante somministrazione per via alimentare di una soluzione di. Il metallo è stato somministrato a giorni alterni per un periodo massimo di trenta giorni. Contemporaneamente gli esemplari controllo hanno subito simile trattamento mediante somministrazione di acqua (subendo quindi lo stesso stress e assimilando le stesse quantità di liquidi degli animali trattati). Dopo 10 e 30 giorni gli animali sono stati sacrificati prelevati gli organi.

5.3.2 Trattamento con CdCl₂ in embrioni di *Podarcis*

a) Programma degli esperimenti

Le uova deposte sono state raccolte e suddivise in gruppi. Per definire il momento in cui le uova sono state messe in terreno contenente cadmio è stata utilizzata la seguente dicitura:

- con la numerazione singola (15, 20, 50 giorni) si indica il tempo, espresso in giorni, intercorso dalla deposizione delle uova al momento del prelievo o del trattamento
- con la numerazione doppia, utilizzata per i trattamenti riportati in tabella 1, si indicano 2 momenti: il primo numero si riferisce allo stadio di sviluppo dell'embrione in cui è iniziato il trattamento, il secondo, alla durata del trattamento. Per le osservazioni macroscopiche dell'embrione in toto e citologiche le uova sono state suddivise in 2 gruppi secondo il seguente schema:

1. Embrioni di controllo: gli embrioni sono stati prelevati ad intervalli di tempo regolari dalla deposizione alla schiusa, che avviene dopo circa 55 giorni di sviluppo, fotografati e fissati per la microscopia ottica.

2. Embrioni trattati sperimentalmente con cadmio: le uova a vari stadi di sviluppo sono state incubate in un terreno contenente cadmio ad una concentrazione di 50mg/Kg di terreno, opportunamente scelta sulla base dei dati disponibili in letteratura, secondo lo schema riportato in tabella.

Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	Gruppo D	Gruppo E	Gruppo F
0+5	5+5	10+5	15+5	20+5	25+5
0+10	5+10	10+10	15+10	20+10	25+10
0+15	5+15	10+15	15+15	20+5	25+15
0+20	5+20		15+20	20+20	25+20
0+40			15+25	20+25	
			15+30		

5.4 PRELIEVO

5.4 1 Tessuti adulti

Dopo apertura della cavità peritoneale, le ovaie ed il fegato sono stati prelevati mediante l'uso di pinzette e forbici. Gli organi sono stati immediatamente trasferiti nel fissativo.

5.4.2 Embrioni

Dopo aver lacerato, con l'aiuto di pinzette, il guscio membranoso dell'uovo, è stato estratto l'embrione ed il sacco vitellino. Gli embrioni sono stati ripuliti dalle membrane, messi in soluzione fisiologica e facendo uso di uno stereomicroscopio e di una macchina fotografica, fotografati e quindi fissati per le analisi morfo-citologiche e molecolari.

5.5 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA MICROSCOPIA OTTICA

5.5a Fissazione

Gli embrioni ed i tessuti adulti prelevati sono stati fissati in Bouin (15 ml di acido picrico, 5 ml di formalina, 1 ml di acido acetico) per 6 ore. Successivamente gli embrioni sono stati lavati in alcool etilico 75°, disidratati in alcool 95° (24 ore), in alcool 100° (3 ore) e chiarificati in xilolo (almeno 48 ore). In seguito le teste degli embrioni sono state separate dai tronchi, i frammenti lavati in benzene (30min.) e inclusi in paraffina.

I preparati sono stati sezionati al microtomo e le sezioni seriate (5-7 µm) sono state montate su vetrini poli-lisinati (10 µl di soluzione acquosa di poli-L-lisina, Sigma; 1mg/ml) tenuti su piastra riscaldata ad una temperatura massima di 40°C fino alla completa distensione delle fette.

5.5b Colorazioni citologiche.

Emallume/eosina.

Le fette, immerse per 1-5 min in emallume-acido di Mayer, sono state sciacquate in H₂O distillata e di fonte per 15 min e colorate con eosina 0,25% acidificata per 5 sec. Segue il risciacquo in H₂O distillata, la disidratazione e il montaggio dei vetrini con DPX.

Colorazione Galgano.

I preparati sono stati immersi in emallume-acido di Mayer per 5 min, lavati in acqua distillata e di fonte per 20 minuti, passati in fucsina (0,1% acidificata) per 1 min, lavati in acqua distillata, passati nella miscela Mallory (0,5% blu di metile, 2% orange G 2:1 v/v, con aggiunta di 2,5% acido acetico) per 1 h, lavati in H₂O distillata, differenziati ed infine disidratati e montati

Le sezioni sono state sparaffinate in xilolo, reidratate in alcool etilico e colorate con l'emallume eosina o con la Galgano.

5.5c Conte cellulari

Il numero delle piastre mitotiche e delle cellule di Kupffer è stato determinato per unità arbitraria di superficie, su sezioni di campioni di controllo e trattati. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica (ANOVA) utilizzando un programma di statistica per dati organizzati in Excel.

5.5d. Reazione con anti-Pax6

Le sezioni sono state sparaffinate, lavate in TBS (10mM Tris-HCl, 130mM, pH 7,2-7,4) tre volte per 5 min ognuna, bollite in tampone citrato (0,01M pH 6,0) per 10 min, rilavate in TBS e incubate con la soluzione di H₂O₂ (0,3% in TBS) per 20 min. Le sezioni sono state incubate con siero di capra (1:200) in TBS per 30 min in camera umida a temperatura ambiente. Le sezioni sono state incubate con anticorpo IgG anti-mouse biotinilato (gentilmente donato dal prof. A. Kawakami) diluito 1:100 v/v in TBS e lasciate over night.

Le sezioni sono state lavate in TBS (3 per 5 min) ed incubate con anticorpo secondario coniugato con biotina in camera umida a temperatura ambiente (1:200 v/v in 20% di siero di capra) per 1 ora . Sono stati effettuati nuovamente i lavaggi in TBS (3 per 5 min). Le sezioni sono state incubate con ABC kit (Vector laboratories) cui segue la rivelazione con DAB e UREA (Sigma Fast). Le fette sono state disidratate e i vetrini montati con DPX.

5.5e Ibridazione in situ

Per l'ibridazione le sezioni sono state sparaffinate e idratate nella serie discendente degli alcool, fissate in paraformaldeide 4% in PBS, per 30 minuti e ad una temperatura di 4°C, ed immerse nella soluzione proteinasi-K (proteasi-K 10 µg/ml in Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM pH 7.2) ad una temperatura di 37°C per 15 minuti.

Ad ogni step le sezioni sono state lavate in PBS (3 passaggi della durata di 5 minuti ciascuno).

Per l'ibridazione condotta usando una sonda a cDNA le sezioni sono state preibridate a 37°C per un tempo di 60 minuti utilizzando una miscela di formammide 40%, SSC 5x, Denhardt's 1x (Ficoll 0.02%, PVP 0.02% BSA 10mg/ml), tRNA+DNA carrier, e incubate con la mix di ibridazione (cDNA 1 mg/ml in mix di preibridazione), precedentemente riscaldata a 100°C, in camera umida a 43°C overnight. Dopo ibridazione le sezioni sono state lavate con SSC 20x (NaCl 3M, citrato di Na 0.3M pH 7.0) a salinità decrescente.

Per l'ibridazione condotta usando una sonda ad RNA le sezioni sono state preibridate a 68°C per 60 minuti utilizzando una miscela di 50% formammide, 5x SSC, pH 7, 10 mg/ml blocking (Boehringer Mannheim), 1 mg/ml tRNA, 0.1 mg/ml eparina (Becton-Dickinson), 0.1% Tween 20, 0.1% Chaps (Sigma), e 5 mM EDTA, e incubate con la mix di ibridazione (RNA 1 mg/ml in mix di preibridazione), precedentemente riscaldata a 100°C, in camera umida a 68°C overnight. Dopo ibridazione le sezioni sono state lavate con SSC 2x (pH 4.5), e in 50% formammide, 2x SSC a 65°C (2 passaggi della durata di 5 minuti ciascuno).

Successivamente le sezioni sono state lavate in buffer A (Tris-HCl 1M pH 7.5, NaCl 2.5 M) per 5', incubate in buffer B (Bloacking reagent 0,5%) per 30' minuti ed incubate al buio e per 2 ore con anticorpo anti digossigenina-AP (Boehringer Mannheim) ad una concentrazione di 1:100 in buffer B. I preparati sono stati poi lavati in buffer A (2 passaggi da 15'), incubati in buffer C (Tween 20 10%, levamisole 50 mg/ml) per 15' e colorati con una miscela di colorazione (1 ml BM-purple + 10 µl buffer C).

La colorazione è stata seguita e bloccata in TE 1x per di 15'. I vetrini sono stati montati con la soluzione di montaggio (glicerolo 50% in TE 1x).

5.6 MARCATURA DELLA SONDA

a) cDNA

La marcatura è avvenuta mediante PCR contenente cDNA a singola elica (0,5 µg), 5U di Taq DNA polimerasi (Perkin Elmer), 0,2 mM (concentrazione finale) di dNTP in Tris/HCl marcati con digossigenina (Roche) 10 mM pH8,3, KCl 5 mM, MgCl₂ 2,5 mM, e 50 pmoli di ciascuno dei primers specifici disegnati sul frammento da amplificare disponibili in laboratorio.

b) RNA

Sonda antisenso: il frammento di cDNA clonato in PCRII-Topo (materiali e metodi paragrafo 5.6.c) è stato linearizzato con l'enzima Hind III, il DNA recuperato nella soluzione di PhOH/CHCl₃ e poi precipitato in NaAc 0,3M pH 5.2 e etanolo, vortexato ed incubato a -20 °C overnight. Il campione è stato lavato in etanolo 70° il ed il pellet è stato sciolto in H₂O. La sintesi dell'RNA è avvenuta nella soluzione contenente Dig Mix 1x Transcription Buffer 1x, RNase Block, plasmide linearizzato, la T7 RNA polimerasi incubato a 37°C overnight. L'RNA è stato precipitato in NaAc 0,1 M ed incubato -20 °C overnight. L'RNA è stato lavato in etanolo 70x, il pellet è stato recuperato in formammide 50%, SSC 1x pH 7.0. Sonda senso: la sonda è stata ottenuta utilizzando lo stesso protocollo usato per la sonda antisenso utilizzando l'enzima XhoI e RNA polimerasi SP6.

5.7 ISOLAMENTO DELL'RNA

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il reagente TRI-REAGENT (Sigma Chemical), secondo il metodo messo a punto da Chomczynski e Sacchi (1987). Gli embrioni in toto sono stati omogeneizzati con 1 ml di reagente per 100 mg di tessuto. Il campione è stato agitato, lasciato a temperatura ambiente per 10min. e centrifugato a 17.000g per 15 min. Dopo la centrifugazione, è stata prelevata la fase acquosa contenente l'RNA, che è stato recuperato mediante precipitazione con isopropanolo. Il campione è stato successivamente centrifugato a 6.700g per 5 min. e il pellet è stato sciolto in H₂O trattata con l'inibitore delle ribonucleasi DEPC (diethylpircarbonato) 0,1%. La purezza e la concentrazione dell'RNA sono state verificate sia spettrofotometricamente che mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% in tampone TAE (Tris-Acetato-EDTA), con un apparecchio per l'elettroforesi orizzontale. La corsa è durata 30 min a 50 Volts costanti. Nella composizione del gel è stato aggiunto bromuro d'etidio ad una concentrazione finale di 1 mg/ml, che permette di visualizzare l'RNA mediante irraggiamento del gel con luce ultravioletta.

5.8 PRODUZIONE DEI cDNA A SINGOLA ELICA.

Il cDNA a singola elica è stato prodotto a partire da 5µg di RNA totale da embrioni di *Podarcis sicula* (20 giorni di sviluppo) controllo e trattati, mediante polimerizzazione con l'enzima Trascrittasi Inversa. L' RNA è stato denaturato alla temperatura di 70°C per 3 min, ed è stato retrotrascritto aggiungendo 10 pmoli di una miscela contenente i deossiribonucleotidi dATP, dGTP, dTTP e dCTP, 20 unità di RNAsina (Promega), 200 unità dell'enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) e, come primer di innesco per la reazione, 50 pmoli di un oligo(dT)₁₇ fornito di un adattatore costituito da 27 basi: CGGAGATCTCCAATGTGATGGGAATTC(T)₁₇. La reazione è stata condotta a 42°C per 1 ora, successivamente l'enzima è stato inattivato per 5 min a 65°C.

5.9 AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Le PCR sono state condotte utilizzando come DNA stampo il cDNA a singola elica ottenuto dalla reazione di trascrizione inversa. Come innesco della reazione sono stati utilizzati primer specifici disegnati per Pax-6 ed Otx2, in direzione 5'-3' (forward o senso) e in direzione 3'-5' (reverse o antisenso). I primer, riportati in tabella, sono stati disegnati sulla base delle sequenze nucleotidiche presenti nella banca dati EMBL ed allineati mediante programma BLASTA.

Elenco degli oligonucleotidi usati per le reazioni di PCR.

Nome	Sequenza nucleotidica (direzione 5'-3')	Direzione
Pax6 For1	GGCACCAGGCCTGGGTGGTA	senso
Pax6 For2	CATCAGTTCAAATGGGGAAGATTC	senso
Pax6 Rev1	CCAGGAACTTGAAGTGGAACTGA	antisenso
Pax6 Rev2	GGGCTGGTGGGCAGCATGCA	antisenso
Pax6 Rev3	GCCATGGTGAAGCTGGGCAT	antisenso
Otx for1	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAA	senso
Otx for2	CAGAAGTCCTACCCCATGACCTA	senso
Otx rev1	ATCCAAGCAGTCAGCATTGAAGT	antisenso

La miscela di reazione delle PCR conteneva: un'aliquota di cDNA a singola elica (0,5 µg), 5U di Taq DNA polimerasi (Perkin Elmer), 50 pmoli di ciascuno dei primers sopra citati, 0,2 mM (concentrazione finale) di dNTP in Tris/HCl 10 mM pH8,3 contenente KCl 5 mM e MgCl₂ 2,5 mM. Dopo una denaturazione a 95°C per 3 min, i successivi cicli di PCR erano costituiti nel seguente modo: 95°C per 1 min, 55°C per 1 min, 72°C per 1 min (30 cicli), seguiti da un ciclo finale di polimerizzazione a 72 °C per 15 min. I cicli di PCR sono stati condotti su un blocco termico programmabile PCR Express Hybaid.

5.10 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO.

I prodotti delle amplificazioni da PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1.5% in tampone TAE, con un apparecchio per l'elettroforesi orizzontale. La corsa è durata 30 min a 100 Volts costanti; come indicatore di peso molecolare è stata usata una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto. Nella composizione del gel è stato aggiunto bromuro d'etidio ad una concentrazione finale di 1 µg/ml, che permette di visualizzare i frammenti di DNA mediante irraggiamento del gel con luce ultravioletta. Le relative bande sono state recuperate dal gel utilizzando il kit Qiaquick (Qiagen).

5.11 PRODUZIONE DEL PLASMIDE RICOMBINANTE

Il cDNA proveniente dalle varie PCR è stato inserito nel vettore plasmidico pCRII-TOPO, già linearizzato, contenuto nel kit TOPO TA Cloning (Invitrogen). Tale vettore determina la resistenza all'antibiotico Ampicillina da parte del batterio ospite; inoltre lega covalentemente l'enzima

Topoisomerasi I e presenta la caratteristica di avere alle estremità 3' una T-protrudente, complementare alla A protrudente presente al 3' del DNA amplificato per PCR. Il cDNA è stato inserito nel plasmide mediante incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.

5.12 TRASFORMAZIONE DI CELLULE BATTERICHE CON IL PLASMIDE RICOMBINANTE

Per la trasformazione delle cellule batteriche da parte del plasmide ricombinante è stato utilizzato lo shock termico che provoca il passaggio del DNA plasmidico attraverso la parete della cellula batterica. Il ceppo di *Escherichia coli* utilizzato è il TOP10F', che garantisce un'alta efficienza di trasformazione. Le cellule che captano il DNA plasmidico crescono su terreno contenente Ampicillina, per la quale il plasmide porta la resistenza. Due μl della miscela proveniente dalla reazione con l'enzima Topoisomerasi I sono stati aggiunti a 40 μl di cellule competenti ed i campioni sono stati incubati su ghiaccio per 30 minuti. Lo shock termico è stato effettuato mediante incubazione a 42° C per 30 secondi. Al termine di questa reazione ai campioni sono stati aggiunti 250 μl di SOC-medium ed è stata effettuata la crescita delle cellule batteriche a 37° C per 30 minuti. Dopo tale periodo, 100 μl della coltura sono stati piastrati su terreno solido (LB-Agar + Ampicillina 50 $\mu\text{g/ml}$) e le piastre sono state incubate a 37° C per 16 ore, per permettere la crescita dei batteri ricombinanti.

5.13 PURIFICAZIONE DEL PLASMIDE RICOMBINANTE

Il DNA plasmidico è stato purificato utilizzando il Qiaprep Pasmid kit (Qiagen) basato sul metodo della lisi con alcali descritto da Sambrook e coll. (1982). Una singola colonia batterica del ceppo opportunamente trasformato con il plasmide contenente il frammento di DNA esogeno è stata inoculata in 5 ml di LB contenente ampicillina 50 $\mu\text{g/ml}$ e fatta crescere a 37°C per 16 ore. La coltura è stata poi centrifugata a 8.000g per 15 min ed il pellet batterico risospeso in tampone Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenente EDTA 10 mM. Successivamente la sospensione batterica è stata lisata in condizioni alcaline ed il lisato neutralizzato in un tampone ad elevata concentrazione salina. Il DNA plasmidico è stato quindi adsorbito su una colonnina di gel di silice e separato da RNA, proteine ed altri componenti cellulari. L'eluizione finale è avvenuta mediante Tris 10 mM pH 8,0.

5.14 SEQUENZIAMENTO DEI CDNA

Il DNA plasmidico purificato è stato sottoposto a sequenziamento automatico dalla ditta PRIMM *Biotech*, usando, come innesco della reazione di sequenziamento, i primer T7 e SP6, complementari a specifiche sequenze presenti sul plasmide, ai lati del sito di clonaggio.

5.15 ANALISI DI NORTHERN BOT

a. Elettroforesi su gel di agarosio in condizioni denaturanti.

L'RNA totale estratto dagli embrioni di *P. sicula* controllo (20 giorni) e trattato (0+20 Cd) è stato frazionato mediante elettroforesi orizzontale su gel di agarosio all'1,2%, contenente 2,2 M

formaldeide. La corsa elettroforetica è stata condotta a 90 V costanti per 6 ore in tampone MOPS (acido morfolinopropansulfonico 0,02 M, acetato di sodio 5 mM, EDTA 1 mM).

b. Trasferimento su filtro dell'RNA

L'RNA è stato trasferito dal gel di agarosio ad una membrana di nylon caricata positivamente (IMMOBILION-Ny+, Millipore) per capillarità per 16 ore. Prima del trasferimento il gel e la membrana sono stati lavati in SSC 20X per 20 min. Per effettuare il trasferimento, in una vaschetta contenente SSC 10X è stata posta una piattaforma di dimensioni superiori a quelle del gel, su cui è stato adagiato un foglio di carta Whatman 3MM, funzionante da ponte, imbevuto di soluzione di trasferimento ed avente le estremità pescanti nel liquido di trasferimento. Al centro del ponte è stato posto il gel e su questo una membrana di nylon, Al centro del ponte è stato posto il gel e su questo una membrana di nylon, anch'essa imbevuta di soluzione di trasferimento. Sopra la membrana è stato disposto un sistema costituito da alcuni fogli di carta Whatman 3MM, una pila di fogli di carta da filtro ed infine una lastra di vetro su cui è stato adagiato un peso di circa 1/2 kg. Al termine del trasferimento, l'RNA è stato fissato sulla membrana mediante esposizione di quest' ultima ai raggi UV per 3-5 minuti. L'avvenuto blotting è stato verificato colorando il filtro con blu di metilene 0.02% in 0.3M NaAc (pH 5.5) fino alla visualizzazione dell'RNA (3-5min). Il filtro è stato poi decolorato con una soluzione SSC 0.2X-SDS 1% per 15min a temperatura ambiente.

c Marcatura della sonda a cDNA

I frammenti di cDNA codificanti la MT, Fzr, Pax6 e Otx2 (20-25 ng) sono stati resi radioattivi mediante il metodo della random priming (Sambrook e coll., 1982) utilizzando 20 μ Ci di [α -³²P]dCTP. Il nucleotide radioattivo non incorporato in eccesso è stato allontanato mediante eluizione su colonnina MicroBiospin P30 (Bio-Rad).

d Ibridazione

Le membrane, sulle quali è stato immobilizzato l'RNA totale, sono state preibridate utilizzando la soluzione ULTRAhyb (Ambion) a 42°C per 2 ore. L'ibridazione è avvenuta nella stessa soluzione di preibridazione, a cui è stata aggiunta ciascuna sonda di cDNA precedentemente marcata e denaturata a 100°C per 5 min., a 42°C per 16 ore. Dopo l'ibridazione le membrane sono state lavate in SSC 0,25X e SDS 0.1% a 50°C, asciugate all'aria ed autoradiografate per 16 ore a -80°C.

e. Analisi densitometrica

L'analisi quantitativa delle bande di ibridazione è stata effettuata mediante ulteriore autoradiografia con l'apparecchio PhosphorImager (Storm Imaging System, Amersham Pharmacia Biotech) corredato di software Image Quant (Molecular Dynamics). L'integrità e la quantità di RNA totale caricato sono state determinate mediante colorazione dei filtri con blu di metilene allo 0,04% in 0,5 M sodio acetato pH 5,2 per 10 minuti.

5.16 ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI ED ELABORAZIONE DELLE TAVOLE.

Le immagini di microscopia ottica sono state acquisite utilizzando una telecamera Progress 3800 (Kontron Elettronica) montata su un microscopio Zeiss Axioskop ed il programma Ks300. Le foto sono state assemblate in tavole, utilizzando programmi specifici di grafica per PC.

CAPITOLO 6: EFFETTI DEL CADMIO SULLO SVILUPPO EMBRIONALE

6.1 ANALISI MACROSCOPICA DEGLI EMBRIONI (IN TOTO)

Tutti gli embrioni trattati e di controllo, al momento del prelievo erano vitali, avevano un cuore pulsante e dimensioni normali.

6.1.1 Embrioni di controllo

Negli embrioni a 5 giorni di sviluppo (fig. 1A) il capo è ben definito, le vescicole encefaliche e l'occhio sono prominenti. Nel collo sono visibili gli abbozzi delle tasche branchiali e nel tronco gli abbozzi degli arti. A 10 giorni di sviluppo (fig. 1B) l'encefalo è globoso e sporge dorsalmente, l'occhio sporgente lateralmente si presenta scarsamente pigmentato con cristallino ben visibile. Gli arti sono allungati e terminano a paletta. A 20 giorni di sviluppo (fig. 1C) l'encefalo è ancora prominente nella regione dorsale posteriore ove sono ben distinti i due lobi mesencefalici. L'occhio è pigmentato ed il cristallino chiaramente riconoscibile. Gli arti sono allungati, e l'autopodio è ancora, a paletta. A 25 giorni (fig. 1D) nell'encefalo dorsalmente sono evidenti gli emisferi mesencefalici globosi e quelli telencefalici, appiattiti e allungati. Nell'arto, lo stilopodio e lo zeugopodio sono distinti e nell'autopodio le dita sono palmate. A 35 giorni di sviluppo (fig. 1E) è delineato il profilo della scatola cranica e le vescicole encefaliche e l'occhio risultano contenuti nella scatola; le palpebre sono completamente formate. Gli arti sono completi, le dita sono separate. Gli embrioni a 55 giorni di sviluppo (fig 1F) sono pronti per la schiusa. La pelle è pigmentata rivestita da squame e all'estremità delle dita sono evidenti le unghie.

6.1.2 Embrioni trattati

La maggior parte degli embrioni trattati presenta notevoli alterazioni a livello della testa mentre il tronco e gli arti sembrano normali. In particolare, il 40% degli embrioni presenta anomalie a carico dell'encefalo ed il 32% alterazioni in uno o in entrambi gli occhi. Le alterazioni sono più frequenti negli embrioni che sono stati incubati con cadmio durante le prime fasi dello

sviluppo. Nell'encefalo le vescicole possono essere appiattite (fig. 2A,F), con ridotto sviluppo in senso antero-posteriore (fig. 2D), parzialmente (fig. 2D) o completamente (fig. 2H) estruse dalla volta cranica. Eccezionalmente, l'encefalo può essere assente (fig. 2G).

L'occhio può essere appena abbozzato (fig. 2C), di dimensioni ridotte (fig. 2F), completamente formato e collassato (fig. 2B), estruso dalla volta cranica (fig. 2D). Raramente assente (fig. 2G)

6.2 ANALISI MICROSCOPICA

Gli embrioni trattati con cadmio e quelli di controllo sono stati analizzati a livello istocitologico al fine di definire l'entità degli effetti esercitati dal metallo sui tessuti e sugli organi. Le osservazioni dimostrano che tutti gli embrioni trattati presentano tessuti edematosi e organi interni normali. Nei controlli e nei trattati il polmone (fig. 3A-B), il rene (fig. 3C-D), l'intestino (fig. 3E-F) e il fegato (fig. 3G-H), infatti, sono di dimensioni, forma e organizzazione istologica paragonabili, dimostrando così che per questi organi lo sviluppo negli embrioni trattati procede con le stesse modalità e tempi osservati negli embrioni di controllo.

Non si osservano alterazioni significative anche a carico del midollo allungato e del midollo spinale. Nei controlli (fig. 5B) e nei trattati a 5 e 10 giorni (fig. 5B) il midollo allungato è ben riconoscibile e presenta un ampio ventricolo e sostanza grigia periventricolare. In embrioni a 20 giorni il midollo allungato (fig. 6E) presenta un ampio ventricolo dorsale, parete particolarmente spessa e sostanza grigia dispersa. Nelle varie sezioni si nota la presenza di alcuni nuclei diffusi che diventano meglio individuati negli embrioni a 40 giorni (fig. 6F). Il midollo spinale in embrioni di controllo e trattati a 5 giorni di sviluppo si presenta con canale ependimale allungato in senso dorsoventrale circondato da sostanza grigia e, più esternamente, da sostanza bianca (dato non mostrato). In embrioni di controllo (fig. 4A) e trattati (fig. 4B) a 20 giorni di sviluppo la sostanza grigia si organizza in corna dorsali e ventrali intorno ad canale ependimale ridotto. A 40 giorni il midollo spinale presenta in tutti i campioni con corna dorsali e ventrali, canale ependimale ulteriormente ristretto (fig. 4C) e cellule gliali (fig. 4D) sparse tra le fibre della sostanza bianca.

Le indagini citologiche dimostrano la presenza di alterazioni a livello della struttura ossea del capo; queste includono la mancanza di volta cranica (fig. 9A) e vari gradi di deformazione della base del cranio e del palato (fig. 7A, C), delle capsule otiche (fig. 9B) e delle mascelle (fig. 7C). Le

indagini confermano, inoltre, che alterazioni significative si hanno anche a carico dell'encefalo e, tra gli organi di senso, dell'occhio e, occasionalmente, degli organi vomeronasali (fig. 7F).

6.2.1 Effetti del cadmio sullo sviluppo dell'encefalo

Le indagini citologiche dimostrano che negli embrioni trattati sono presenti alterazioni non evidenziabili ad un esame macroscopico, che queste sono simili negli embrioni trattati precocemente (0+5, 0+10, 0+20) e in quelli che hanno avuto il trattamento in fasi più avanzate di sviluppo (10+Cd o 15+Cd) e che sono più frequenti negli embrioni che sono stati incubati durante le prime fasi dello sviluppo.

Le maggiori alterazioni si verificano a carico di telencefalo, diencefalo e mesencefalo che possono presentarsi dilatati, asimmetrici o talvolta estrusi; rari i casi di anencefalia ($\approx 5\%$ degli embrioni).

a) Telencefalo, diencefalo, mesencefalo negli embrioni controllo

In embrioni di controllo a 5 giorni di sviluppo (fig. 5A) il pro ed il mesencefalo hanno pareti in cui si riconoscono la sostanza grigia, internamente, e la sostanza bianca perifericamente.

Negli stadi successivi di sviluppo, dopo 8 giorni dalla deposizione quando il proencefalo è diviso in telencefalo e diencefalo, le tre vescicole anteriori sono ben distinte tra loro:

Telencefalo. Negli embrioni a 10 giorni di sviluppo il telencefalo presenta due evidenti emisferi anteriori (fig. 5C) e una regione impari, posteriore, con ampio ventricolo (fig. 5D). A 20 giorni (fig. 6A) i due emisferi presentano ventricoli allungati in senso dorso-ventrale e slargati dorsalmente. La parete è formata da un sottile pallio nella regione dorso-mediale, uno spesso striato nella regione ventro-laterale, e da un setto nella regione ventrale. La sostanza grigia è localizzata in posizione periventricolare. A 40 giorni (fig. 6B) i ventricoli sono ridotti e spostati dorsalmente per l'aumento dello striato e del setto. Nella regione del pallio le cellule nervose sono organizzate a formare una sottile corteccia.

Diencefalo. Negli embrioni di controllo a 10 giorni di sviluppo il diencefalo (fig. 5E) si presenta allungato dorso-ventralmente ed è visibile l'abbozzo dell'ipofisi. La parete della vescicola è formata da uno strato di sostanza grigia periventricolare circondato da sostanza bianca ispessita in posizione mediale, in cui si notano due grossi nuclei in formazione. A 20 giorni di sviluppo il diencefalo (fig. 6C) è ancora una vescicola impari, allungata dorso-ventralmente con ventricolo

centrale, slargato medialmente e dorsalmente, in corrispondenza dell'epitalamo. La parete è costituita da uno strato di sostanza grigia piuttosto spesso e da uno strato di sostanza bianca più periferico, particolarmente spesso in posizione medio-ventrale. Con il procedere dello sviluppo (fig. 6D) la parete si ispessisce ulteriormente, soprattutto nella regione del talamo, il ventricolo si riduce. La sostanza grigia si riorganizza a formare grossi nuclei diffusi nella sostanza bianca; l'ipotalamo si organizza ventralmente.

Mesencefalo. Negli embrioni di controllo il mesencefalo (fig. 5F) a 10 giorni di sviluppo è una vescicola impari, con ampio ventricolo e parete formata da sostanza grigia periventricolare e sostanza bianca ispessita in posizione laterale e ventrale. A 20 giorni il mesencefalo (fig. 6E) si presenta come una vescicola prominente dorsalmente, ancora impari con lobi ottici appena abbozzati. La parete, dorsalmente sottile, si ispessisce medialmente trapassando nel corpo in cui prevale la sostanza bianca. La sostanza grigia dorsalmente è addossata all'ampio ventricolo ed organizzata in due strati di cui il più profondo appare più denso; ventralmente si organizza in nuclei dispersi tra la sostanza bianca. Negli embrioni a 35 giorni (fig. F) si riconoscono i due lobi ottici caratterizzati da un tetto ottico, dorsale in cui la sostanza grigia è organizzata in corteccia (fig. 6G).

b) Telencefalo, diencefalo, mesencefalo negli embrioni trattati

Telencefalo. Il cadmio interferisce con lo sviluppo del telencefalo: il 60% circa degli embrioni presenta alterazioni la cui entità varia da individuo ad individuo. In particolare, il telencefalo può presentare ventricoli dilatati con parete assottigliata, per il ridotto sviluppo della sostanza bianca e/o grigia, interrotta in corrispondenza del limite tra pallio e setto (fig. 7C,D). In alcuni casi lo sviluppo dei due emisferi è asimmetrico (fig. 7A-B). In circa il 30% degli embrioni, il telencefalo può essere estruso all'esterno per mancanza della volta cranica (fig. 7A-B). In rari casi, si osserva l'assenza della vescicola (fig. 7F).

Diencefalo. Il trattamento con cadmio induce significative alterazioni nel 60% circa degli embrioni. Il diencefalo si presenta con ventricolo ridotto (fig. 8A-B) e/o dilatato in posizione dorsale e ventrale (fig. 8C). La parete presenta riduzione della sostanza bianca e/o grigia (fig. 8B, D), interruzioni in posizione dorsale (fig. 8A-B), asimmetria (fig. 8A-B). In alcuni casi la vescicola è estrusa per mancanza della scatola cranica (fig. 8A-B), raramente è assente (fig. 8E).

Mesencefalo. Il trattamento con cadmio induce significative alterazioni della vescicola in oltre il 70% degli embrioni. Di questi, i due terzi circa presentano lobi ottici estrusi dalla volta

cranica (fig. 9A) e/o asimmetrici (fig. 9B-C). Le alterazioni sono principalmente a carico della parete del tetto ottico, che forma pliche che invadono il ventricolo totalmente (fig. 9B-C) o parzialmente (fig. 9E-F). In corrispondenza delle pliche la corteccia conserva la sua normale stratificazione (fig. 9D) e sono presenti numerose cellule in mitosi (fig. 9D,G). In alcuni embrioni la vescicola è dilatata e la parete sottile a causa del ridotto sviluppo della sostanza bianca (fig. 9E). Tale anomalia frequentemente si associa a una significativa riduzione anche delle regioni basali del corpo (fig. 9E).

6.2.2 Effetti del cadmio sullo sviluppo dell'occhio

Anche nell'occhio l'analisi citologica rivela l'esistenza di alterazioni più diffuse di quanto non dedotto osservando gli embrioni in toto: il 50% degli occhi esaminati presenta, infatti, retina alterata. Come nell'encefalo, anche nell'occhio la tipologia delle alterazioni è indipendente dal tipo di trattamento subito: le alterazioni sono più frequenti negli embrioni che sono stati incubati con cadmio durante le prime fasi dello sviluppo.

A 5 giorni la coppa ottica è schiacciata e costituita da una retina non differenziata (fig. 10A) in cui si notano molte cellule in proliferazione nella regione prossimale (fig. 10B) e distale al cristallino (fig. 10C). A 10 giorni l'occhio assume la sua tipica forma globosa (fig. 10D), l'umore vitreo diventa abbondante e la retina si presenta ancora indifferenziata con mitosi diffuse (fig. 10E-F). A 20 giorni la retina nella regione distale al cristallino mostra un'organizzazione a 6 strati (fig. 10G) e assenza di cellule in mitosi (fig. 10H). Viceversa, nella regione prossimale in cui la retina non è stratificata le mitosi sono ancora numerose (fig. 10I). A partire dai 35 giorni (fig. 10L) e fino alla schiusa (fig. 10M) la retina si presenta costituita da sei strati che, partendo dall'esterno verso l'interno, sono: lo strato pigmentato, lo strato nucleare esterno, lo strato plessiforme esterno, lo strato nucleare interno, plessiforme interno, lo strato delle cellule gangliari e lo strato delle fibre ottiche (fig. 10N). Le mitosi sono diventate molto rare.

Il trattamento con cadmio induce severe alterazioni a carico della retina. Essa si presenta collassata (fig. 11A, D), ripiegata ad invadere l'umore vitreo (fig. 11A, D, E, H) o, in alcuni casi, estrusa dall'orbita (fig. 11H-I). A livello delle pliche, i neuroni si presentano regolarmente disposti con stratificazione evidente negli embrioni in stadi più avanzati (fig. 11F-G). Nelle pliche si osserva un elevato numero di cellule in proliferazione (fig. 11L) rispetto alle regioni non ripiegate (fig. 11C).

Sviluppo degli embrioni in condizioni normali

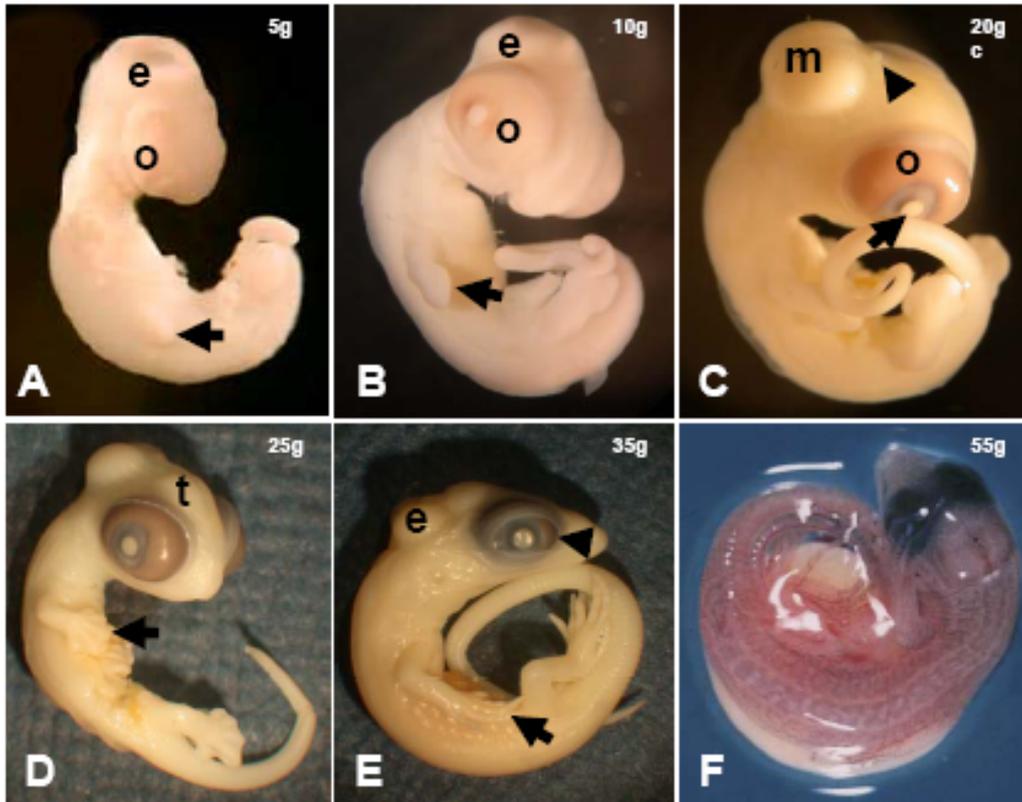


Figura 1: stadi dello sviluppo. (A) embrione con vescicole encefaliche (e) ed occhio (o) prominenti e arti appena abbozzati (freccia). (B) embrione con encefalo (e) globoso e occhio con pigmento disposto a ferro di cavallo (o). Si nota l'arto a paletta (freccia). (C) embrione con lobi mesencefalici (m) prominenti, occhio (o) ben pigmentato e cristallino evidente (freccia). Anteriormente al mesencefalo si nota l'epifisi (punta di freccia). (D) embrione con vescicola telencefalica (t) sporgente e arti con autopodio a dita palmate (freccia). (E) embrione con encefalo (e) poco sporgente, occhio con palpebre differenziate (punta di freccia), arti con dita completamente separate (freccia). (F) embrione pronto per la schiusa. Si nota la pelle pigmentata e la presenza di unghie.

Alterazioni macroscopiche indotte dal cadmio

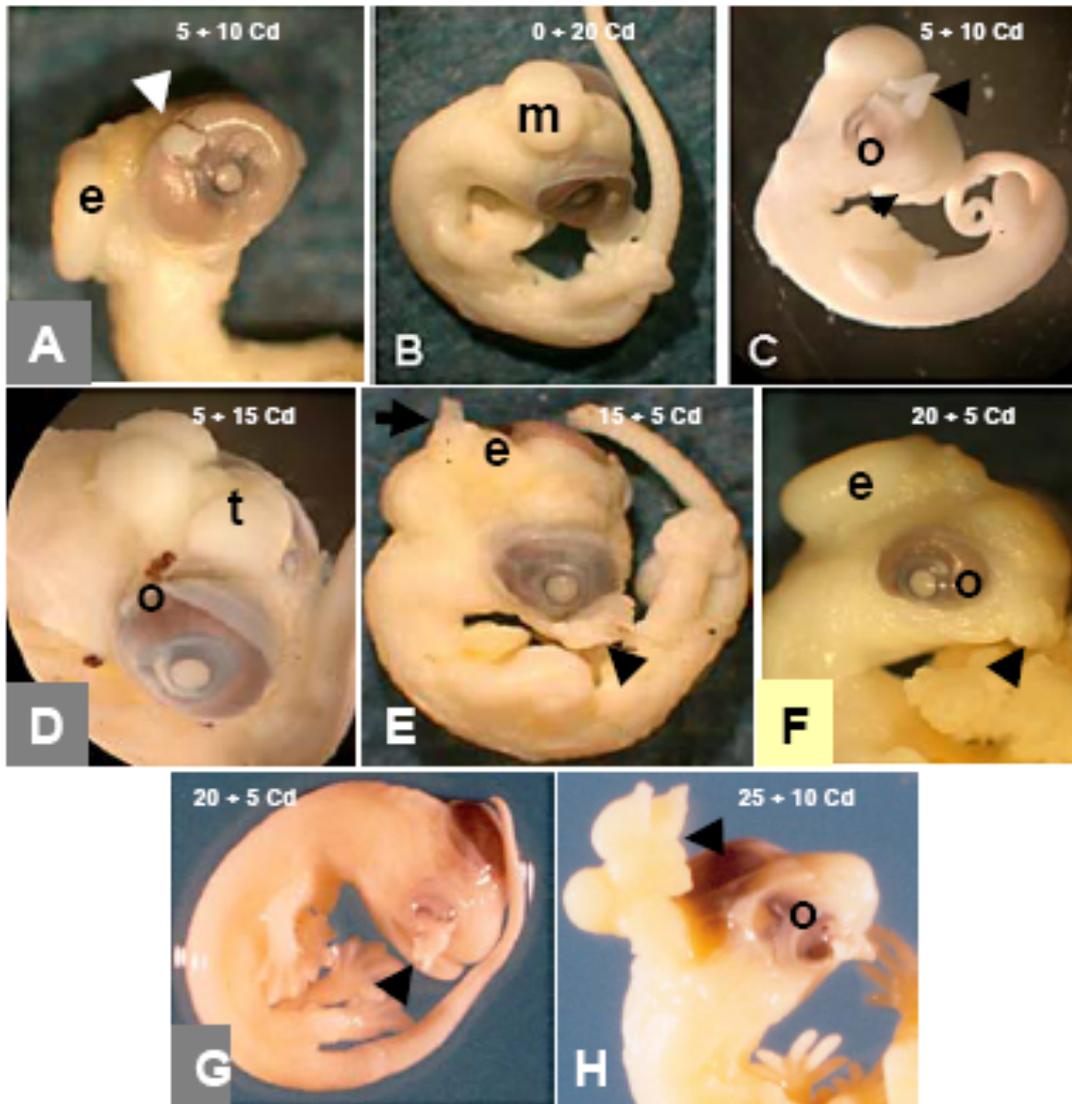


Figura 2: alterazioni macroscopiche indotte dal cadmio. (A) occhio con retina irregolare (punta di freccia) e encefalo appiattito (e). (B) embrione con vescicola mesencefalica (m) estrusa. (C) embrione con occhio malformato (o) con retina estroflessa (punta di freccia) e bocca alterata. (D) particolare in cui si nota le vescicola telencefalica (t) particolarmente globosa. (E) estroflessione (freccia) dell'encefalo e della retina (punta di freccia). (F) embrione con encefalo appiattito (e) e occhio (o) deformato. Si nota un ammasso carnoso sul muso (punta di freccia). (G) embrione con occhio appena abbozzato e retina estroflessa (punta di freccia). (H) embrione con encefalo estruso (freccia). Si nota anche la presenza di un occhio (o) alterato.

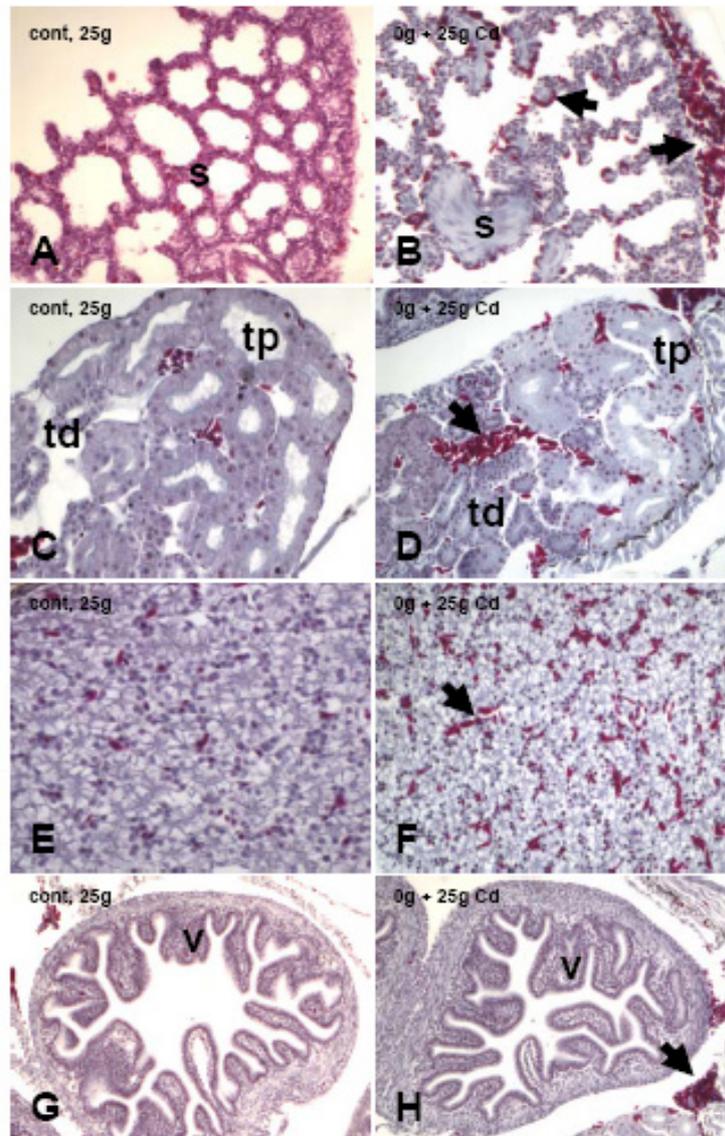


Figura 3: effetti del cadmio sulla morfologia degli organi interni in embrioni di 25 giorni di controllo (a sinistra) o incubati con cadmio (a destra). (A-B) polmone con setti (s) ben sviluppati. (C-D) rene con tubuli prossimali (tp) e distali (td) ben differenziati. (E-F) parenchima epatico. (G-H) intestino con villi (v). Nei campioni trattati si nota edema diffuso (freccie). Riprese a: G, H: 5x; A, D: 10x; E,F:20x. Colorazione con emallume-eosina.

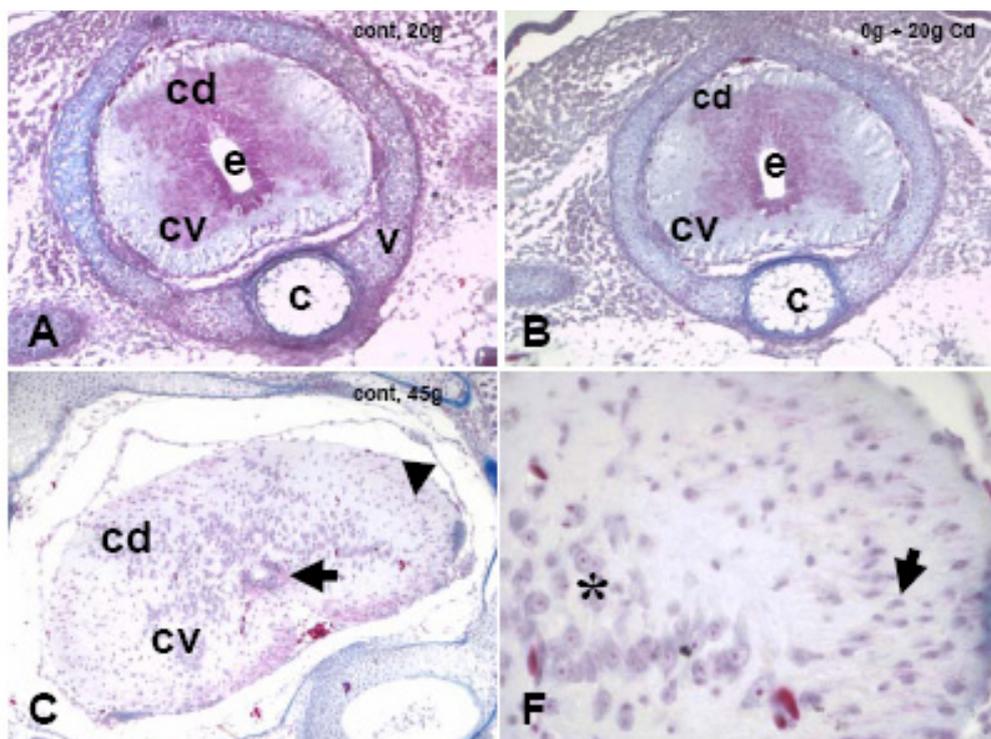


Figura 4: effetti del cadmio sullo sviluppo del midollo spinale in embrioni di controllo (A, C, F) e trattati con cadmio (B). (A) La sostanza grigia è disposta intorno al canale ependimale (e) e forma evidenti corna dorsali (cd) e ventrali (cv). Corda (c), vertebra in formazione (v). (B) (C) Le corna dorsali (cd) e ventrali (cv) sono perfettamente organizzate intorno ad un piccolissimo canale ependimale (freccia). Tra le fibre della sostanza bianca si nota la presenza di cellule gliali (punta di freccia). (D) particolare della figura precedente che motra la presenza delle cellule gliali (freccia) in prossimità delle corna ventrali (*)

Riprese: A,B,C: 10x; D: 40x. Colorazione tricromica di Galgano.

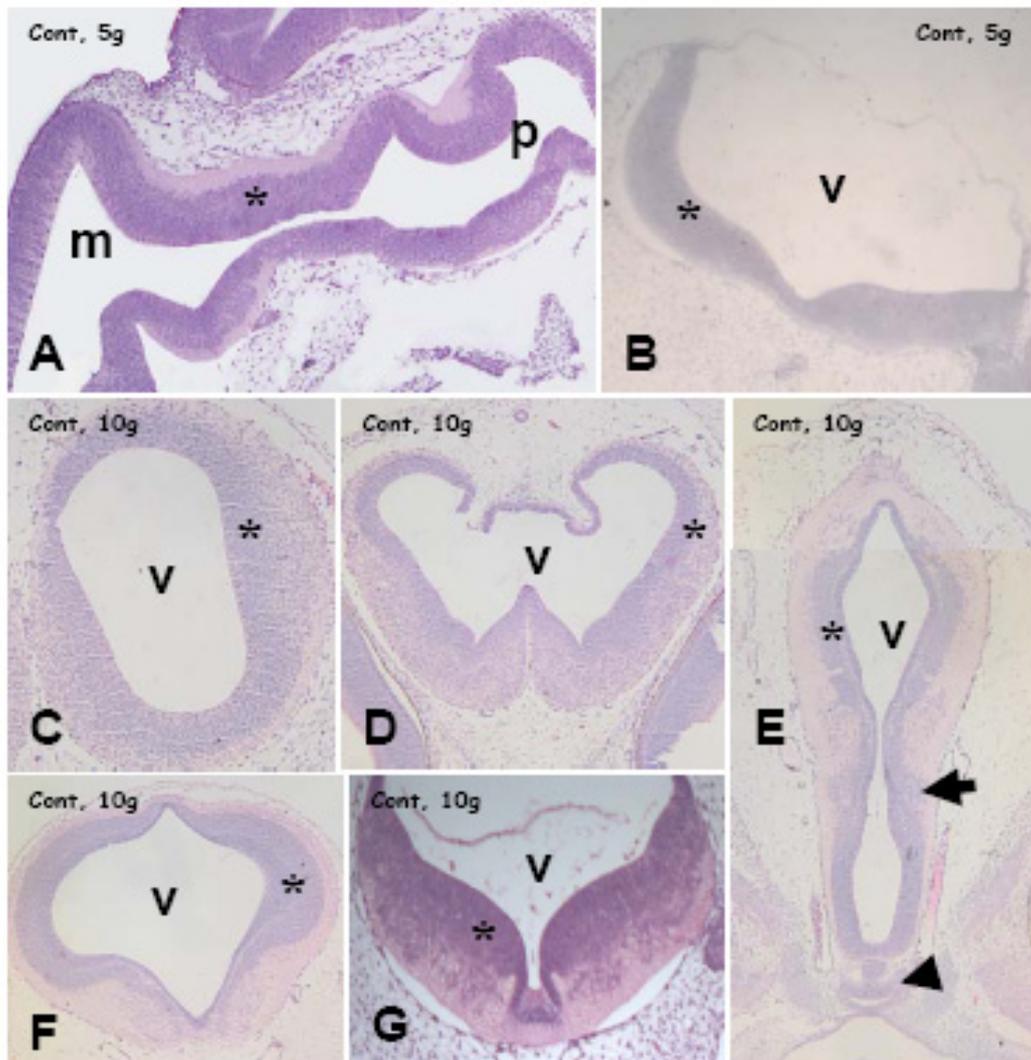


Figura 5: stadi di sviluppo delle vescicole encefaliche in embrioni di 5 (A-B) e 10 (C-G) giorni. (A) pro (p) e mesencefalo (m) indifferenziati. (B) midollo allungato con ampio IV ventricolo (v). (C) emisfero telencefalico destro con ventricolo (v). (D) telencefalo posteriore con ventricolo (v) impari. (E) diencefalo con ventricolo (v) allungato in senso dorso-ventrale. Si nota l'ipofisi (punta di freccia) ventrale e la parete, inspessita in posizione mediana, con due nuclei (freccia) in formazione. (F) mesencefalo con grosso ventricolo centrale (v) e lobi ottici in formazione. (G) midollo allungato con ampio IV ventricolo (V). In tutte le vescicole si nota una parete spessa con sostanza grigia (*) periventricolare. Riprese a 10x. Colorazione con emallume-eosina.

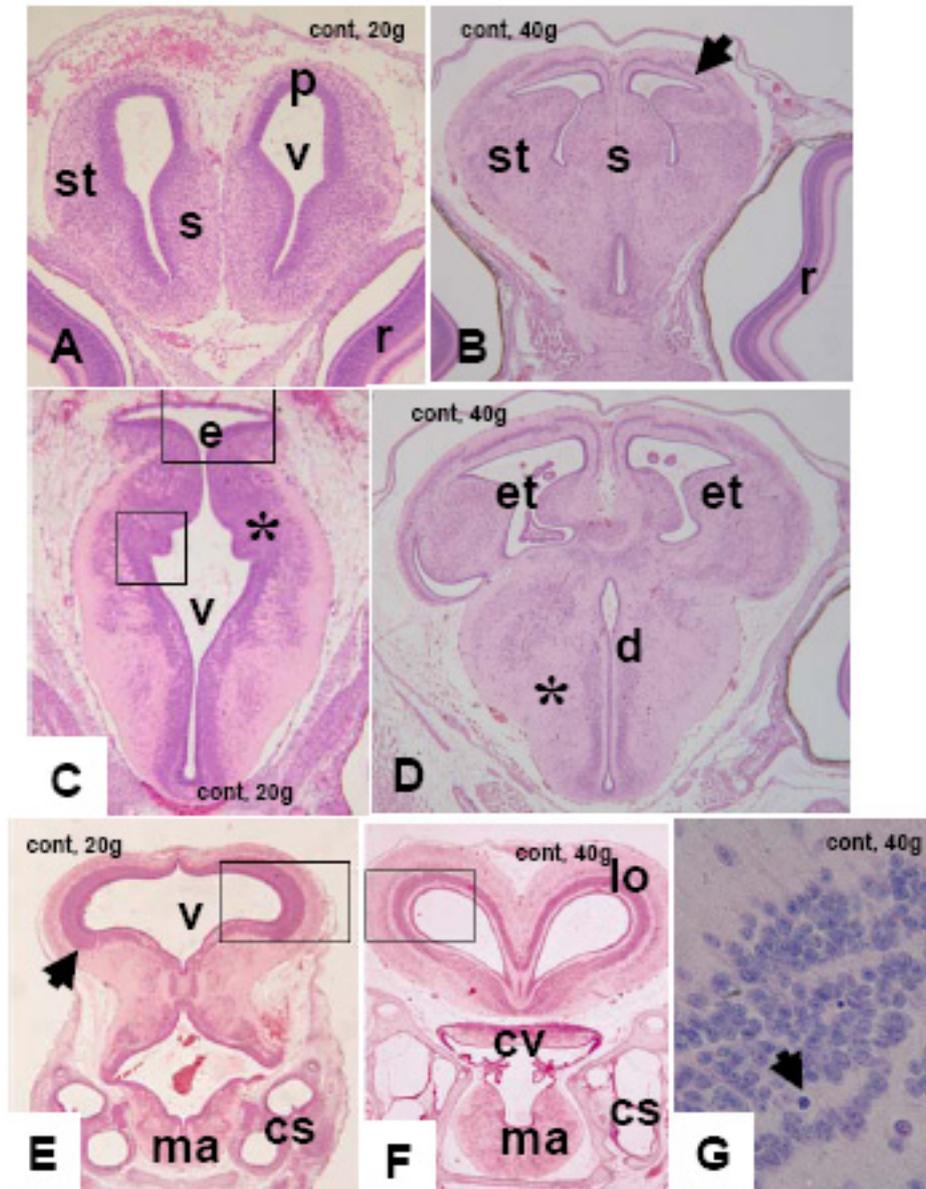


Figura 6: sviluppo delle vescicole encefaliche anteriori. (A) emisferi telencefalici con ventricoli (v) slargati dorsalmente. Si notano il sottile pallio (p) mediale e dorsale, lo striato (st) e il setto (s). Retina (r). (B) telencefalo con ventricoli (v) ridotti e compressi per lo sviluppo di striato (st) e setto (s). Nel pallio si nota la corteccia (freccia). (C) vescicola diencefalica, impari e mediana, allungata in senso dorso-ventrale, con ventricolo (v) slargato medialmente e in corrispondenza dell'epitalamo (e). La sostanza grigia (*) è particolarmente sviluppata nelle regioni dorso-laterali, la sostanza bianca nelle regioni ventrali. (D) diencefalo anteriore (d) sovrastato dai due emisferi telencefalici (et). Si nota l'aumento di spessore della parete, la presenza di nuclei sparsi nell'abbondante sostanza bianca (*) e la riduzione del ventricolo. (E) mesencefalo ancora impari, dorsalmente slargato con lobi ottici in formazione. La sostanza grigia (freccia) dorsale è addossata al ventricolo (v), quella ventrale è organizzata in nuclei (freccia) sparsi nel corpo. Midollo allungato (ma), canali semicircolari (cs). (F) mesencefalo con lobi ottici (lo) formati, sostanza grigia organizzata in una corteccia. Cerevelletto (cv), canali semicircolari (cv). (G) particolare della corteccia con alcune cellule in mitosi (freccia).

Riprese a: A-F: 5x; G: 40x. Colorazione con emallume-eosina.

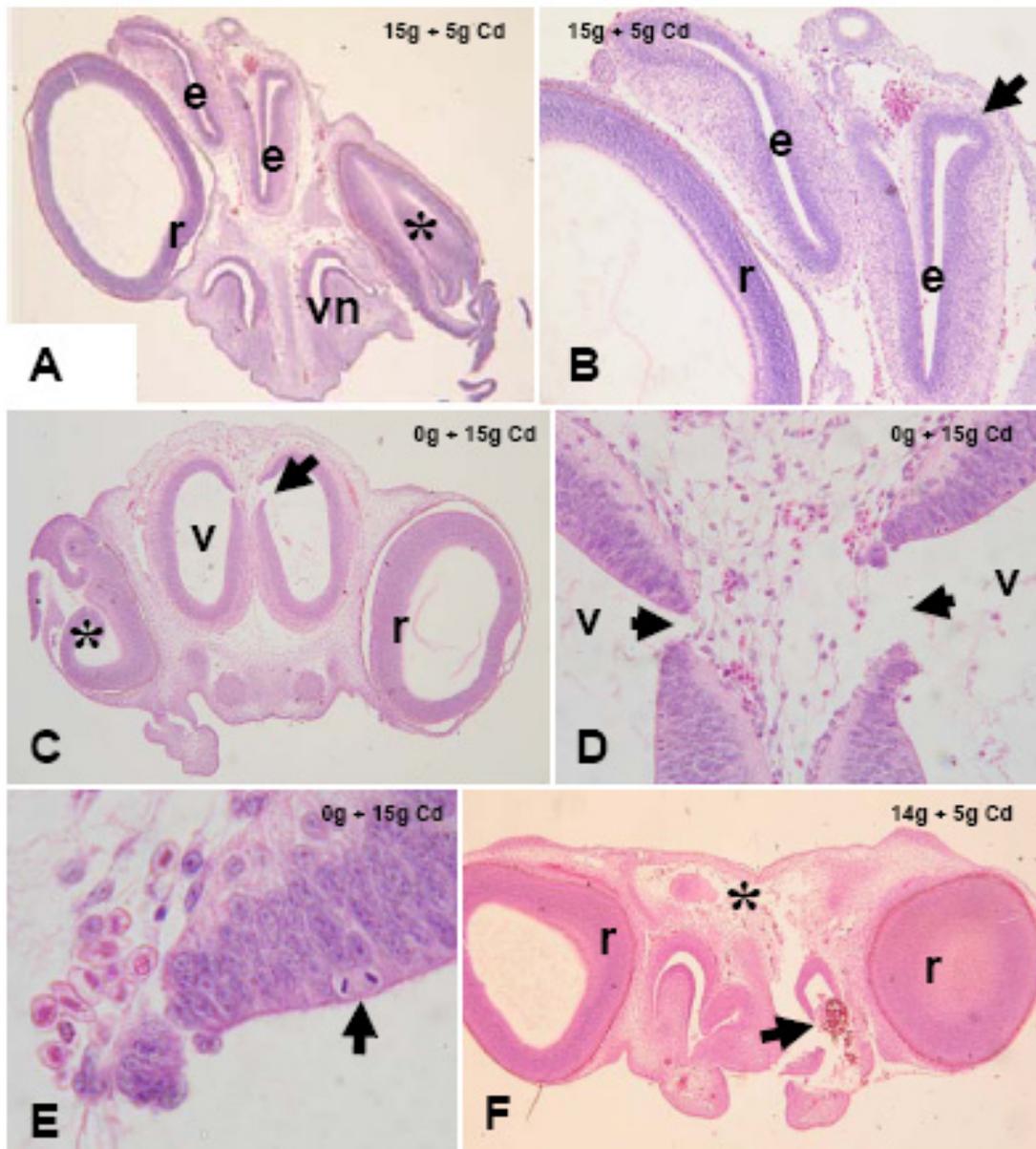


Figura 7: alterazioni indotte dal cadmio nel telencefalo. (A) asimmetria dei due emisferi (e) accompagnata da una riduzione di spessore della parete e dall'estrusione dalla scatola cranica. Occhio con significative alterazioni (*). Organi vomeronasali (vn) e retina (r) normali. (B) particolare della figura A. Si nota la mancanza della volta cranica (freccia) e il ridotto sviluppo della parete (*) degli emisferi. (C) vescicola con parete degli emisferi sottile ed interrotta in posizione dorso-mediale (freccia). Occhio alterato (*). (D) dettaglio della figura C che mostra l'interruzione nella parete del ventricolo (freccie). (E) ulteriore dettaglio della interruzione che mostra la presenza di cellule in mitosi (freccia). (F) embrione con evidente anencefalia (*) e alterazione dell'organo vomeronasale (freccia).

Riprese a: A, C, F: 5x; B: 10x; D: 20x; E: 40x. Colorazione con emallume-eosina.

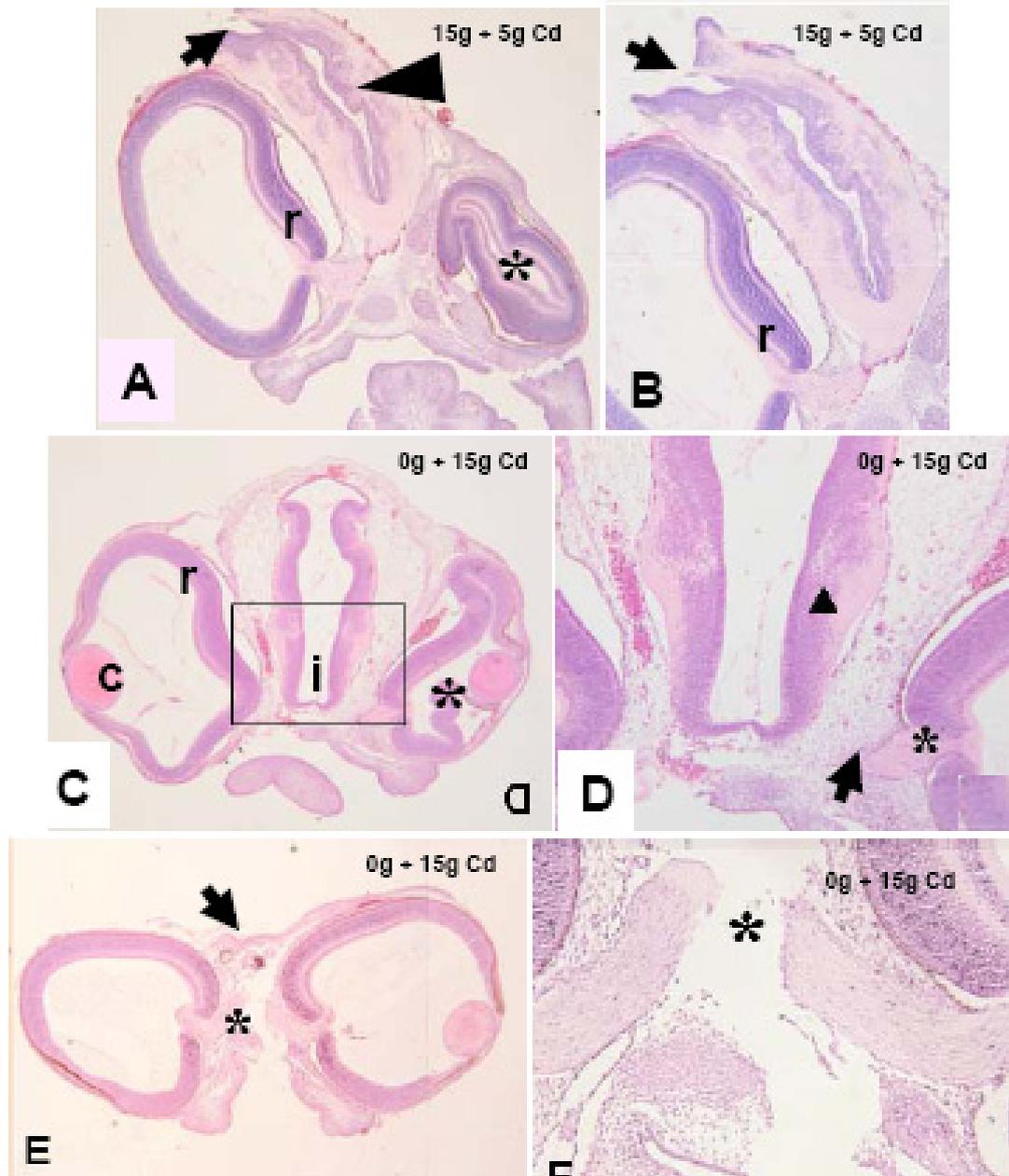


Figura 8: alterazioni indotte dal cadmio nel diencefalo. (A) vescicola dislocata in posizione asimmetrica, aperta dorsalmente (freccia) ed estrusa dalla scatola cranica. La parete ha spessore uniforme e scarso sviluppo della sostanza grigia (punta di freccia). (*) occhio con retina ripiegata. (B) particolare della figura A in cui si nota l'interruzione dorsale (freccia) della parete della vescicola. (C) vescicola con parete sottile e ventricolo dilatato. La regione ipotalamica (i) sembra mancare completamente. Occhio alterato (*). (D) particolare della figura C in cui si nota la regione ventrale a parete sottile (freccia). Radice del nervo ottico (*). (E) embrione senza vescicola diencefalica (freccia) e con nervi ottici interrotti (*). (F) dettaglio dell'emergenza dei nervi ottici in cui si nota l'interruzione (*).

Riprese a: A, C, E: 5x; B: 10x; D, F: 20x. Colorazione con emallume-eosina.

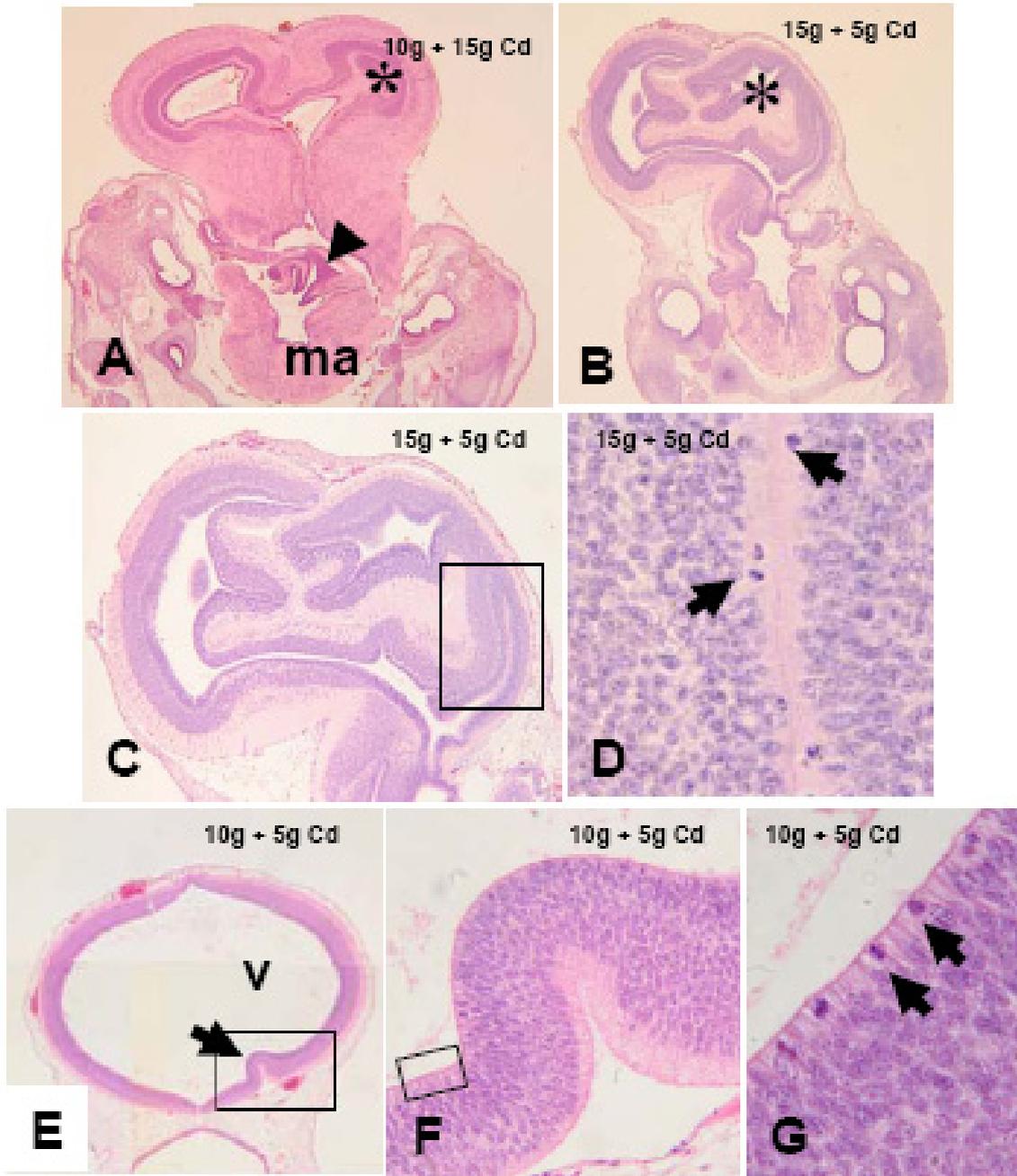


Figura 9: alterazioni indotte dal cadmio nel mesencefalo. (A) vescicola estrusa per l'interruzione della calotta cranica (freccia); il tetto ottico (*) è asimmetrico. Si notano anche il cervelletto deforme (punta di freccia) e, al di sotto, il midollo allungato (ma) normalmente sviluppato. (B) vescicola con parete che ha invaso il ventricolo (*). (C) particolare della figura B. (D) particolare che mostra la presenza di cellule in mitosi (freccie) nelle pieghe della parete. (E) ventricolo (v) dilatato e parete sollevata (freccia). (F) particolare della plica in figura E. (G) ulteriore dettaglio che mostra cellule in mitosi (freccie) nella parete in prossimità della plica.
 Riprese a: A, B, E: 5x; C: 10x; F: 20x; G, D: 40x. Colorazione con emallume-eosina.

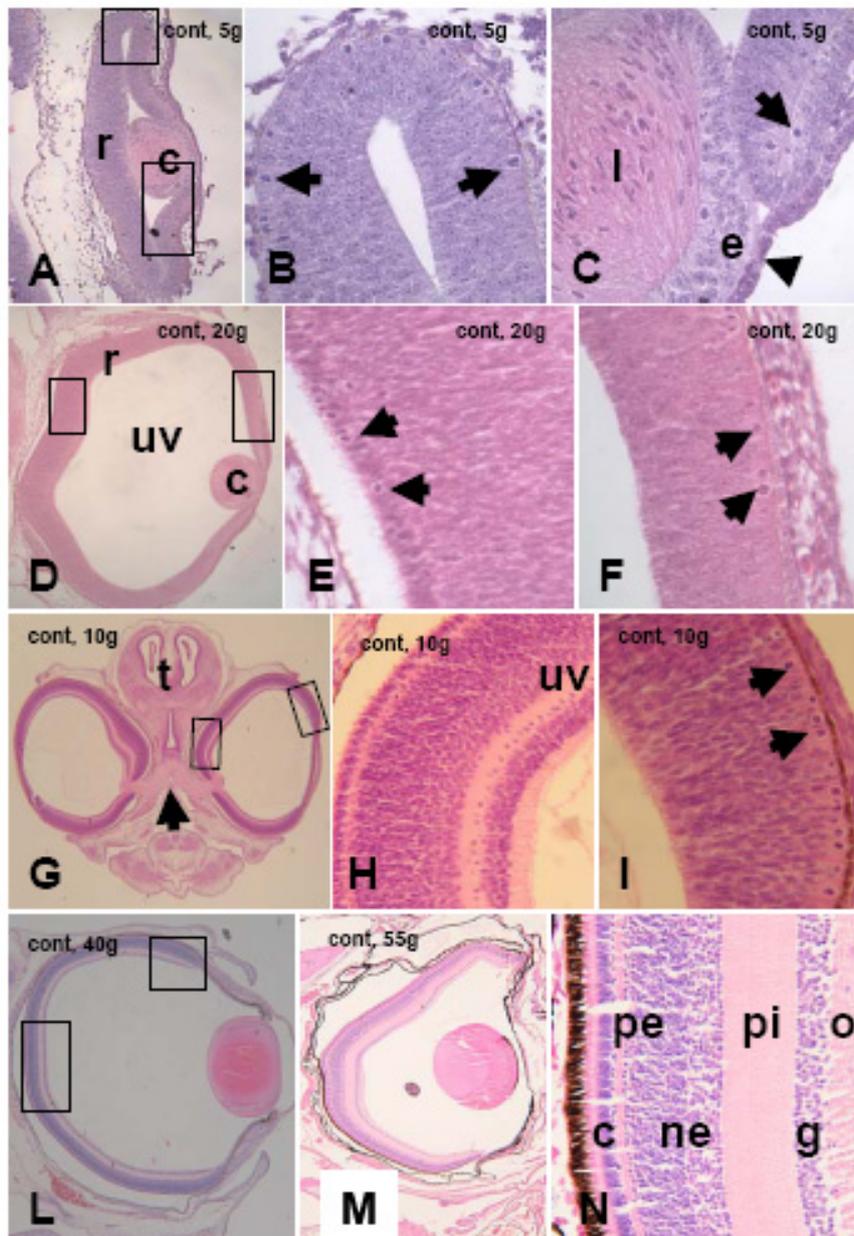


Figura 10: stadi di sviluppo dell'occhio. (A) coppa ottica con retina (r) indifferenziata. Cristallino (c). (B) retina distale con numerose cellule in mitosi (freccie). (C) particolare della figura A in cui si nota la lente (l) del cristallino in formazione sovrastato dall'epitelio (e) e dalla cornea (punta di freccia). Nella retina (r) si notano cellule in mitosi (freccia). (D) occhio, globoso, con abbondante umore vitreo (uv) e retina indifferenziata (r). Cristallino (c). (E-F) retina distale e prossimale al cristallino con cellule in mitosi (freccie). (G) occhio con retina (r) indifferenziata nella regione prossimale al cristallino e parzialmente stratificata nella regione distale. Emergenza del nervo ottico (freccia), telencefalo (t). (H) Retina distale stratificata. Umore vitreo (uv). (I) retina prossimale non stratificata (*) con cellule in mitosi (freccie). (L) occhio con retina completamente stratificata. (M) dettaglio di retina distale. (M) occhio completamente differenziato. (N) particolare della retina differenziata. Si notano, dall'esterno verso l'interno, gli strati: pigmentato (punta di freccia), dei coni e bastoncelli (c), plessiforme esterno (pe), nucleare esterno (ne), plessiforme interno (pi), gangliare (g) e ottico (o).

Riprese a: A, D, G, L, M: 5X; B-C, E-F, H-I, N: 40X. Colorazione con emallume-eosina.

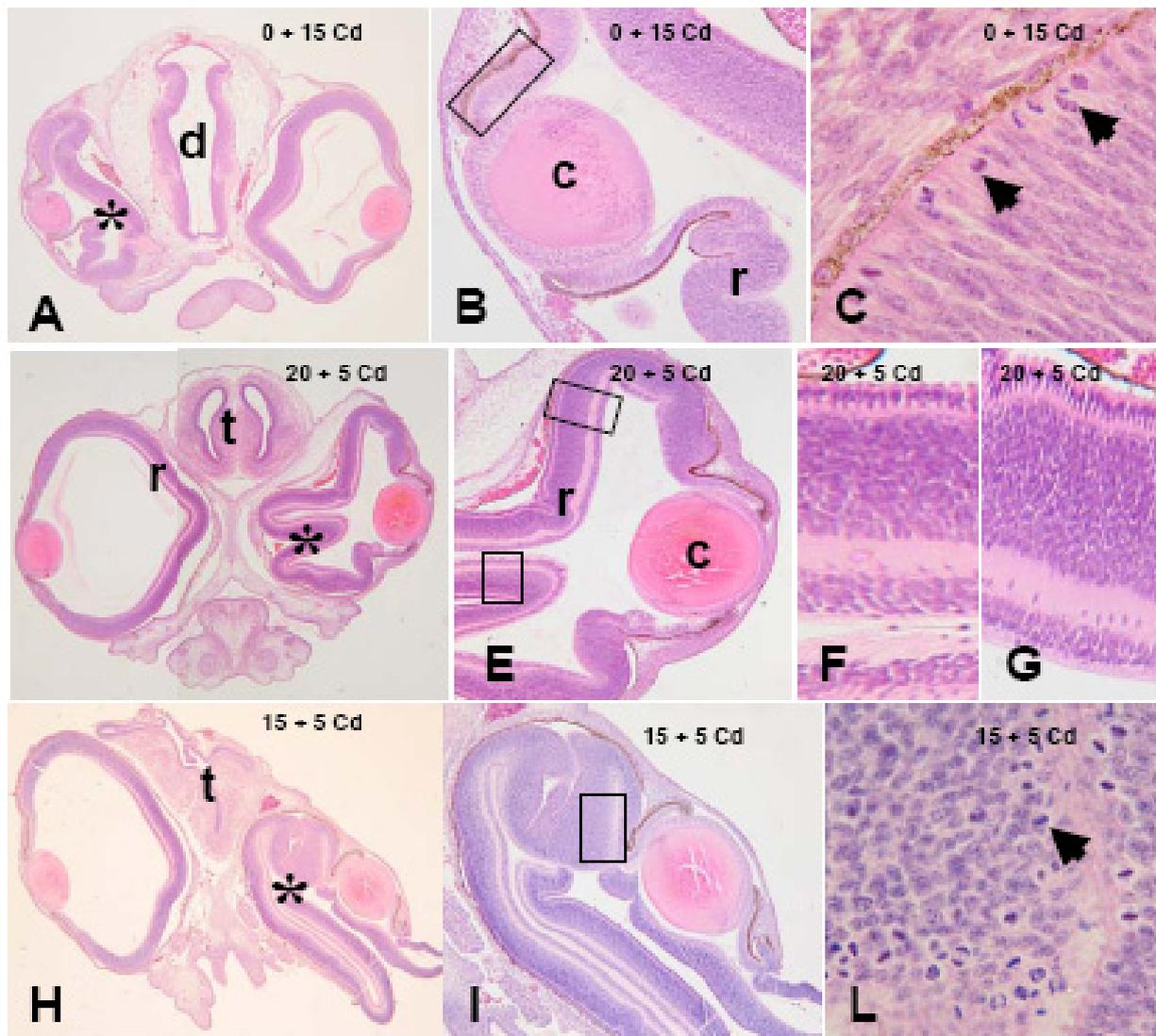


Figura 11: alterazioni indotte dal cadmio nell'occhio. (A) occhio collassato con retina (*) ripiegata e diencefalo (d) alterato. (B) particolare dell'occhio con retina (r) ripiegata. Cristallino (c). (C) particolare della figura B. La retina ha cellule in mitosi in prossimità dello strato pigmentato (freccie). (D) occhio con retina ripiegata (*); il telencefalo (t) è normale. (E) particolare; retina (r) regolarmente stratificata, cristallino (c). (F-G) ulteriore dettaglio della figura E che mostra la stratificazione della retina nella plica e nel tratto non ripiegato. (H) occhio (*) alterato ed estruso; si nota il telencefalo (t) estruso. (I) particolare. (L) ulteriore dettaglio di retina che mostra le numerose cellule in mitosi (freccia).

Riprese a: A, D, H: 5x; B, E, I: 10x; F,G: 20x; C, L: 40x. Colorazione con emallume-eosina.

CAPITOLO 7: EFFETTI DEL CADMIO SULL'ESPRESSIONE E LA LOCALIZZAZIONE DELLE METALLOTIONEINE

Ho determinato la localizzazione e l'espressione dell'mRNA per la MT nei follicoli ovarici in accrescimento di femmine adulte e nei tessuti embrionali in funzione dei tempi di trattamento sperimentale. Per questo scopo ho effettuato ibridazioni su sezioni e Northern blot utilizzando una sonda omologa preparata nel nostro laboratorio.

7.1 Localizzazione dell'MT-mRNA nel follicolo ovarico

Nei follicoli primari (80-150 μ m) l'MT mRNA è presente nel citoplasma e, in misura minore nel nucleo dell'ovocita (fig. 12A-B), ma non nelle cellule follicolari (fig. 12B).

Durante l' accrescimento nei follicoli (fig. 12C) l'MT-mRNA non è più presente nel citoplasma dell'ovocita ma è localizzato nell'epitelio follicolare. In particolare nell'epitelio di follicoli di (400-1400) μ m , l'MT-mRNA è localizzato nel citoplasma di alcune cellule piccole e delle cellule piriformi (fig. 12D).

Nell'epitelio in rimodellamento di follicoli in previtellogenesi avanzata (1500-2000 μ m) (fig. 12F-G), l'MT-mRNA è presente nelle cellule piccole e si riduce progressivamente nel citoplasma delle piriformi. Nell'epitelio di follicoli in vitellogenesi, di oltre 2000 μ m di diametro (fig. 12H) l'MT-mRNA è presente solo nel citoplasma delle cellule piccole.

Nei controlli ottenuti utilizzando una sonda senso, la marcatura è assente in tutto il follicolo (fig 12I).

7.2 Localizzazione dell'MT-mRNA nella discoblastula

Nella discoblastula, preparata ponendo l'area embrionale sul vetrino ed adagiandovi sopra il coprioggetto, l'MT-mRNA è presente nel citoplasma dei blastomeri dell'area embrionale (fig. 13A-D) e in quelli extraembrionali (13A, E). In alcune cellule, inoltre, il messaggero è presente anche in corrispondenza dei nuclei (fig. 13D).

7.3 Localizzazione dell'MT-mRNA negli embrioni di controllo

Nel sistema nervoso di embrioni di 5 giorni di sviluppo (fig. 14A), l'MT-mRNA è presente nelle cellule della parete delle vescicole nervose (fig. 14B,C,E) e nelle cellule della parte centrale della retina (fig. 14F) che in questa fase non è ancora organizzata in strati. Nelle vescicole pro e mesencefaliche (fig. 14B), con la parete ancora sottile ed omogenea, l'MT-mRNA è presente e distribuito in maniera uniforme in tutti i neuroni. Nel midollo allungato (fig. 14C) e nel midollo spinale (fig. 14D-E) il messaggero è presente in posizione periventricolare, in corrispondenza delle cellule della sostanza grigia che in questa fase si organizza. Sono inoltre positive le cellule del mesenchima (fig. 14G), i somiti (fig. 14D,G). L'MT-mRNA è assente nel polmone (dato non mostrato), nel rene (fig. 14H), nella mucosa intestinale e nel fegato (fig. 14I).

Negli embrioni a 10 giorni di sviluppo (fig. 15A), non si osservano cambiamenti significativi nella localizzazione dell'MT-mRNA rispetto agli embrioni di 5 giorni. Nel sistema nervoso il messaggero è localizzato nella sostanza grigia periventricolare del telencefalo (fig. 15B), diencefalo (fig. 15C-D) e mesencefalo (fig. 15E-F) e non nella sostanza bianca che è negativa alla reazione. Nel midollo allungato (fig. 15G) e nel midollo spinale (fig. 15H) l'MT-mRNA è localizzato nelle aree grigie della parete. Nella retina (fig. 15I), ancora indifferenziata, l'MT-mRNA è distribuito in tutte le cellule. L'MT-mRNA è presente nella sostanza grigia e nei somiti (fig. 15L) mentre è assente nei tubuli renali (fig. 15M), nel polmone (fig. 15N), nella mucosa intestinale (fig. 15O) e nel fegato (fig. 15P).

Negli embrioni di 20 giorni di sviluppo (fig. 16A), la localizzazione dell'MT-mRNA mostra piccoli cambiamenti. Nell'encefalo il messaggero è localizzato nella sostanza grigia, periventricolare, del telencefalo (fig. 16B), del diencefalo (fig. 16C-D) e del mesencefalo (fig. 16F-G). In questa vescicola, in particolare, la MT-mRNA è presente soprattutto in posizione dorso-mediale, nel tetto ottico, nella regione da cui si formerà la corteccia. Nel midollo allungato, il messaggero è presente nella regione periventricolare, ma anche in alcuni nuclei che in questa fase sono in formazione (fig. 16H). Nella retina (fig. 16L) il messaggero è presente in corrispondenza dei tre strati cellulari. Un'intensa marcatura è visibile nelle cellule delle vertebre in formazione (fig. 16M). Nel midollo spinale (fig. 16I) l'MT-mRNA è concentrato nelle aree associative dorsali e motrici ventrali della sostanza grigia. L'MT-mRNA è presente per la prima volta nei glomi vascolari del rene e non nei tubuli (fig. 16N), nel polmone (fig. 16O), nella mucosa dell'intestino (fig. 16P) e nel fegato (fig. 16Q).

Negli embrioni di 40 giorni (fig. 17A) l'ibridazione dimostra che la localizzazione dell'MT-mRNA cambia rispetto agli stadi precedenti. Il primo cambiamento significativo si nota a livello dell'encefalo: il messaggero non è presente nel telencefalo (fig. 17B), nel diencefalo (fig. 17C) e nel mesencefalo (fig. 17D-E). L'MT-mRNA è presente nella sostanza grigia e nei nuclei del midollo allungato (fig. 17F). Nel midollo spinale la localizzazione cambia: il messaggero è presente per la prima volta nei neuriti della sostanza bianca e nei nuclei delle cellule gliali (fig. 17G-H) non è presente nelle aree associative dorsali e motrici ventrali della sostanza grigia. Nell'occhio, l'MT-mRNA è particolarmente concentrato negli strati nucleari della retina mentre lo strato gangliare è negativo all'ibridazione (fig. 7I). L'MT-mRNA compare per la prima volta nelle cellule del parenchima del polmone (fig. 17L) mentre le cellule dei tubuli renali (dato non mostrato) del fegato (fig. 17L) e mucosa intestinale (fig. 17M) sono negativi all'ibridazione.

Negli embrioni prossimi alla schiusa (fig. 18A) la presenza e la distribuzione dell'MT-mRNA subiscono ancora alcuni cambiamenti. Il messaggero di nuovo presente a livello delle cellule endoteliali del telencefalo (fig. 18D), diencefalo (fig. 18E, F) e del mesencefalo. Nel telencefalo (fig. 18C-D) e nel mesencefalo (fig. 18G-H), inoltre, il messaggero è localizzato anche a livello delle cellule delle cortecce e, nel mesencefalo, anche in corrispondenza della commissura dorsale (fig. 18G,I) e di alcuni nuclei basali (fig. 18G,L). Nel midollo allungato l'MT-mRNA è concentrato nelle cellule endoteliali (fig. 18M), in due grossi nuclei mediani e in due nuclei minori, laterali (fig. 18N-O). Nel midollo spinale (fig. 18P), non si notano variazioni di rilievo rispetto allo stadio precedente: il messaggero è localizzato nella sostanza bianca

Nella retina (fig. 18Q) l'MT-mRNA è distribuito in maniera uniforme nei tre strati cellulari mentre gli strati plessiformi interno, esterno ed ottico, contenenti le fibre, sono negativi (fig. 18R). Tra gli organi interni sono positivi il parenchima polmonare (fig. 18S), per la prima volta, una significativa positività è presente nelle cellule della mucosa intestinale (fig. 18V) e in alcune cellule del fegato che per dimensioni e posizione sembrano cellule di Kupffer (fig. 18T-U); cellule simili sono positive anche nel fegato di esemplari adulti (fig. 22A).

7.4 Quantificazione dei livelli di MT-mRNA in embrioni controllo e trattati

Eventuali variazioni dell'espressione genica dell'MT-mRNA in embrioni di *Podarcis* trattati con cadmio sono stati analizzati mediante Northern blot (fig. 19). L'RNA totale estratto da embrioni di controllo e trattati con cadmio è stato ibridato con una sonda radioattiva costituita dal frammento di

cDNA codificante per la MT di *Podarcis sicula*. L'analisi densitometrica ha rilevato la presenza di un solo trascritto nell'embrione di controllo e nel trattato e che la concentrazione del trascritto nell'embrione trattato è significativamente ($P < 0.05$) più elevata di quella rilevata nell'embrione di controllo.

7.5 Localizzazione dell'MT-mRNA negli organi interni di embrioni trattati.

Nel polmone e nel rene degli animali trattati la localizzazione del messaggero non varia rispetto a quella dei controlli. Nel rene (fig. 20A-B) i tubuli restano negativi alla reazione per tutta la durata dello sviluppo; nel polmone (fig. 20C-D) il parenchima è positivo negli embrioni di 40 giorni.

L'espressione e la localizzazione dell'MT mRNA varia nell'intestino e nel fegato di embrioni trattati con cadmio. Negli embrioni di 10 giorni di sviluppo il messaggero è presente precocemente nei nuclei delle cellule della mucosa intestinale (fig. 21B) e nelle cellule dei sinusoidi epatici (fig. 21D); sono negativi gli epatociti (fig. 21D). Nel fegato di esemplari adulti dopo trattamento con cadmio (fig. 22B), così come nel fegato dei controlli (embrioni prima della schiusa, fig. 21F; adulti, fig. 22A) sono positive le cellule di Kupffer. Il numero delle cellule positive alla reazione di ibridazione aumenta significativamente dopo trattamento: sono circa 23 per unità arbitraria nei controlli e circa 50 dopo trattamento (fig. 22C).

7.6 Localizzazione dell'MT-mRNA nel sistema nervoso e nella retina di embrioni trattati

Dopo trattamento, l'MT-mRNA presenta generalmente la stessa distribuzione osservata negli embrioni di controllo; il livello di espressione aumenta come dimostrato dal Northern blot (fig. 22) e dall'aumento di positività nelle ibridazioni in situ.

In alcune vescicole morfologicamente alterate di embrioni a 10 a 25 giorni di sviluppo, la localizzazione e/o espressione varia: in particolare, quando il telencefalo risultava alterato per un'interruzione della parete di un emisfero, nell'emisfero alterato l'espressione è più intensa nel pallio dorso mediale rispetto al setto (fig. 23B). In altri casi (fig. 23C), la marcatura nelle regioni settali e striate è diffusa e non concentrata nelle regione periventricolare (fig. 23A). Nel diencefalo si può notare riduzione (fig. 23E-F) o incremento (fig. 23H) dell'espressione nelle cellule endodiali o, in alcuni casi, asimmetria legata alla asimmetrica organizzazione della sostanza grigia

(fig. 23G). Nel mesencefalo si osserva l'assenza di messaggero nelle regioni dorsali (fig. 23L, R-S). Nei casi in cui si formano delle pliche, si nota una diversa distribuzione del messaggero che si riduce nelle cellule ependimali del lobo alterato (fig. 23O, P) rispetto al normale (fig. 23Q).

Il trattamento con cadmio non induce una ripresa dell'espressione della MT nelle vescicole anteriori che nei controlli risultavano negative all'ibridazione (fig. 24A-B) nè interferisce con lo spostamento della marcatura dalla sostanza grigia a quella bianca nel midollo spinale (fig. 24C-D).

Negli animali incubati con cadmio, la localizzazione della marcatura nell'occhio non varia rispetto ai controlli anche se, come nell'encefalo, si nota un aumento dell'espressione. Nei primi 15 giorni di sviluppo la retina presenta un'intensa e diffusa positività nei casi in cui è distesa (fig. 25E) e quando è ripiegata (fig. 25F). Dopo trattamento, a 40 giorni di sviluppo, la marcatura è localizzata negli strati nucleari della retina che in questa fase è differenziata sia in posizione distale (fig. 25H) che prossimale (fig. 25I) al cristallino. Negli occhi alterati, con retina ripiegata, il messaggero è presente, oltre che negli strati nucleare interno ed esterno anche in quello gangliare (fig. 25M).

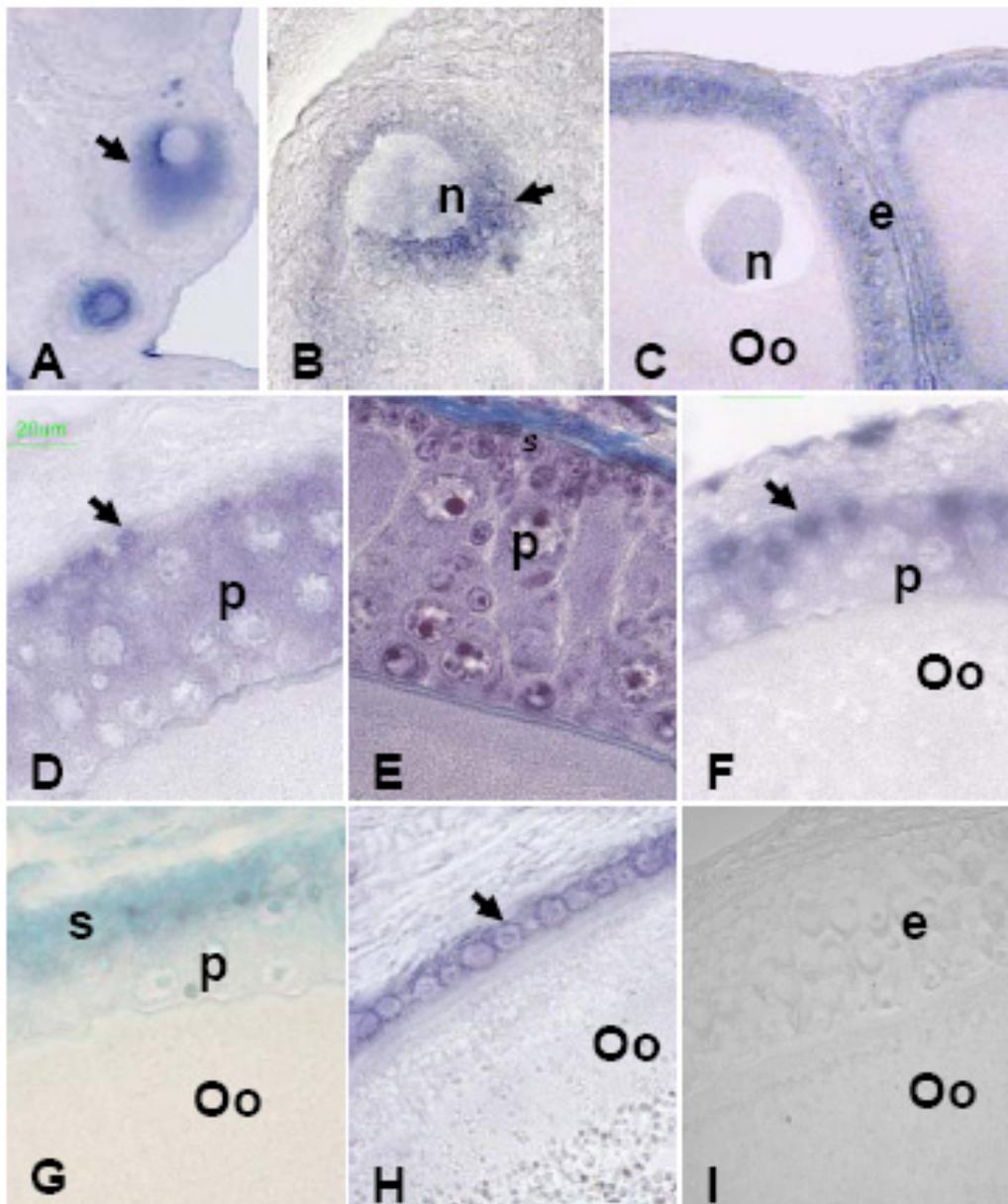


Figura 12: localizzazione dell'MT-mRNA nei follicoli ovarici. (A) ovociti (freccia) in previtellogenesi iniziale con mRNA nel citoplasma. (B) dettaglio: la marcatura e' debole nel nucleo (n) e intensa nel citoplasma perinucleare (freccia). (C) follicoli con epitelio differenziato. Nucleo (n) dell'ovocita poco positivo, cellule dell'epitelio (e) positive. (D) dettaglio della figura C; la marcatura è localizzata a livello del nucleo e del citoplasma delle cellule piccole (freccia) e del citoplasma delle piriformi (p). (E) epitelio follicolare: colorazione tricromica di Galgano. (s) cellule piccole, (p) cellule piriformi. (F, G) follicoli con epitelio in fasi successive di rimodellamento. Si nota l'aumento del numero di cellule piccole positive e piriformi non marcate. (H) epitelio in rimodellamento avanzato: la positività è presente nel citoplasma delle cellule piccole (freccia). (I) controllo negativo alla reazione ottenuto utilizzando una sonda senso. (Oo): ovocita. Riprese a: A: 5x; C: 10x; B: 20x; D-I: 40x.

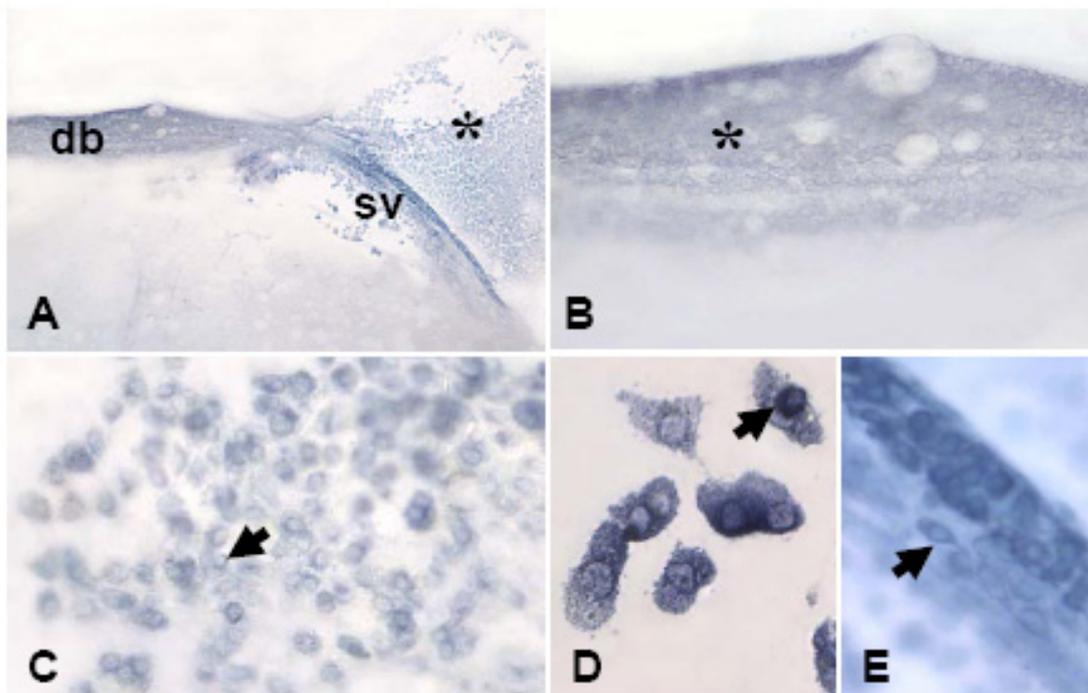


Figura 13: localizzazione dell'MT-mRNA nella discoblastula. (A) schiacciamento di discoblastula (db); sacco vitellino (sv) con cellule disperse (*). (B) particolare che cellule embrionali (*). (C) cellule isolate con citoplasma marcato (freccia). (D) cellule isolate con occasionali nuclei marcati (freccia). (E) cellule del sacco vitellino (freccia) con la marcatura nel citoplasma.

Riprese a: A:10x; B,C: 20x; D, E: 40x.

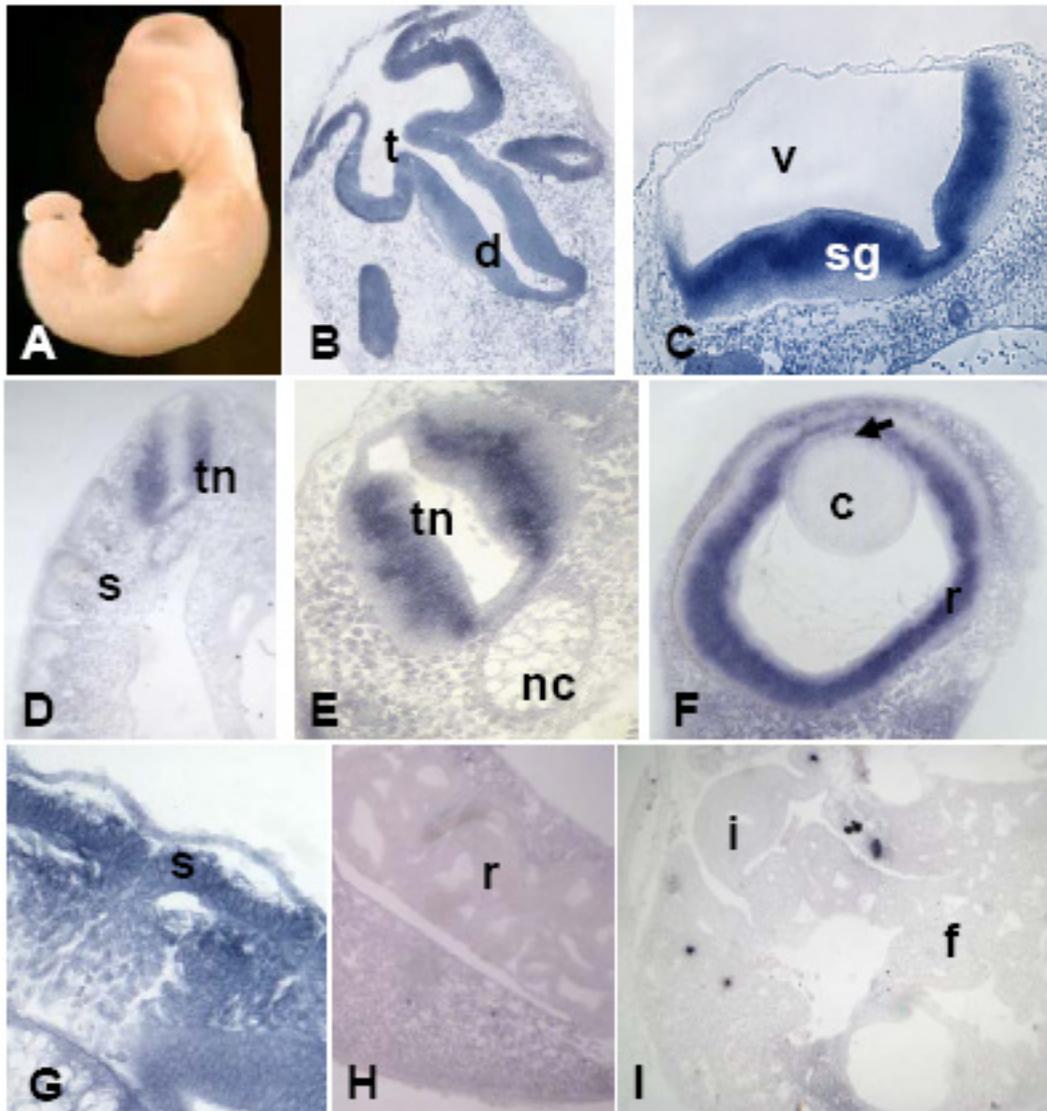


Figura 14: localizzazione dell'MT-mRNA in embrioni a 5 giorni di sviluppo. (A) embrione in toto. (B) sezione frontale della testa: diencefalo (d) e telencefalo (t) indifferenziati, con marcatura uniforme. (C) midollo allungato con positività intensa nella sostanza grigia (sg). (v) IV ventricolo. (D) sezione trasversale del tronco; il messaggero è presente nel tubo neurale (tn) e nei somiti (s). (E) dettaglio del tubo neurale marcato (tn) e della notocorda (nc) negativa alla reazione. (F) occhio con retina (r) marcata; il cristallino è marcato nella zona a contatto con l'epidermide da cui si formerà la cornea. (G) dettaglio dei somiti (s). (H) rene (r) negativo. (I) intestino (i) e fegato (f) negativi.

Riprese a: A, C: 20; B-H: 40x.

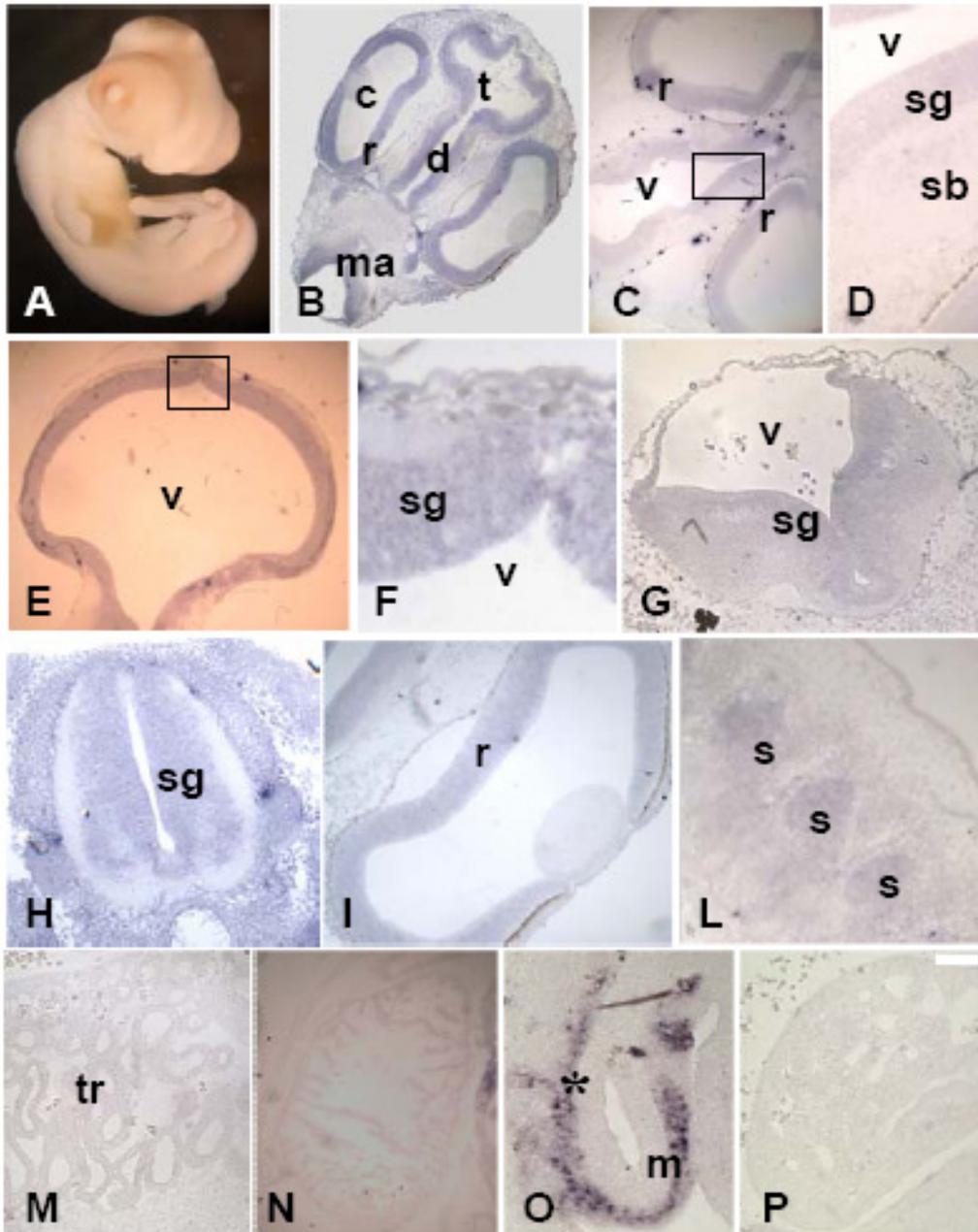


Figura 15: localizzazione dell'MT-mRNA in embrioni a 10 giorni di sviluppo. (A) embrione in toto. (B) sezione frontale del capo. La parete dell'encefalo e la retina sono marcati. (t) telencefalo, (d) diencefalo, (ma) midollo allungato, (r) retina, (c) cristallino. (C) sezione frontale di diencefalo con ventricolo (v) e retina (r). (D) dettaglio della figura C che mostra la marcatura uniforme della sostanza grigia (sg) periventricolare; (sb) sostanza bianca. (E) sezione trasversale di mesencefalo che mostra l'ampio ventricolo centrale (v). (F) dettaglio della figura E. L'mRNA è concentrato nella sostanza grigia periventricolare. (G) sezione trasversale di midollo allungato: il messaggero è presente nella sostanza grigia (sg). (v) IV ventricolo. (H) sezione trasversale di midollo spinale; l'mRNA è localizzato nella sostanza grigia (sg). (I) dettaglio di occhio con retina marcata in maniera uniforme. (L) somiti (s) positivi alla reazione. Il messaggero è assente nei tubuli (tr) renali (M), nel polmone già settato (N), nella mucosa (m) intestinale (O) e nel fegato (P). Nella figura O si nota la presenza di cellule connettivali marcate (*). Riprese a: A-C: 5x; G, H, I, M-P: 10x; D, F: 40x.

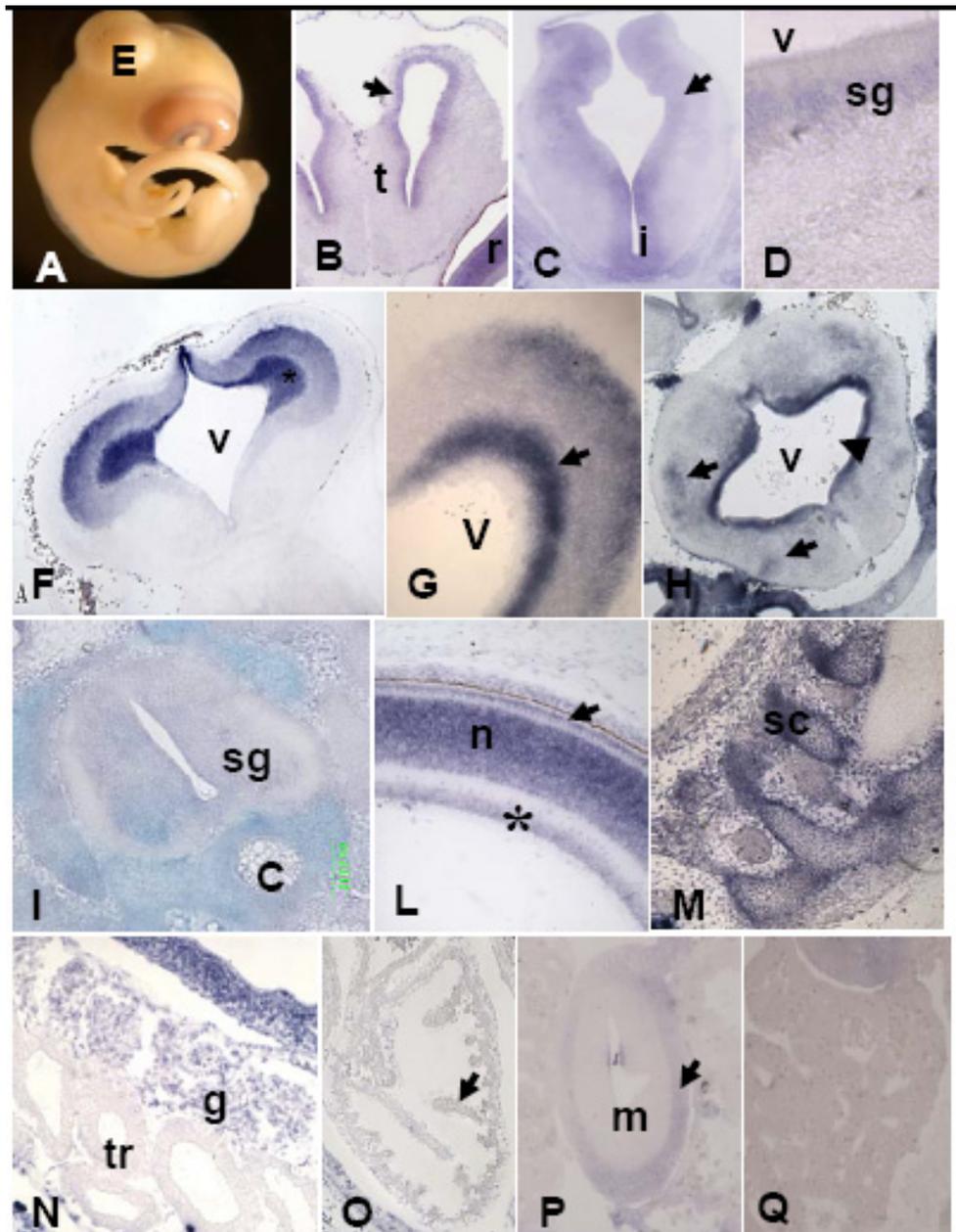


Figura 16: localizzazione dell'MT-mRNA in embrioni a 20 giorni di sviluppo. (A) Embrione in toto. **(B)** telencefalo (t); mRNA concentrato nella sostanza grigia (freccia). **(C)** diencefalo; positività nella sostanza grigia periventricolare (freccia) e nell'ipotalamo (i). **(D)** dettaglio della parete del diencefalo con marcatura uniforme della sostanza grigia (sg). **(E)** tetto ottico; l'mRNA è presente nella sostanza grigia periventricolare (*). **(G)** dettaglio della marcatura presente nella regione laterale del tetto ottico. **(H)** midollo allungato; messaggero concentrato nella sostanza grigia (punta di freccia) e, in misura minore, in alcuni nuclei (freccie). **(I)** midollo spinale con messaggero nella sostanza grigia (sg) e nella vertebra (v) in formazione. (c) notocorda negativa. **(L)** particolare della retina dell'occhio. L'MT-mRNA è presente nello strato gangliare (*), nucleare interno (n) e nucleare esterno (freccia). **(M)** positività sugli sclerotomi. **(N)** rene. l'mRNA e' presente nei glomi (g) ma non nei tubuli (tr). **(O)** polmone con setti (freccia) negativi. **(P)** intestino con mucosa (m) negativa, circondata da connettivo debolmente marcato (freccia). **(Q)** fegato negativo. (v): ventricolo.

Riprese a: B, F, H: 5x; C: 10x; L,M,N,O,P,Q: 20x; D, G: 40x.

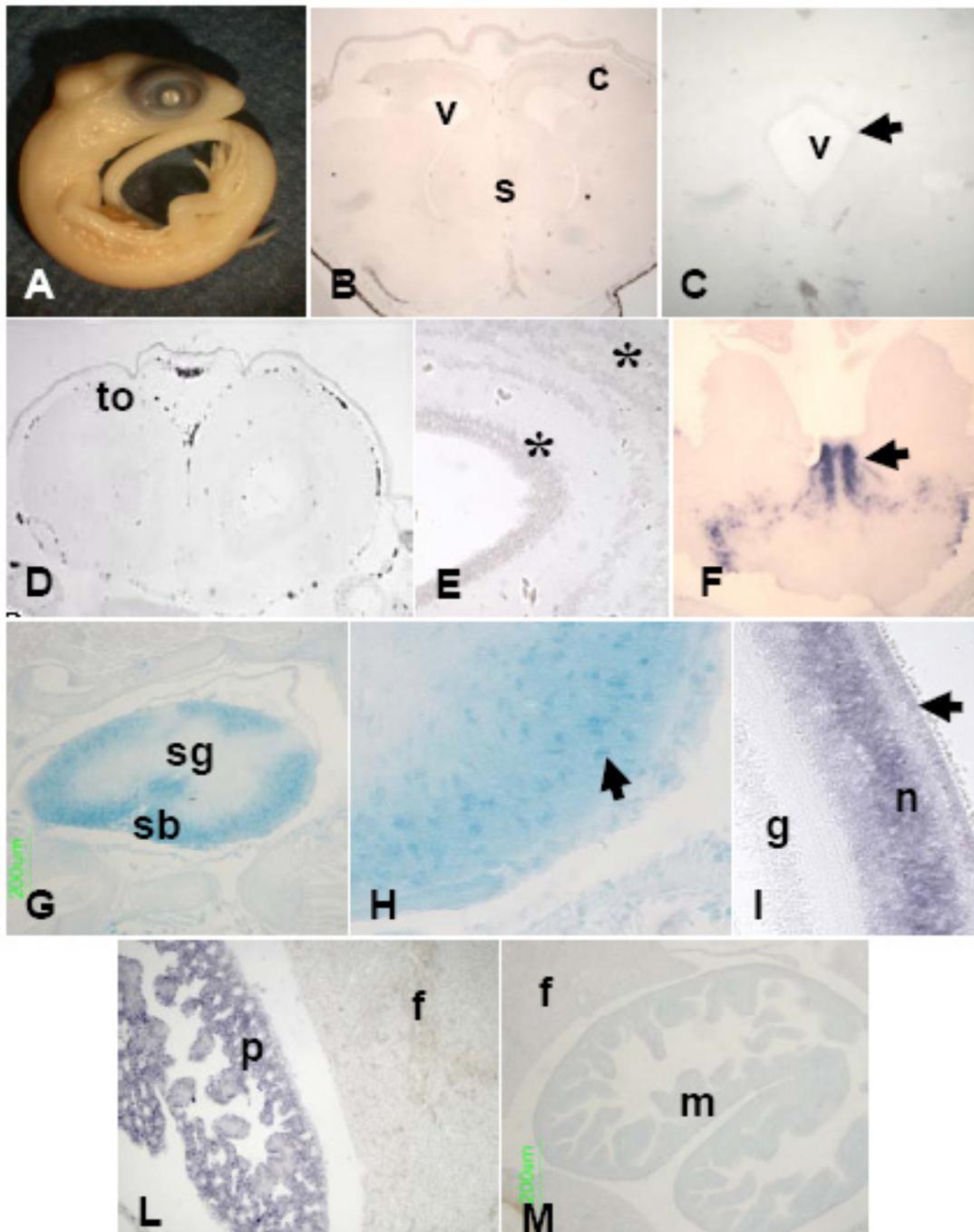
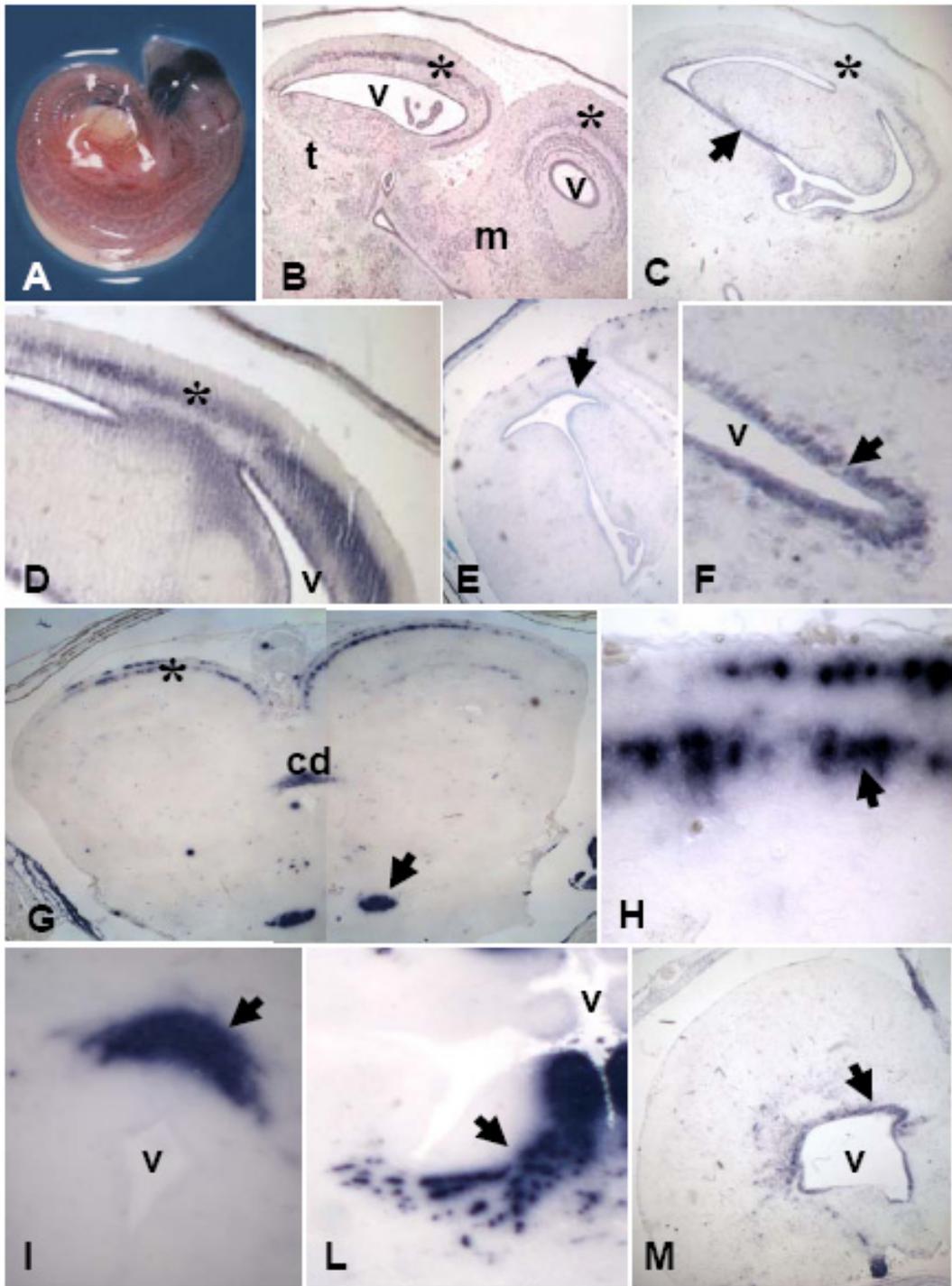


Figura 17: localizzazione dell'MT-mRNA in embrioni di 40 giorni. (A) Embrione in toto. **(B)** telencefalo con setto (s), ventricolo (v) e corteccia (c) negativi all'ibridazione. **(C)** dettaglio di diencefalo negativo. Ventricolo (v), cellule ependimali (freccia). **(D)** mesencefalo con corteccia del tetto ottico (to, *) negativa all'ibridazione. **(E)** dettaglio della figura D. Corteccia con strati (*) negativi. **(F)** midollo allungato con MT-mRNA localizzato nei nuclei. **(G)** midollo spinale con messaggero nella sostanza bianca (sb). Sostanza grigia (sg) negativa. **(H)** dettaglio della figura G che mostra la positività negli assoni e nei nuclei delle cellule gliali (freccia). **(I)** retina, con strato nucleare interno (n) ed esterno (freccia) positivi, strato gangliare (g) completamente negativo. **(L)** fegato (f) negativo e polmone (p) con parenchima marcato. **(M)** intestino con mucosa (m) non marcata.

Riprese a: B, D, F: 5x; C, G, L, M: 10x; E, H: 20x.



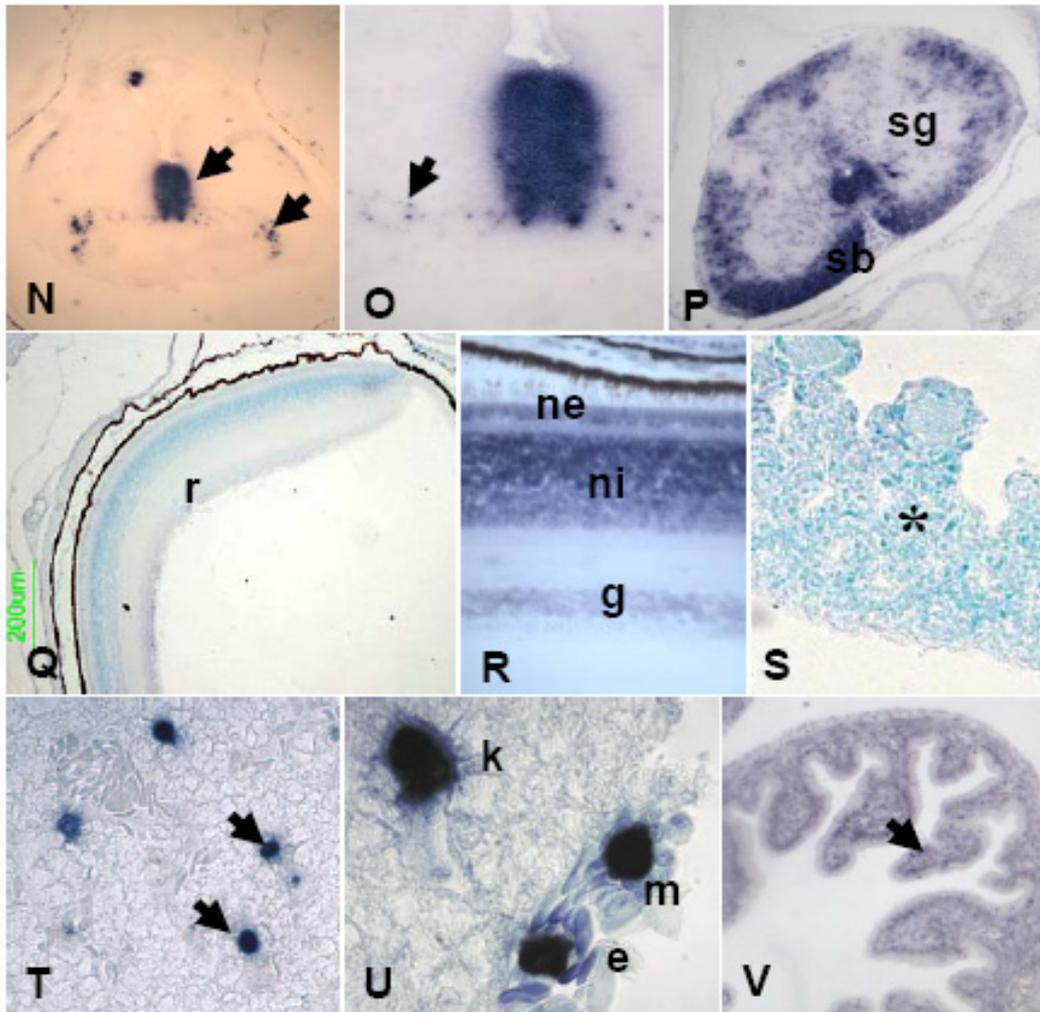


Figura 18: localizzazione dell'MT-mRNA in embrioni prossimi alla schiusa. (A) Embrione in toto. (B) sezione sagittale di telencefalo (t) e mesencefalo (m) colorata con emallume-eosina. Si notano le rispettive cortecce (*) e i ventricoli (v). (C) ibridazione del telencefalo mostrato in figura B. Cellule ependimali (freccia) e corteccia marcate (*). (D) dettaglio della corteccia (*) e cellule ependimali (freccia) positive. (E) diencefalo con marcatura nelle cellule ependimali (freccia). (F) dettaglio delle cellule ependimali marcate (freccia); ventricolo (v). (G) mesencefalo con corteccia (*), commessura dorsale (cd) e nuclei basali (freccia) marcati. (H) dettaglio della corteccia del tetto ottico con cellule marcate (freccia). (I) commessura dorsale marcata. (L) nucleo basale marcato. (M) sezione anteriore di midollo allungato con marcatura delle cellule ependimali (freccia). (N) midollo allungato con alcuni nuclei mediali e laterali marcati (frecce). (O) particolare di nucleo mediale positivo. (P) midollo spinale con messaggero nella sostanza bianca (sb). Sostanza grigia (sg). (Q) retina marcata. (R) dettaglio della retina con la marcatura negli strati gangliare (g), nucleare interno (ni) e esterno (ne). (S) parenchima polmonare (*) marcato. (T) fegato con alcune cellule di Kupffer marcate (frecce). (U) dettaglio di Kupffer (k) e monociti (m) marcati. (e) emazie. (V) intestino con villi marcata (freccia).

Riprese a: B,C,E,G,M,N, P, Q: 5x; D,V: 10x; I,L,F,O,R,S: 20x; H,T: 40x; U: 100x.

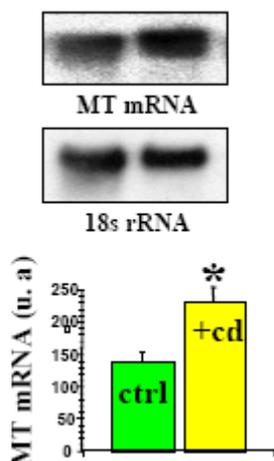


Figura 19: espressione dell' MT-mRNA in embrioni di controllo e trattati con cadmio. (A) Northern blot. (B) analisi densitometrica condotta sul blot in figura A. Il trattamento con cadmio aumenta significativamente ($P < 0.05$, *) la quantità di messaggero presente rispetto ai controlli.

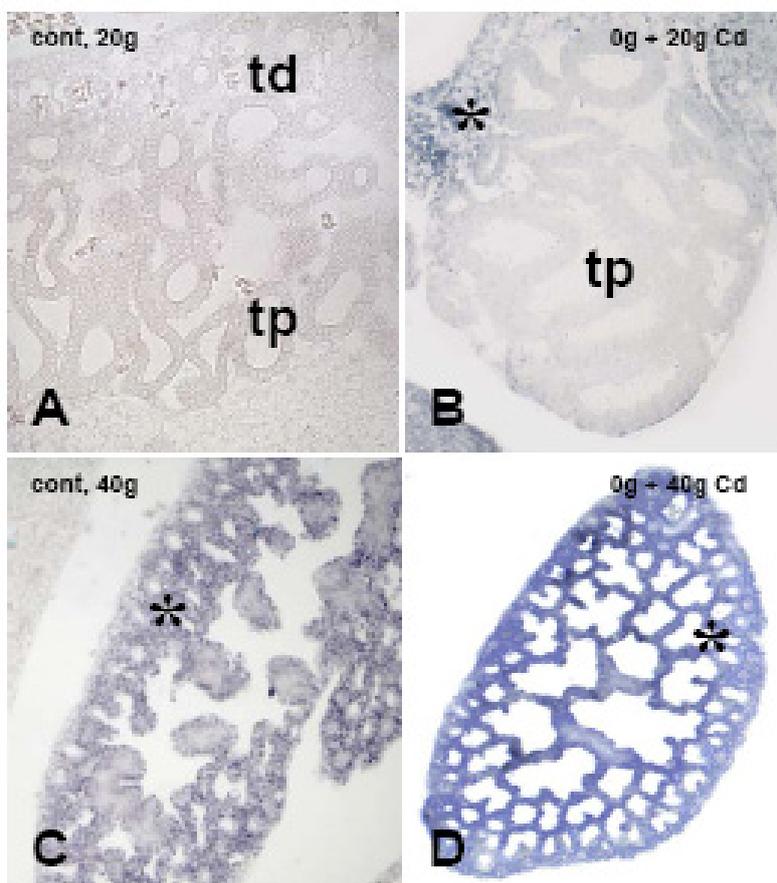


Figura 20: localizzazione dell' MT-mRNA nel rene (A-B) e nel polmone (C-D) di embrioni di controllo e trattati con cadmio. (A) tubuli prossimali (tp) e distali (td) negativi all'ibridazione. (B) situazione comparabile al controllo. Si notano le cellule mesenchimali positive (*). (C) parenchima polmonare positivo (*). (D) parenchima positivo (*). Riprese a 10x.

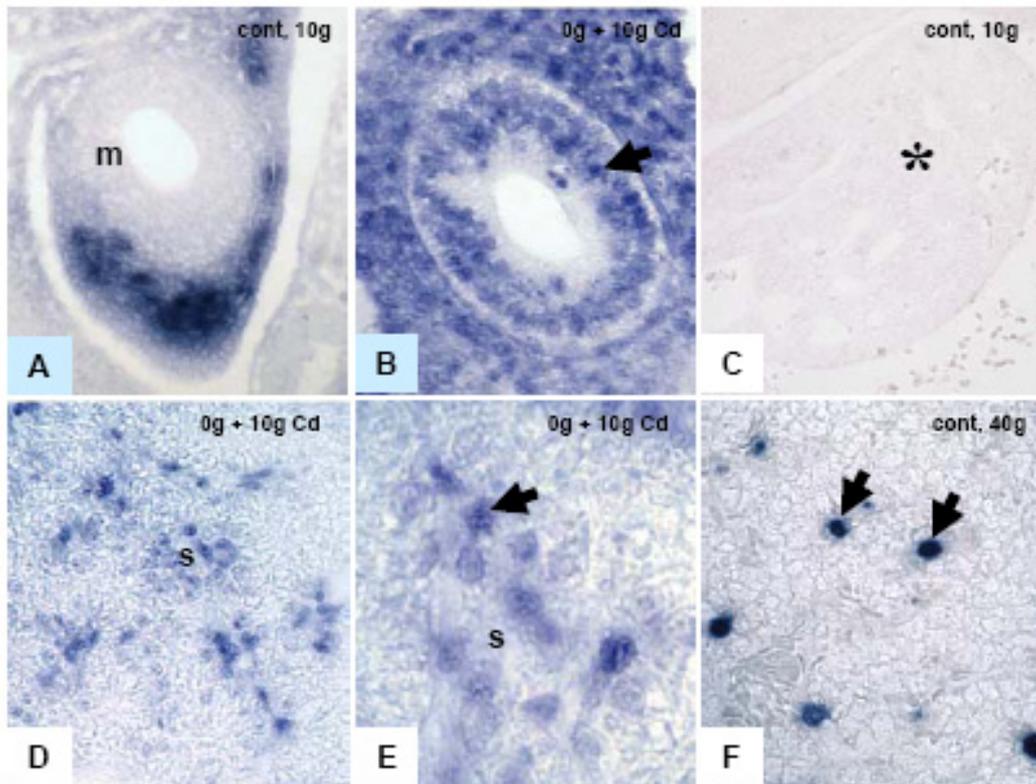


Figura 21: localizzazione dell'MT-mRNA nell'intestino (A-B) e nel fegato (C-F) di embrioni di controllo e trattati con cadmio. (A) Il messaggero è localizzato solo nel connettivo che circonda la mucosa (m). (B) Il messaggero è presente nei nuclei delle cellule della mucosa (freccia). (C) parenchima (*) completamente negativo. (D) la positività è localizzata su alcune cellule a livello dei sinusoidi in formazione (s). (E) dettaglio della fig. D in cui si nota la reazione positiva a livello dei nuclei (freccia). (F) Il messaggero è presente solo a livello delle cellule di Kupffer (freccie). Riprese a: A-C: 10x; D-E: 20x; F: 40x.

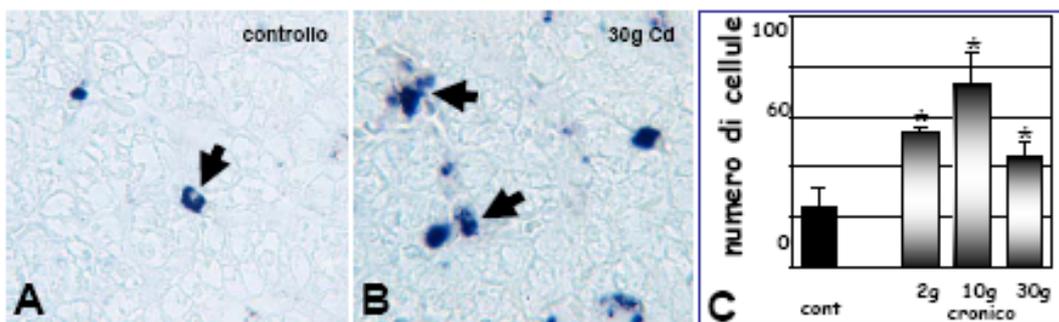


Figura 22: espressione e localizzazione dell'MT-mRNA nel fegato di adulti di controllo e trattati con cadmio. (A) occasionali cellule di Kupffer positive. (B) aumento del numero di cellule di Kupffer positive. (C) grafico che descrive l'andamento del numero di cellule di Kupffer positive all'ibridazione dopo trattamento cronico con cadmio. Si osserva un significativo incremento (*) a 2 giorni dopo il trattamento e un parziale recupero dopo 30 giorni. Riprese a 40x.

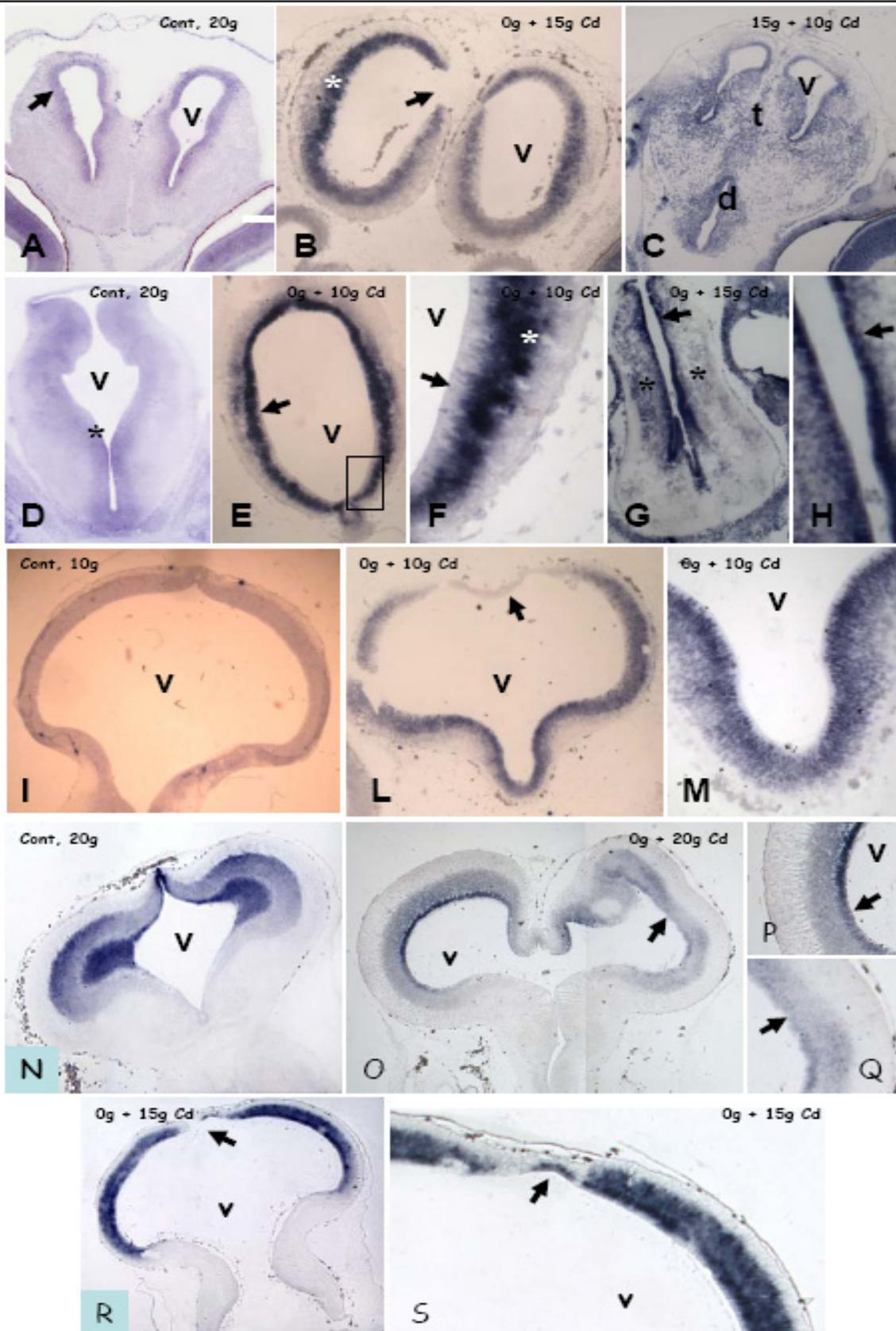


Figura 23: localizzazione dell'MT-mRNA nell'encefalo di embrioni trattati con cadmio. (A) telencefalo con messaggero nella sostanza grigia periventricolare (freccia). (B) telencefalo anteriore; aumentata espressione a livello della sostanza grigia palliale e striata nell'emisfero che presenta parete interrotta (freccia). (C) messaggero distribuito nella sostanza grigia periventricolare di telencefalo (t) e diencefalo (d). (D) diencefalo con marcatura sulla sostanza grigia (*). (E) diencefalo con ventricolo dilatato e parete assottigliata. Il messaggero è localizzato nella sostanza grigia periventricolare (freccia). (F) dettaglio della figura E. Si notano la marcatura nella parte centrale della parete (*) e le cellule ependimali negative (freccia). (G) diencefalo con marcatura asimmetrica della sostanza grigia (*); si nota anche l'intensa positività delle cellule ependimali (freccia). (H) dettaglio della figura G che mostra l'intensa positività delle cellule ependimali (freccia). (I) mesencefalo con marcatura nella sostanza grigia periventricolare. (L) mesencefalo, riduzione della positività in posizione dorsale (freccia). (M) dettaglio della regione ventrale intensamente positiva. (N) mesencefalo con positività nella regione della corteccia in formazione. (O) mesencefalo; l'espressione dell'MT-mRNA si riduce nelle cellule ependimali del lobo alterato (freccia). (P e Q) dettagli della figura O. Cellule ependimali del lobo normale e alterato rispettivamente. (R) mesencefalo con ventricolo dilatato. Il messaggero è espresso nella sostanza grigia dei soli lobi ottici. Si nota una interruzione della marcatura nella zona dorsale (freccia). (S) dettaglio della regione dorsale scarsamente marcata (freccia). Ventricolo (v). Ripresa a: A,C,D,I,L,N,O,R: 5x; B,E,G,S: 10x; M,P,Q: 20x; F,H: 40x.

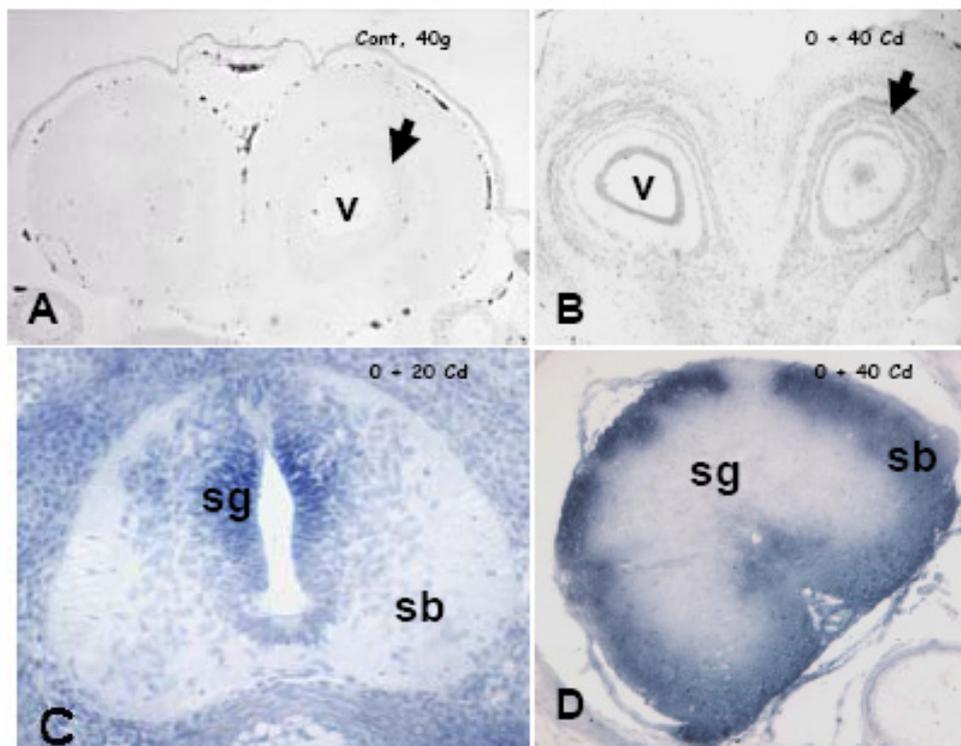


Figura 24: localizzazione dell'MT-mRNA nel mesencefalo (A-B) e nel midollo spinale (C-D) di embrioni trattati con cadmio. (A-B) assenza di marcatura nella corteccia (freccia) del tetto ottico. (C) midollo spinale con messaggero nella sostanza grigia (sg) (D) intensa marcatura negli assoni della sostanza bianca (sb); la sostanza grigia (sg) e' negativa alla reazione. Riprese a: A,B: 5x; C,D: 10x.

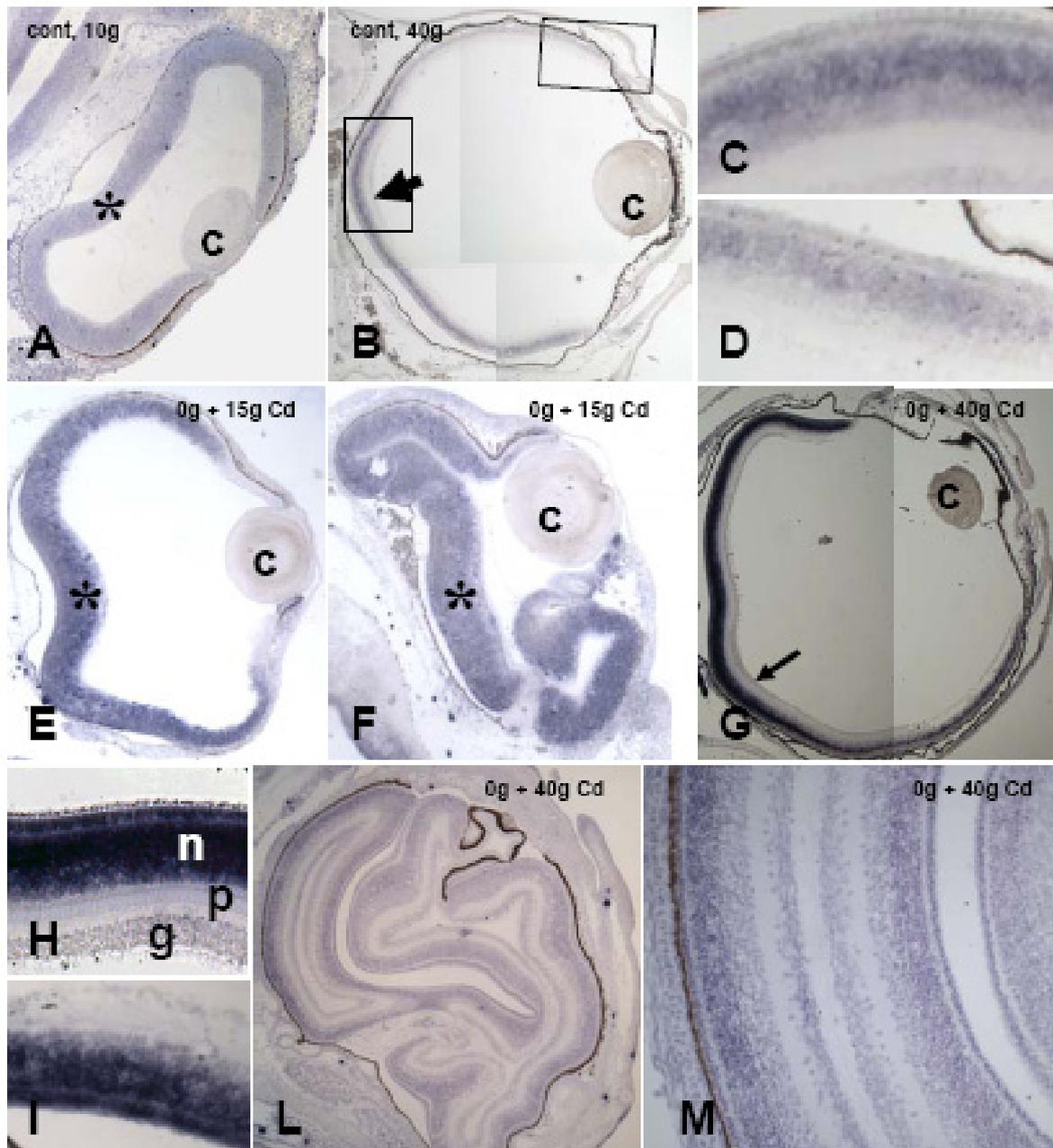


Figura 25: localizzazione dell'MT-mRNA nell'occhio di embrioni trattati con cadmio. (A) retina con marcatura diffusa ed omogenea (*). (B) retina con marcatura piu' intensa nella regione distale al cristallino (freccia) in cui si nota anche una stratificazione. (C-D) dettagli di retina distale e prossimale al cristallino in cui si nota la diversa disposizione delle cellule positive all'ibridazione. (E) occhio sviluppato normalmente. La marcatura è identica a quella presente negli occhi di controllo. (F) occhio controlaterale, alterato. La marcatura è distribuita in maniera uniforme e simile al controllo in tutta la retina, anche nelle pliche (*). (G) occhio normalmente sviluppato; marcatura come nel controllo. (H) dettaglio di retina distale al cristallino in cui si nota l'intensa marcatura dello strato nucleare (n) e la negatività degli strati gangliare (g) e il plessiforme interno (p). (I) retina prossimale al cristallino con marcatura blanda e diffusa. (L) occhio con retina ripiegata ad invadere l'umore vitreo. La marcatura è chiaramente localizzata sugli strati cellulari. (M) dettaglio della figura L.

Riprese a: A, B, E, F, G, L: 5x; C, D, H, I, M: 20x.

CAPITOLO 8: EFFETTI DEL CADMIO SULLA ESPRESSIONE DEI GENI COINVOLTI NELLO SVILUPPO EMBRIONALE: Pax6, Otx2 e Fzr

8.1 PAX6

8.1.1 Clonaggio e sequenziamento

Allo scopo di ottenere un frammento di cDNA codificante Pax6, da utilizzare come sonda nelle ibridazioni in situ, sono state allestite delle reazioni di PCR su cDNA ottenuto per retro trascrizione dell'RNA totale estratto da embrioni in toto. Le reazioni di PCR sono state allestite utilizzando 5 differenti primers, 2 forward e tre reverse (fig. 27A) disegnati sulla base dell'allineamento delle sequenze nucleotidiche di Pax6 di un rettile, gallo e bue presenti nella banca dati nucleotidica EMBL (fig. 26) L'elettroforesi dei prodotti ottenuti dalle reazioni di PCR condotte con le 6 possibili combinazioni di primers ha rivelato la presenza di numerosi frammenti. Di questi uno solo, di circa 520 paia di basi, presente nella PCR condotta con i primers For2 e Rev2 (fig. 27B), è stato considerato interessante e, per questo, eluito dal gel (fig. 27C), clonato e sequenziato.

La sequenza ottenuta, riportata in fig 31, corrisponde ad un frammento di 519 bp codificante un polipeptide di 173 aminoacidi. Il confronto di tale sequenza con le sequenze presenti in banca dati dimostra un'identità di circa l'88% con la corrispondente regione di Pax6 di pollo.

8.1.2 Quantificazione dell'espressione in embrioni di controllo o trattati

Eventuali variazioni dell'espressione di Pax6 indotte dal trattamento con cadmio sono state analizzate mediante Northern blot (fig. 29A). L'RNA totale estratto da embrioni di controllo o trattati con cadmio (0 +20) è stati ibridato con una sonda radioattiva costituita dal frammento di cDNA codificante per Pax6 di *Podarcis sicula*.

L'analisi densitometrica (fig. 29B) conferma la presenza di un solo trascritto sia negli embrioni di controllo che trattati e dimostra che la concentrazione di trascritto nell'embrione trattato è significativamente maggiore ($P < 0.05$) di quella misurata nell'embrione di controllo.

8.1.3 Localizzazione del messaggero e della proteina in embrioni di controllo o trattati

Eventuali variazioni di espressione di Pax6 in embrioni trattati con cadmio sono state studiate mediante ibridazioni in situ ed immunolocalizzazioni al fine di rilevare, rispettivamente, variazioni nella presenza/localizzazione del messaggero e della relativa proteina. Le ibridazioni

sono state condotte utilizzando la sonda omologa da me ottenuta, opportunamente marcata con digossigenina; le immunolocalizzazioni sono state condotte utilizzando un anticorpo monoclonale di pollo.

Nell'encefalo degli embrioni di controllo a 10 giorni di sviluppo il messaggero e la proteina sono presenti nella sostanza grigia e nelle cellule endodermali del telencefalo (fig. 30A-C), del diencefalo (fig. 30D-F) e del mesencefalo (fig. 30G-I).

Negli embrioni a 20 giorni di sviluppo il messaggero (fig. 31A-B) e la proteina (fig. 31C) sono presenti nella sostanza grigia periventricolare e nelle cellule dell'endodermia del telencefalo e del diencefalo. Con il procedere dello sviluppo, a 40 giorni e fino alla schiusa, l'espressione di Pax6 è presente solo nelle cellule endodermali del telencefalo (fig. 31D-E)

Nell'occhio di embrioni di controllo di 10 giorni di sviluppo il messaggero e la proteina sono localizzati diffusa nella retina (fig. 32B-G). In embrioni a 20 giorni, nel tratto della retina prossimale al cristallino il messaggero e la proteina restano distribuiti in maniera diffusa (fig. 32I-L, N, P) mentre nella retina distale si localizzano nello strato gangliare e nucleare interno già differenziati (fig. 32I-L, M, O).

Nell'embrione a 40 giorni, e fino alla schiusa (dato non mostrato), la retina è ormai tutta differenziata (fig. 33) e Pax6 è presente nelle cellule dello strato gangliare e nucleare interno.

Dopo trattamento con cadmio nelle vescicole dell'encefalo che conservano intatta la morfologia non si osservano significative variazioni nella presenza/localizzazione ne' del messaggero ne' della proteina. Viceversa, si osserva una riduzione dell'espressione nelle regioni con morfologia alterata, indipendentemente dall'entità' del danno (fig. 34).

Nell'occhio di embrioni trattati la marcatura e' sempre presente nella retina stratificata e risulta particolarmente intensa nelle regioni ripiegate che invadono la cavità oculare (fig. 35). Come osservato nei controlli (fig. 35A-B), il messaggero (fig. 35D,F) e la proteina (fig. 35E, G-H) sono localizzati nello strato nucleare interno e, in misura minore, anche quello gangliare.



Figura 26: allineamento mediante il programma Blasta delle sequenze di Pax6 di rettile, pollo e bue disponibili in banca dati. Gli asterischi indicano le basi conservate, le sequenze in giallo e in verde le basi utilizzate per disegnare i primers forward e reverse rispettivamente.

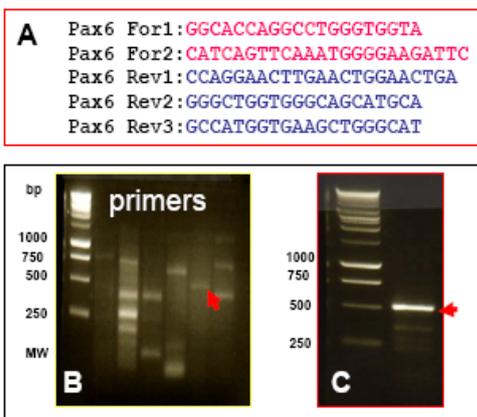


Figura 27: primers utilizzati (A) e relativi prodotti delle PCR dopo corsa in gel di agarosio (B-C). (B) prodotti ottenuti dalle reazioni di PCR condotte con le 6 possibili combinazioni di primers; freccia: banda ritenuta di interesse; marker molecolari (MW). (C) particolare della banda eluita

```

Score = 652 bits (339), Expect = 0.0
Identities = 459/519 (88%), Gaps = 0/519 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query  56      GGGCTGGTGGGCAGCATGCAAGAGTAAGAGGAACTCTGGCTGGGTACCGGGGGTTGCATA 115
          |||
Sbjct 1456     GGGCTGGTGGGCAGCATGCAAGAGTAGGAGGAGGTCTGGCTGGGTACCGGGGGTTGCATA 1397

Query  116     GGCAGGTTGTTAGCCATTGTGAAGCTAGGCATGGGTGGCAAAGCACTGTATGTGTTTGT 175
          |||
Sbjct 1396     GGCAGGTTGTTGGCCATGGTGAAGCTGGGCATGGGCGGCAGTGCGCTGTACGTGTTTCGTG 1337

Query  176     AGCGCGGTGTCTGTTCTGCCAGCATTGAACCTGATGTGAAAGAGGAAACAGGTGTTGTG 235
          |||
Sbjct 1336     AGCGCTGTGTCTGTCTCCCAACATGGAACCTGATGTGAAAGAGGAAACGGGGGTGGTC 1277

Query  236     GGTTCGCGGGATTGGTTGGTAGACACTTGTGCTAAACTACTGCTGATGGGAATGTGGCTG 295
          |||
Sbjct 1276     GGCTGTGGGATCGGCTGGTAAACGCTTGTGCTGAAACTACTGCTGATGGGGATGTGGCTG 1217

Query  296     GGGGTGTGCTGGCTTGTCTTCTCTGATTCCCTTAGCTTCTCTCCCGTCTCCATTTTGCC 355
          |||
Sbjct 1216     GGAGTGTGCTGGCTTGTCTCCGCTGGTCCGCGAGCTTCTCTCCCTTCTCCACTTGGCC 1157

Query  356     CTCTCTGTTGAAAACACACCTGTATCTTGCTTCAGGCAAGTCTATTTTGGCAGCTAGT 415
          |||
Sbjct 1156     CTCTCTGTTAGAAAACACACCTGTATCCTTGCTTCAGGCAAGTCTATTTTAGCAGCTAGT 1097

Query  416     CTCTCTGTTGAAAACACATCAGGATAGTGAGTCTCTCGAATTCTTTCTCAAGCGCTTCA 475
          |||
Sbjct 1096     CGCTCTCTCGAAAACACATCAGGATAGTGGGTTCTCTCAAACCTTTTCTCAAGGGCTTCG 1037

Query  476     ATTTGTTCTTGGGTGAAGGAGGTCCGATTTCTTTGCAGCTGCCTTTTCAGCTGAAGCCTC 535
          |||
Sbjct 1036     ATTTGCTCTTGGGTAAAGGATGTCTTATTTCTGCTGAGCTTCTTTTCAGCTGAAGTCTC 977

Query  536     ATCTGGGCCTCGTCTGAATCTTCCCCATTTGAACTGATG 574
          |||
Sbjct 976     ATCTGGGCCTCATCGGAATCTTCCCCATTTGGAGCTGATG 938

```

Figura 28: appaiamento del frammento di cDNA di 519 bp ottenuto in *Podarcis* con il corrispondente frammento codificante Pax6 nel pollo. Si nota la forte identità (88%) tra le due sequenze.

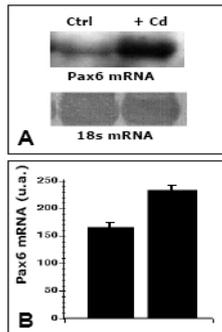


Figura 29: espressione del messaggero di Pax6 in embrioni controllo e trattati a 20 giorni di sviluppo. (A) Northern blot. (B) analisi densitometrica condotta sulle bande di ibridazione.

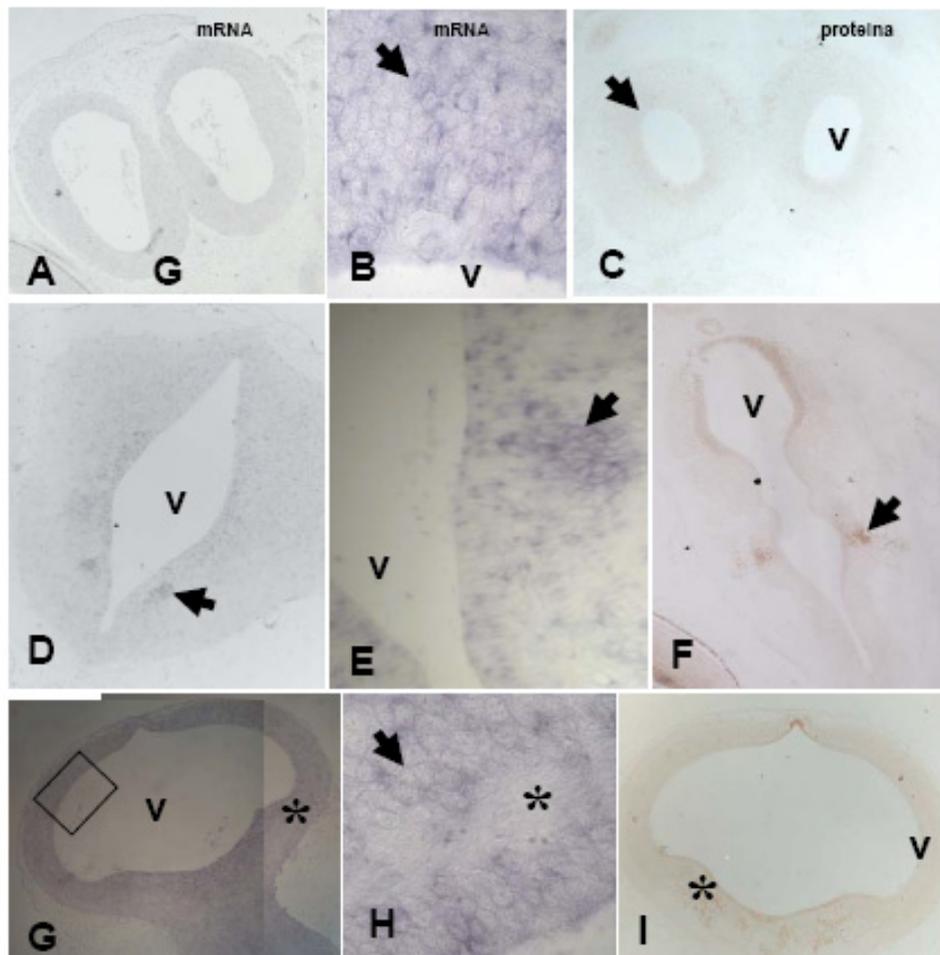


Figura 30: localizzazione del messaggero e della proteina Pax6 in embrioni a 10 giorni. (A) telencefalo con messaggero presente in tutte le cellule della parete. (B) dettaglio in cui si notano cellule della parete con citoplasma positivo (freccia). (C) telencefalo; la proteina e' abbondante soprattutto nelle cellule ependimali (freccia). (D-F) diencefalo, messaggero (D-E) e proteina (F) sono localizzati nella sostanza grigia, nell'ependima e nei nuclei (freccie). (G, I) mesencefalo; messaggero (G) e proteina (I) sono presenti nella sostanza grigia (*). (H) dettaglio del tetto ottico in cui si nota il messaggero nel citoplasma perinucleare (freccia) ma non negli assoni (*). (v): ventricolo.

Riprese a: A, C, D, F, G, I: 5x; B: 20x; E, H: 40x.

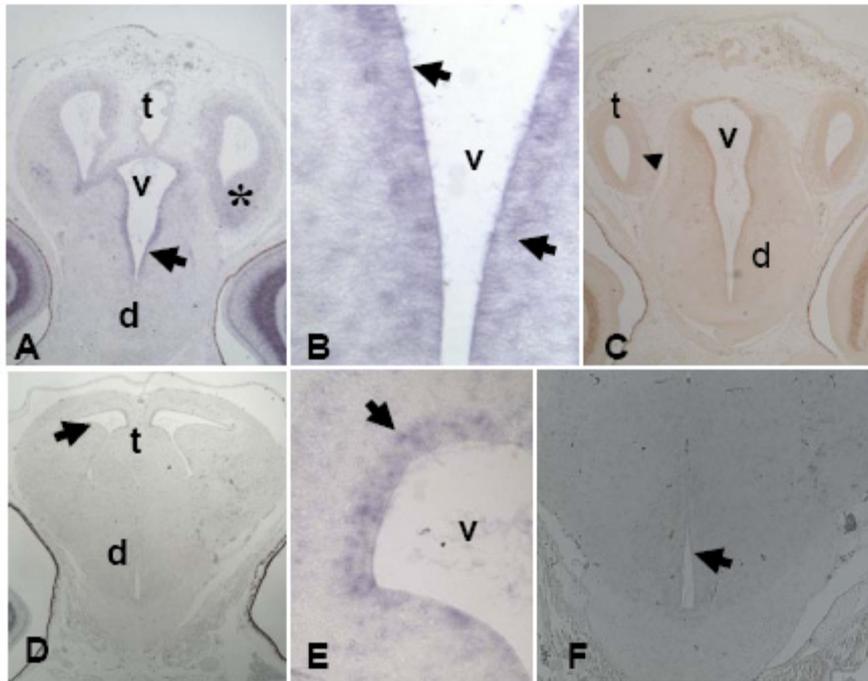


Figura 31: localizzazione del messaggero e della proteina Pax6 in embrioni a 20 (A-C) e 40 giorni (D-F). (A,C) telencefalo (t) e diencefalo (d) con messaggero (A) e proteina (C) presenti nella sostanza grigia periventricolare (*) e in misura maggiore nelle cellule dell'ependima (freccie). (B) dettaglio delle cellule dell'ependima del diencefalo. (D) messaggero localizzato esclusivamente nell'ependima (freccia) del telencefalo (t). Diencefalo (d). (E) dettaglio della marcatura nelle cellule ependimali (freccia) del telencefalo. (F) diencefalo negativo alla colorazione. Ventricolo (v). Riprese a: A,C,D,F: 5x; B,E: 20x.

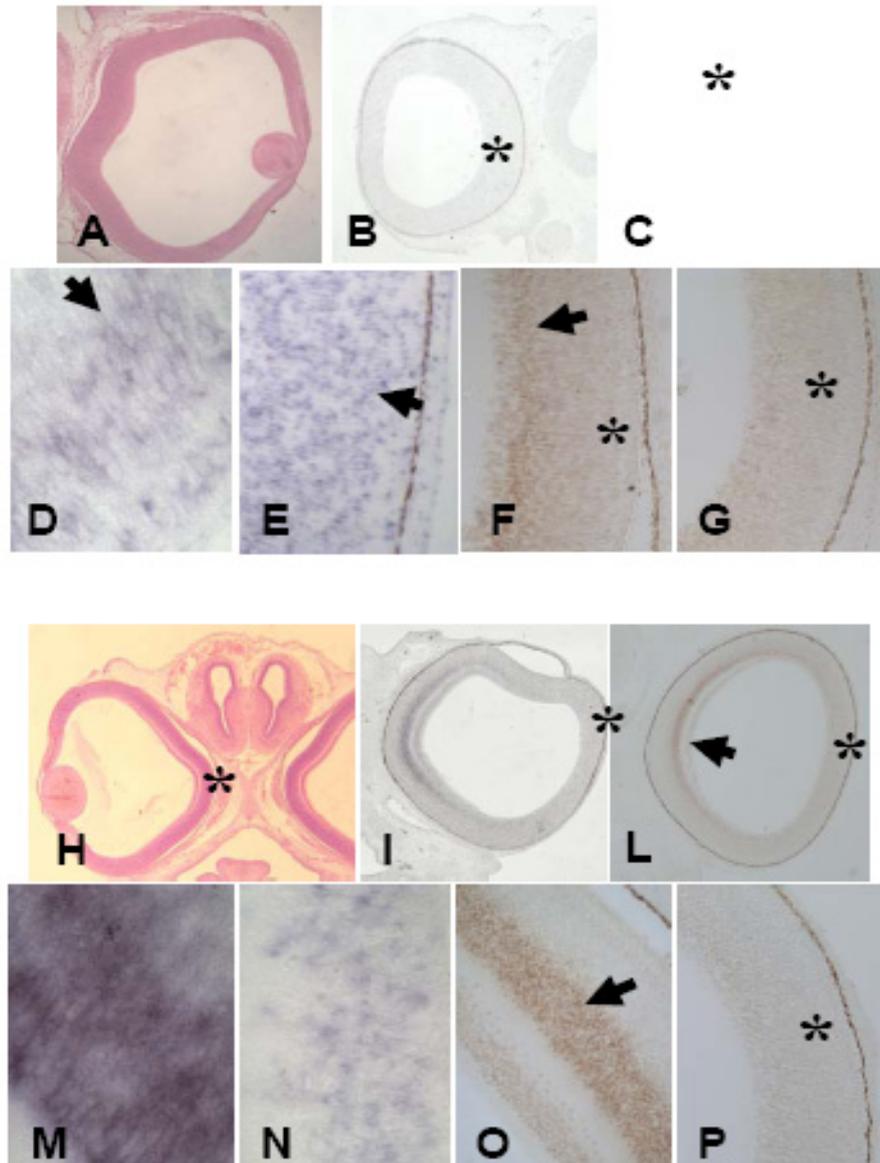


Figura 32: localizzazione del messaggero e della proteina Pax6 nella retina di embrioni a 10 (A-G) e 20 (H-P) giorni. (A) occhio; colorazione con emallume eosina. Retina con messaggero (B) e proteina (C) diffusi uniformemente nella retina (*). Particolare di retina distale (D) e prossimale (E) al cristallino con distribuzione sparsa delle cellule contenenti il messaggero (freccie). Particolare di retina distale (F) e prossimale (G) al cristallino con distribuzione sparsa delle cellule contenenti la proteina (*). Nella retina distale la proteina è accumulata nella regione dello strato gangliare (freccia). (H) occhio, colorazione con emallume eosina. La retina distale al cristallino (*) è stratificata. Occhi con messaggero (I) e proteina (L) diffusi nella retina prossimale al cristallino (*), non stratificata, e disposti a strati nella retina distale (freccie). Dettagli di retina distale (M) e prossimale (N) al cristallino in cui si nota la maggiore intensità di espressione del messaggero. (O-P) dettagli di retina distale e prossimale al cristallino con distribuzione a strati (freccia) e sparsa (*) delle cellule contenenti la proteina.

Riprese a: A,B,C,H,I,L: 5x; D, E, M, N: 40x; F,G,O,P: 20x.

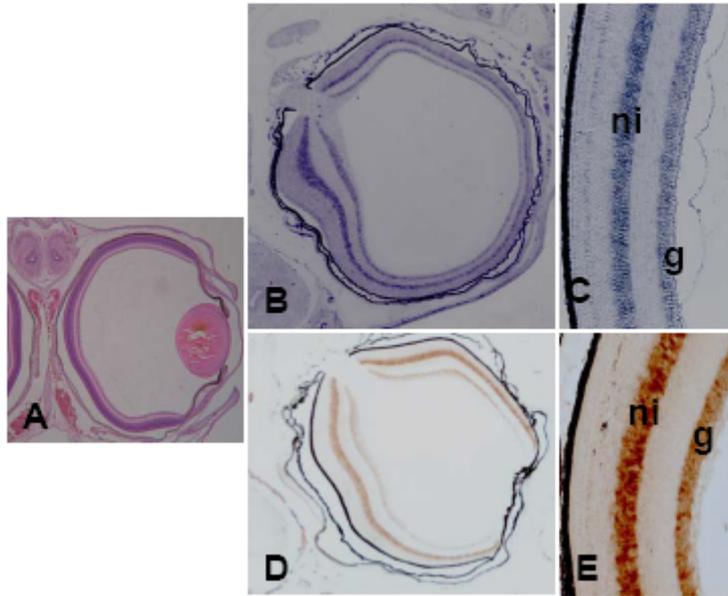


Figura 33: localizzazione del messaggero e della proteina Pax6 negli occhi di embrioni a 40 giorni. (A) occhio, colorazione con emallume eosina. Si nota la retina perfettamente stratificata. (B-C) messaggero e (D-E) proteina presenti nelle cellule dello strato nucleare interno (ni) e gangliare (g) della retina.
Riprese a: A,B,D: 5x; C,E: 20x.

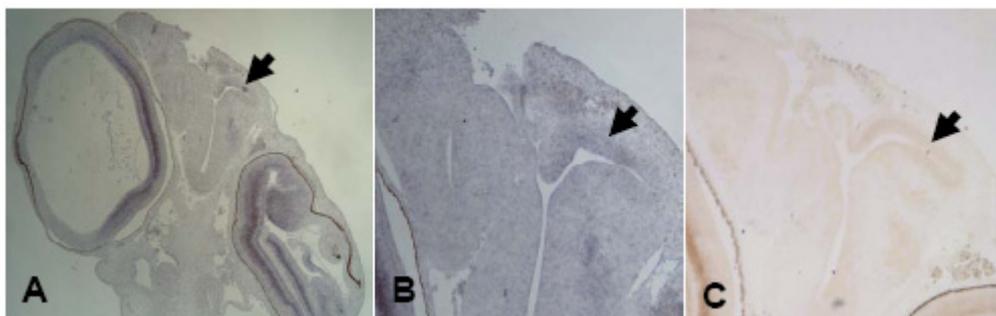


Figura 34: localizzazione del messaggero e della proteina Pax6 nel telencefalo alterato di un embrione trattato. Il messaggero (A-B) e la proteina (C) sono localizzati nelle cellule dell'ependima dell'emisfero normale (freccie).
Riprese a: A: 5x; B,C: 10x.

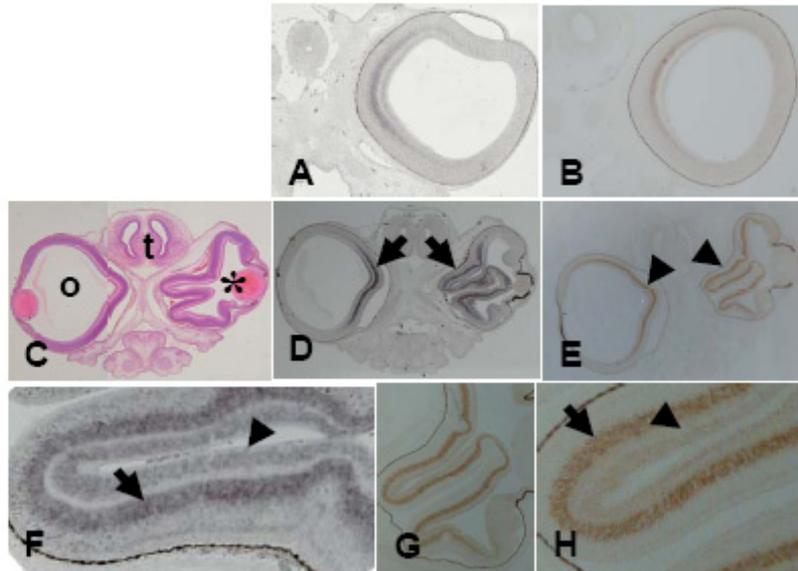


Figura 35: localizzazione del messaggero e della proteina Pax6 in occhi di embrioni trattati. (A-B) distribuzione del messaggero (freccia) e della proteina (punta di freccia) in occhi di un embrione di controllo. (C) sezione di testa, colorazione con emallume eosina. A sinistra, occhio normale (o) e, a destra, occhio con retina ripiegata (*). Telencefalo (t). Distribuzione del messaggero (freccia) (D) e della proteina (E) (punta di freccia) nella retina posteriore dei due occhi. (F-H) particolari delle figure precedenti; notare il messaggero (D) e proteina (E-F) localizzati soprattutto nello strato nucleare interno (freccia); scarsamente positive anche le cellule dello strato gangliare (punta di freccia).

Riprese a: A-C: 5x; D,E,G:10x; F, H:20x.

8.2 OTX2

8.2.1 Clonaggio e sequenziamento

Allo scopo di ottenere un frammento di cDNA codificante *Otx2*, da utilizzare come sonda nelle ibridazioni in situ, sono state condotte delle reazioni di PCR su cDNA ottenuto per retro trascrizione dell'RNA totale estratto da embrioni in toto. Le reazioni di PCR sono state allestite utilizzando 3 differenti primers, 2 forward e 1 reverse (fig. 37A) disegnati sulla base dell'allineamento delle sequenze nucleotidiche di *Otx2* di *Astatotilapia* (osteitto), di *Xenopus* (anfibia), pollo (uccello) e topo (mammifero) presenti nella banca dati nucleotidica EMBL (fig. 36). L'elettroforesi dei prodotti ottenuti dalle reazioni di PCR condotte con le due possibili combinazioni di primers, ha rivelato la presenza di un frammento di circa 550 paia di basi nella PCR assemblata con i due primers For1 e Rev1 (fig. 37 B). Tale frammento è stato eluito da gel, clonato e sequenziato.

La sequenza ottenuta, riportata in fig 38, corrisponde ad un frammento di 546 bp codificante un polipeptide di 182 aminoacidi. Il confronto di tale sequenza con le sequenze presenti nelle banche dati dimostra un'identità di circa l'88% ed una similarità dell'89 con la corrispondente regione di *Otx2* di uccello e mammifero.

8.2.2 Quantificazione dei livelli di espressione in embrioni di controllo o trattati

Eventuali variazioni dell'espressione di *Otx2* indotte dal trattamento con cadmio sono state analizzate mediante Northern blot (fig. 39A). L'RNA totale estratto da embrioni di controllo o trattati (0+20g) è stato ibridato con una sonda radioattiva costituita dal frammento di cDNA codificante per *Otx2* di *Podarcis sicula*.

L'analisi densitometrica (fig. 39B) conferma la presenza del trascritto in entrambe le popolazioni di RNA, controllo e trattato e dimostra che la quantità di trascritto presente nell'RNA estratto dagli embrioni trattati è significativamente maggiore ($P < 0.05$) di quella osservata nell'RNA controllo.

8.2.3 Localizzazione del messaggero in embrioni di controllo o trattati

Per verificare se l'esposizione al cadmio determina variazioni nella presenza/localizzazione del messaggero per *Otx2* sono state condotte ibridazioni in situ utilizzando come sonda il frammento di *Podarcis* da me ottenuto, opportunamente marcato con digossigenina.

Negli embrioni di controllo, fino a 20 giorni di sviluppo, il messaggero è espresso in tutte le vescicole encefaliche e, in particolare, nella sostanza grigia periventricolare (fig. 40A-G), nei nuclei in formazione (fig. 40G), nelle cellule dello strato ependimale (fig. 40F-G) e nella sostanza grigia del midollo spinale (fig. 42A). Nell'occhio il messaggero è presente anche, a livello della retina indifferenziata (fig. 41A-C). Polmone (fig. 42B) e rene (fig. 42C) invece sono sempre negativi all'ibridazione.

Con il procedere dello sviluppo la localizzazione del messaggero di *Otx2* nell'encefalo non varia. Restano positive all'ibridazione in situ la sostanza grigia, le cellule ependimali e quelle degli strati differenziati delle cortecce del telencefalo e del mesencefalo (fig. 43E). Là dove espresso, il messaggero è localizzato nel citoplasma (fig. 43A, C) e/o nel nucleo (fig. 43B, D).

Nella retina, con il procedere del differenziamento il messaggero si localizza (fig. 41D) negli strati cellulari, nucleare esterno ed interno e gangliare. Gli strati plessiformi, interno ed esterno, e quello delle fibre ottiche restano invece sempre negativi all'ibridazione.

Negli embrioni trattati con cadmio l'espressione del messaggero aumenta ma non varia la sua localizzazione anche quando sono presenti evidenti alterazioni morfologiche. La marcatura, infatti, nell'encefalo resta localizzata nella sostanza grigia periventricolare (fig. 44A-E), nelle cellule dell'ependima (fig. 44B, C), nei nuclei e, più tardi, nelle cortecce (dato non mostrato).

Nella retina il messaggero per *Otx2* è localizzato prima in tutte le cellule (fig. 45A-B); dopo i 20 giorni, quando inizia la stratificazione, si concentra negli strati cellulari, anche nella retina che si presenta ripiegata (fig. 45C, D).

```

Xenopus      ATGATGCTTATCTCAAGCAACCGCCATACGCCGTGAATGGGCTCAGCCTGACCGCTCC
Astatotilapia ---ATGTCGTATCTCAAGCAACCGCCTTACACAGTAAATGGCCTCAGCTTAACTACTTCC
Mouse      ATGATGCTTATCTAAGCAACCGCCTTACGCAGTCAATGGGCTGAGTCTGACCACTTCG
Chicken     ATGATGCTTATCTTCAAGCAACCGCCTTACGCAGTCAATGGGCTGAGTTCACCACTTCG
*****

Xenopus      GGGATGGATTGTTGCACCACTCGGTGGGATATCCCGGACCCOCCAGGAAACAGAGGAGG
Astatotilapia GGCATGGATCTTTACATCCATCAGTGGGCTATCCAGCCACTCCAAGGAGCAGAGGCGA
Mouse      GGTATGGACTTGTGCATCCCTCCGTGGGCTACCCCGCACCCOCCOCCGAAACAGGAGG
Chicken     GGCATGGATTGTTGCATCCCTCAGTGGTATCCCGCACCCOCCOCCGAAACAGGAGGCGG
*****

Xenopus      GAAAGGACACTTTTACAGGGCCCACTGGATATCCTTGAAGCACTTTTGCANAACT
Astatotilapia GAACGGACTACTTTTACCGCGCACAGCTCGACGTTTGGAGGOSTTATTTGCTAANACT
Mouse      GAGAGGACGACATTTACTAGGGCACAGCTCGACGTTCTGGAAGCTCTGTTGCAAGACC
Chicken     GAGCGCACACTTCAACCGGGCGAGCTGGACGCTGGAGGOCCTGTTGCGCAAGACC
*****

Xenopus      CGTACCCCTGATATCTTCATGAGAGAGAGTGGCTCAAAAATCAACTACCTGAGTCC
Astatotilapia CGGTATCCCTGATATCTTCATGCGCGAGAGGTAGCGCTGAAAATCAACTACCTGAGTCC
Mouse      CGGTACCCGACATCTTCATGAGGAGAGAGTGGCACTGAAAATCAACTTGCAGAGTCC
Chicken     CGTACCCGACATCTTCATGCGGGAGGAGTGGCCTTAAAATCAACTGCCCGAGTCC
*****

Xenopus      AGAGTCCAGTCTGGTTCAAAAACCGCAGAGCAAGTGCCTGAGCAGCAGCAGCAGCAG
Astatotilapia CCGGTACAGTCTGGTTAAAACCGCGGGCAGAGTGTGCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
Mouse      AGGGTGCAGTATGGTTAAGAAATCGAAGAGCTAAGTGCCTGAGCAGCAGCAGCAGCAG
Chicken     AGAGTGCAGTGTGGTTCAAAAACCGCGGGCCAAAGTGCCTGAGCAGCAGCAGCAGCAG
*****

Xenopus      CAGAATGGAGGCCAAAACAAAGTGAACCTTCAAGAAGAAAGTCTCCTGTAGAGAA
Astatotilapia CAGAATGGGGGCGAACAAGTGCAGCTCCAAAAGAAAGTTCOCCAAACAGAGGAA
Mouse      CAGAATGGAGGTCAGAACAAGTGAAGCTTCCAAAGAAAGAGCTCTCCAGCTCGGGAA
Chicken     CAGAAAGGGGGCGAACAAGTGAAGCTTCCAAAAGAAAGTTCOCCAAACAGAGGAA
*****
      |
Xenopus      GTGAGCTGGAGAGTGGCACCGCGGCCAATTGACCCACTAGCAGCACTCT---GTT
Astatotilapia GTGAGCTGGAAAGCGGGCCAGCGGCCAGTTCACACCCOCCOCCAGCAGCAGCAGGTC
Mouse      GTGAGTTCAGAGAGTGAACAAGTGGCCAGTTCAGTCCOCCCTCTAGTAACTCA---GTC
Chicken     GTGAGCTGGAGAGCGGACAGCGGGCAGTTCACACCCOCCCTCAGCAGCAGCTCG---GTC
*****

Xenopus      CCAGTCACTCAAGCAGCAGCTCCTGTGTCCATCTGGAGCOOCCOCCOCTCTCTCCT
Astatotilapia CCGOCCATCTCAACGACCCCGCCAGTGTCCATATGGAGTCCOCCOCCOCTCTCTCC
Mouse      CCAACCAATTGCCAGCAGCAGTGTCCAGTGTCTATCTGGAGCOOCCOCCOCTCTCTCC
Chicken     CCAACCAATTGCCAGCAGCAGTGTCCOCCGTGTCCATCTGGAGCOOCCOCCOCTCTCTCC
*****

Xenopus      CTGTCCGACCCCTGTCCACATCATCTTCATGTATGCAGAGTCTTACCTATGACCTAC
Astatotilapia CTCTCAGATCCCTTATCTAOCCTCTCTCTTGCATGCAGAGGCTTATCCCATGACCTAC
Mouse      CTGTCTGACCCCTTGTCCACTTCTCTCTCTGATGCAGAGGCTCTTCCCATGACCTAC
Chicken     CTCTCCGATCCCTGTCCACTTCTCTCTCTGCAATGCAGAACTCTTACCCATGACCTAC
*****
      |
Xenopus      ACGCAGGCTCAGGGTACAGCCAAAGATATGCAGGCTCAACATCCTACTTTGGGGGTATC
Astatotilapia ACACAGGCTCAGGGTACAGCCAGGGCTACGCGGGGTGACGCTCCTACTTTGGGGGTATC
Mouse      ACTCAGGCTCAGGTTATAGTCAAGGCTATGCTGGCTCAACTCCTACTTTGGGGGTATC
Chicken     ACCCAGGCTCAGGTTACAGCCAAAGATATGCGGGCTCGACCTCCTACTTTGGGGGTATC
*****

Xenopus      GACTGTGGATCTTACTTGAAGCCTATGCATCATCAACTCTCTGSACTGGAGTACTCT/
Astatotilapia GACTGCAGCTTACTCTCACTCCATGCACCAAGTGTGAGTCCGGGTCAACTCT/
Mouse      GACTGTGGATCTTATTTGACCCCTATGCATCAACAGTCTCTGSACTGGGGCCACTC/
Chicken     GACTGTGGATCTTATTTGACCCCTATGCACCAAGCTCCOCCGACCGGGGCCACCTC/
*****

Xenopus      AGCCCAATGGGCACCAATGCAAGTGAAGTCACTTAACCAAGTCCOCCAGTTGCCCTCTCC
Astatotilapia AGTCCGATGAGCACAAACGCACTCACAAAGCCATCTGAACCAAGTCCOCCGCTCCCTCTCC
Mouse      AGTCCCATGGTACCAATGCTGTACCAGCCATCTCAATCAGTCCOCCAGCTCTCTCTTCC
Chicken     ATTCCCATGGTGCNAATGCGGTACACGCCAAGTCAACCAATCTCCAGCTCCCTCTCC
*****

Xenopus      TCACAGGCTATGGAGCTTCTAGCTTTGGGTTTAAATCCACTG---ACTGCCTGGATAC
Astatotilapia ACCCAGGGATAGGGAGCTTCCGGCTGGGTTCAACTCCACAGCAGACTGCTTGGNITA/
Mouse      ACCCAGGGATAGGGAGCTTCAAGCTTGGGTTTAACTCAACCACTGATTGCTTGGNITA/
Chicken     ACCCAGGGATAGGGAGCTTCAATTTGGGTTTAACTCAACCAOAGATTGCTTGGNITA/
*****

Xenopus      AAGACCAAACCTGCCTCTGGAAGCTGAACCTCAATGCTGACTGCTTGGATTATAAGAC
Astatotilapia AAGACCAAAGCGGCATCGTGAAGCTGAACCTCAATGCCGATTGCTTGGATTATAAGAC
Mouse      AAGACCAAACCTGCCTCTGGAAGCTTAACTCAATGCTGACTGCTTGGATTATAAGAA/
Chicken     AAAAAACAAACCGCTTCTTGAATTTAAGTTCAAAGCTGAGTCTTGGATTATAAGAA/
*****
      |
Xenopus      CAACCTCATCTTGGAAATCCAGGTTTTGTA
Astatotilapia AAAGCGGCTCGTAG-----
Mouse      CAGACCTCATGGAATTCAGGTTTTGTA
Chicken     CAACTTCTCATGGAATTCAGGTTTTGTA
*****

```

Figura 36: allineamento nucleotidico mediante il programma Blasta delle sequenze di Otx2 di alcuni vertebrati. Gli asterischi indicano le basi conservate, le sequenze in giallo e in verde le basi utilizzate per disegnare i primers forward e reverse rispettivamente.

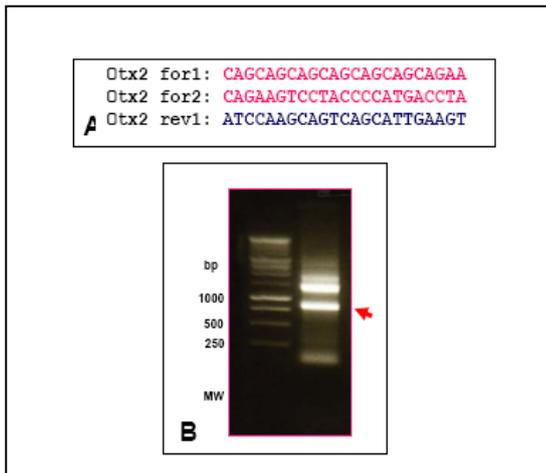


Figura 37: primers utilizzati (A) e prodotto ottenuto dalla reazione di PCR con la combinazioni dei primer for1/rev1 (B). freccia: banda ritenuta di interesse; marker molecolari (MW).

```

CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAGAATGGGGGCCAGAACAAAGT
GAGGCCCGGAAGAAGAAGAGCTCTCCCGCCCGAGAAGTGA
GTTTCAGAGAGTGGGACCAGTGGGCAGTTCACGCCTCCAACCA
GCACCTCAGTCCCTACCATCTCCAGCAGCAGTGCCCCAGTGT
CCATCTGGAGCCCTGCCTCCATCTCCCCACTCTCTGACCCCT
GTCCACCTCTTCTCATGCATGCAGAGGTCTTACCCTACGACC
TACACTCAGGCTTCCGGCTACAGCCAAGGGTACGCTGGCTCA
ACCTCCTATTTGGAGGGATGGACTGTGGATCTTATCTAATCC
CTATGCACCACCAGCTCCCCGGACCAGGGGCTGCCCTTAGTC
CCATGGGCACCAATGCCGTTGCCAGCCATCTCAACCAGTCTC
CGGCTTCACTCTCCACCCAGGGCTATGGGGCTTCAAGTTTGG
GGTTTAACTCGACCACCGATTGCTTGGATTATAAAGACCAA
CGGCTCTCTGGAAGCTAAACTTCAATGCTGACTGCTTGGAT
  
```

Figura 38: sequenza nucleotidica del frammento di cDNA di 546 bp del gene Otx2 di *Podarcis sicula*.

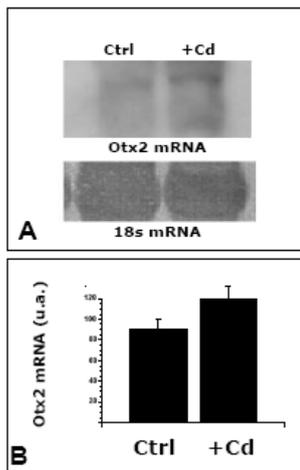


Figura 39: espressione del messaggero di Otx2 in embrioni controllo e trattati on cadmio a 20 giorni di sviluppo. (A) Northern blot. (B) analisi densitometrica

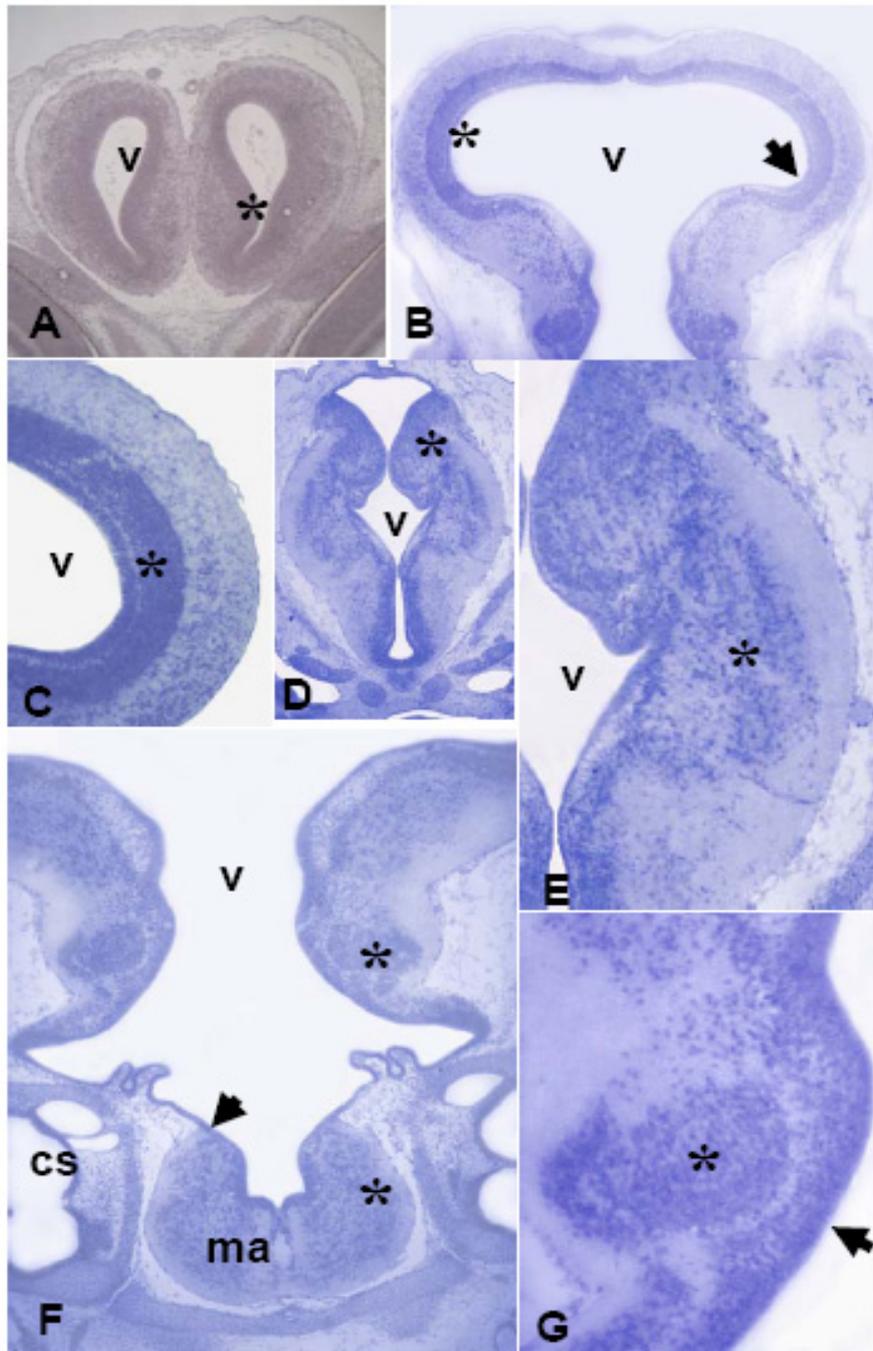


Figura 40: localizzazione del messaggero di Otx2 in embrioni a 20 giorni. (A) telencefalo. (B) tetto del mesencefalo con stratificazione iniziale (freccia). (C) dettaglio della figura B. (D) diencefalo. (E) dettaglio della figura D. (F) midollo allungato (ma) (G) dettaglio della figura F. In tutte le vescicole si riconosce una intensa marcatura a livello delle cellule della sostanza grigia periventricolare (*) e delle cellule ependimali (freccie). (v): ventricolo, (cs) canali semicirculari. Riprese a: A-D, F: 5x; B, C: 10x; E, G: 20x.

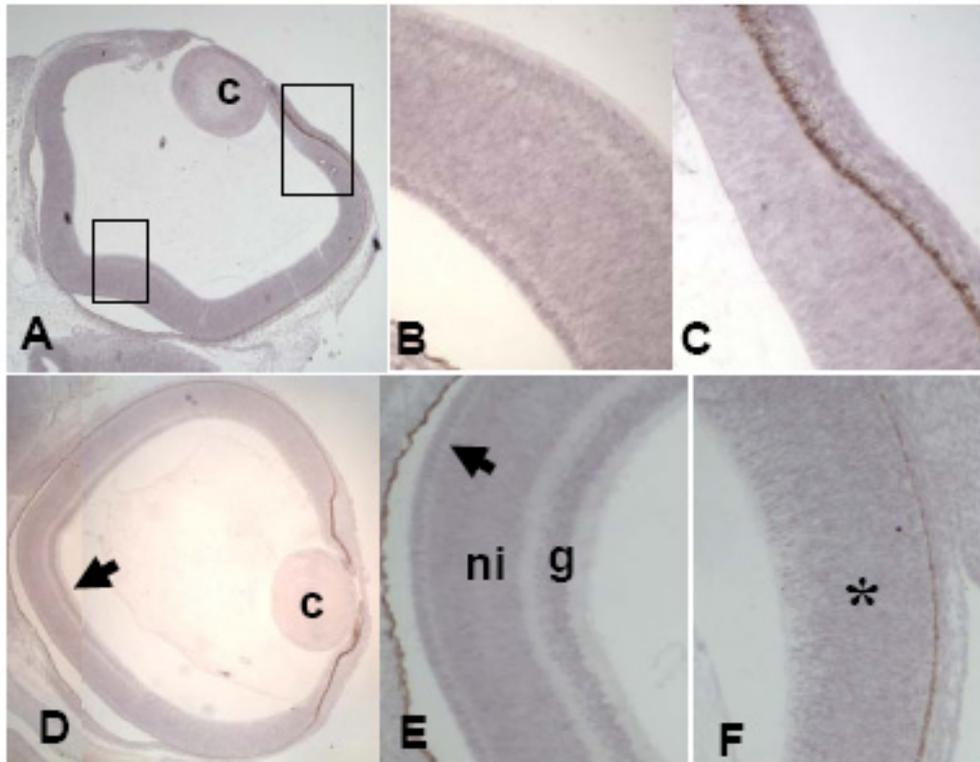


Figura 41: localizzazione del messaggero di Otx2 negli occhi di embrioni a 10 (A-C) e 20 (D-E) giorni. (A) occhio con retina indifferenziata, positiva all'ibridazione (*). (B-C) Particolare della retina distale (B) e prossimale (C) al cristallino in cui si nota la distribuzione del messaggero. (D) occhio con retina differenziata (freccia) nella porzione distale al cristallino (c). (E) particolare di retina distale, stratificata e della marcatura localizzata nello strato gangliare (g), nucleare interno (ni) ed esterno (freccia). (F) particolare di retina prossimale indifferenziata a marcatura diffusa (*). Riprese a: A, D: 5x; B-C, E-F: 20x.

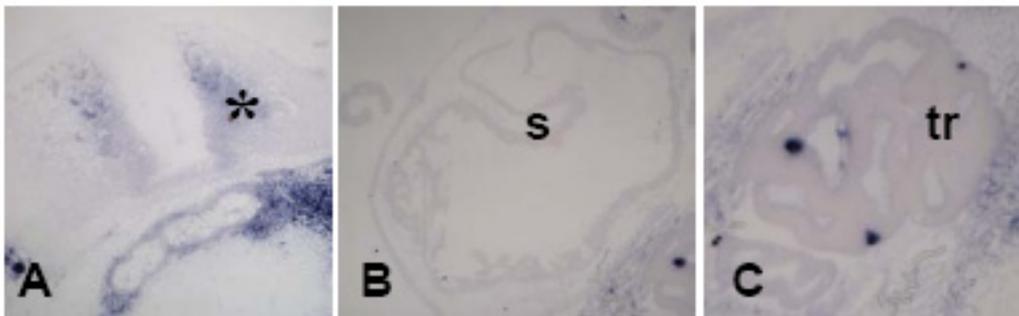


Figura 42: localizzazione del messaggero per Otx2 nel midollo spinale (A), polmone (B) e rene (C) di embrioni di 10 giorni. (A) Il messaggero e' localizzato a livello nella sostanza grigia (*) periventricolare. (B) polmone negativo all'ibridazione. (s) setti. (C) rene con tubuli (tr) negativi all'ibridazione. Riprese a 20x.

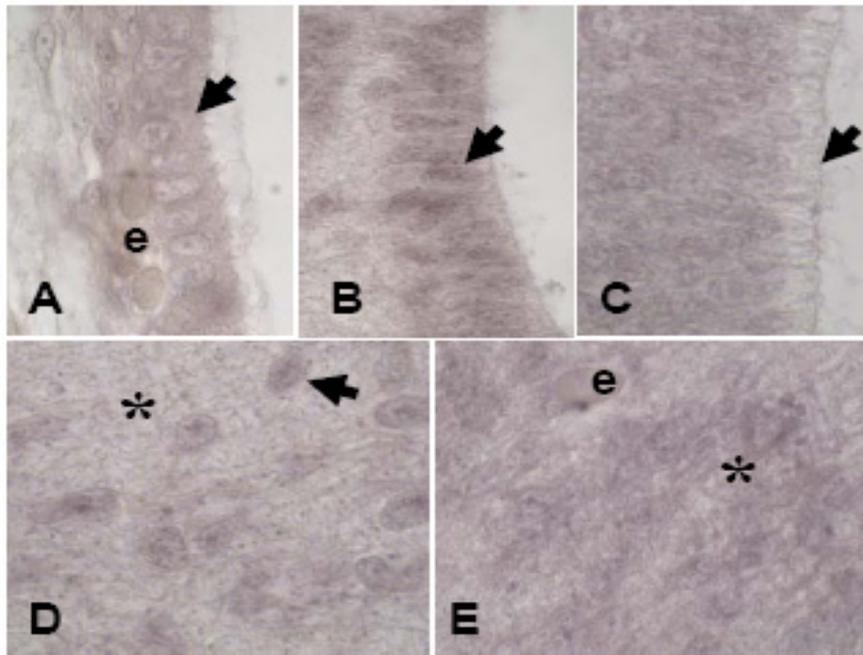


Figura 43: localizzazione citoplasmatica del messaggero di Otx2. Cellule ependimali del diencefalo con messaggero (freccie) nel citoplasma (A) o concentrato nel nucleo (B). (C) Cellule ependimali del tetto ottico del mesencefalo; il messaggero e' presente nella regione basale ma non in quella apicale della cellula (freccia), rivolta verso il ventricolo. (D) diencefalo; il messaggero e' presente nei pirenofori (freccia) e non nelle fibre (*). (E) mesencefalo; fasci di fibre positive (*) nella regione della corteccia ottica. (e) emazie.
Riprese a 40x.

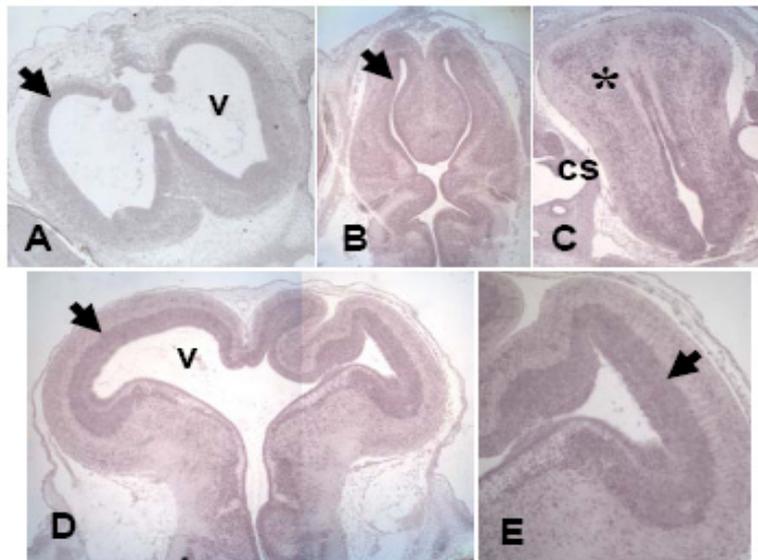


Figura 44: localizzazione del messaggero di Otx2 in encefali alterati di embrioni trattati con cadmio (A, B) telencefalo. (C) diencefalo. (D-E) mesencefalo. Il messaggero e' localizzato come nei controlli, nella sostanza grigia (freccie), indipendentemente dalla presenza di alterazioni morfologiche. Ventricolo (v), canali semicircolari (cs). Riprese a 5x.

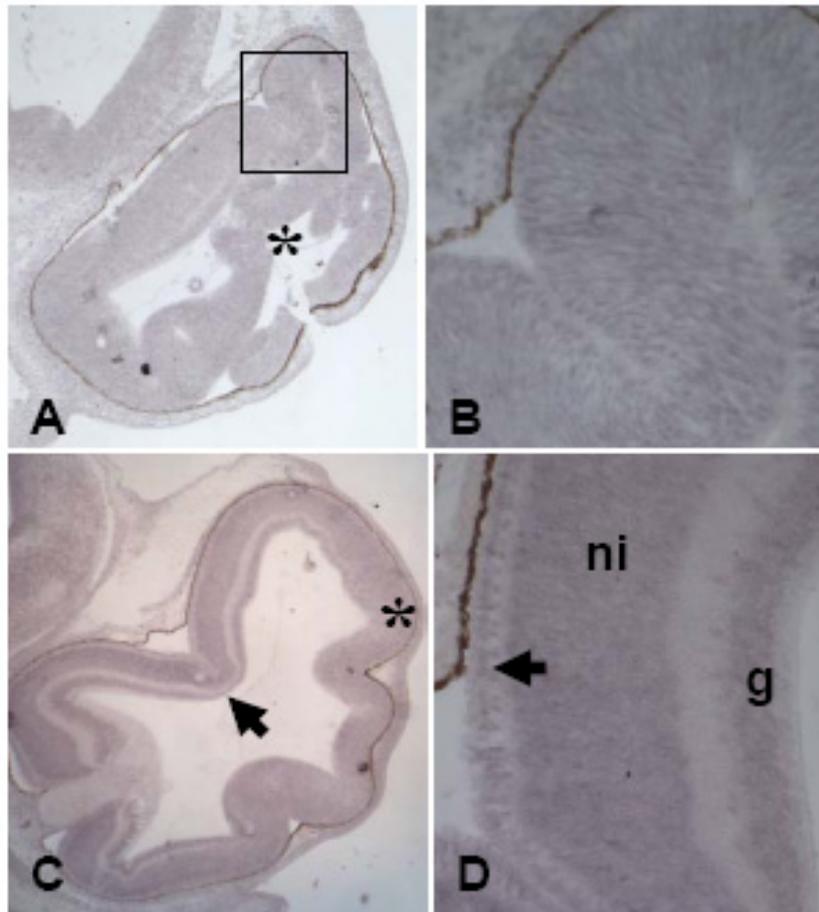


Figura 45: localizzazione del messaggero di Otx2 nella retina di embrioni trattati con cadmio a 10 (A-B) e 20 (C-D) giorni. (A) il messaggero e' espresso in maniera uniforme in tutta la retina (*) che in questa fase e' indifferenziata. (B) dettaglio della figura A. (C) messaggero diffuso nella retina prossimale al cristallino, indifferenziata (*) e localizzato negli strati cellulari nella retina distale, differenziata (freccia). (D) particolare della figura C. Si nota la marcatura sugli strati gangliare (g), nucleare interno (ni) ed esterno (freccia). Riprese a: A, C: 5x; B, D: 20x.

variazioni della proliferazione

8.3.1 Espressione del messaggero per Fzr in embrioni di controllo o trattati

Allo scopo di verificare l'esistenza di variazioni nei livelli di espressione del gene codificante Fzr in seguito ad esposizione al cadmio, l'RNA totale estratto da embrioni di controllo e trattati è stato ibridato mediante Northern blot utilizzando una sonda radioattiva costituita dal frammento di cDNA codificante per Fzr di *Podarcis*. Le quantità di RNA caricato su filtro sono state verificate mediante colorazione dell'RNA ribosomale (fig. 46A).

I livelli di espressione sono stati misurati quantitativamente mediante analisi densitometrica e sottoposti ad analisi statistica utilizzando un test non parametrico (test di Mann-Witthney). I blots dimostrano la presenza di trascritto nell'RNA dei campioni di controllo e trattati. Dall'analisi densitometrica emerge che la quantità di trascritto presente dopo trattamento è minore di quella presente nei campioni di controllo (fig. 46B).

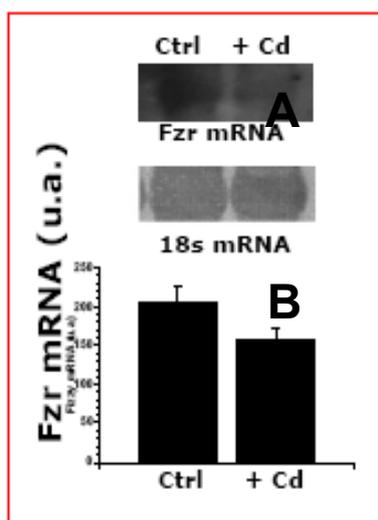


Figura 46: espressione dell'mRNA di Fzr in embrioni di controllo e trattati con cadmio. (A) Northern blot. **(B)** analisi densitometrica condotta sul blot in figura A. Il trattamento con cadmio diminuisce significativamente ($P < 0.05$, *) la quantità di messaggero presente rispetto ai controlli.

8.3.2 Determinazione degli indici di proliferazione

Le analisi dimostrano che dopo trattamento l'attività proliferativa cambia nelle zone dell'encefalo e della retina in cui si sono verificati i ripiegamenti. In particolare, nella retina, la percentuale delle cellule in mitosi è stata determinata in due zone diverse: la distale e la prossimale al cristallino. Negli animali di controllo (fig. 47A) i dati dimostrano l'esistenza di una significativa differenza nel pattern temporale di proliferazione tra la regione prossimale e quella distale. Infatti, negli embrioni di 5 e 10 giorni, la percentuale di proliferazione è identica nelle due regioni e pari al 15%. Negli embrioni di 20 giorni l'attività proliferativa cambia: nella retina distale, differenziata (fig. 10H), non vi sono cellule in mitosi mentre nella retina prossimale, ancora indifferenziata (fig. 10I), la percentuale è pari al 5% circa. Negli embrioni a 40 giorni, che hanno retina completamente differenziata (fig. 10N), non sono presenti cellule in divisione in nessuna parte della retina.

Negli embrioni trattati al momento della deposizione, (0+10, 0+15, 0+20), il cadmio determina effetti sostanzialmente diversi nella retina prossimale e distale al cristallino. In particolare, nella retina prossimale (fig. 47B), nelle zone in cui è avvenuto il ripiegamento, la percentuale di mitosi è pari al 18% dopo 15 giorni e al 22% dopo 20 giorni mentre nei relativi controlli la percentuale è pari rispettivamente al 10 e al 6% circa. Nell'occhio non alterato, viceversa, l'indice non varia in maniera significativa rispetto ai controlli. Nella retina distale (fig. 47C) di embrioni trattati (0+10) il numero delle cellule in mitosi non varia rispetto a quello dei controlli né nell'occhio normale né in quello con alterato. Diversamente negli embrioni con trattamento a tempi successivi (0+15 e 0+20) la percentuale delle cellule in mitosi, sia nell'occhio sano che alterato, è del 5% circa rispetto allo 0,1% registrato nella retina dei controlli.

Negli embrioni trattati in tempi successivi alla deposizione (5+5, 15+5, 20+5), i risultati ottenuti indicano che negli occhi alterati si verifica un significativo aumento della percentuale di cellule in proliferazione nella retina prossimale (fig. 47D) con valori che superano il 25% mentre nella retina di occhi normali la percentuale non subisce variazioni rispetto al controllo. Nella retina distale (fig. 47E) lo ione non induce variazioni significative nel trattamento 5+5 e 20+5 mentre nel trattamento 15+5 la percentuale di proliferazione è del 3 e 8% nell'occhio alterato e normale rispettivamente mentre nel controllo non sono presenti cellule in proliferazione.

Nel mesencefalo, a livello del tetto ottico, il trattamento con cadmio (0+20) determina un aumento dell'attività proliferativa che passa dallo 0,2 % dei controlli al 3% (fig. 48).

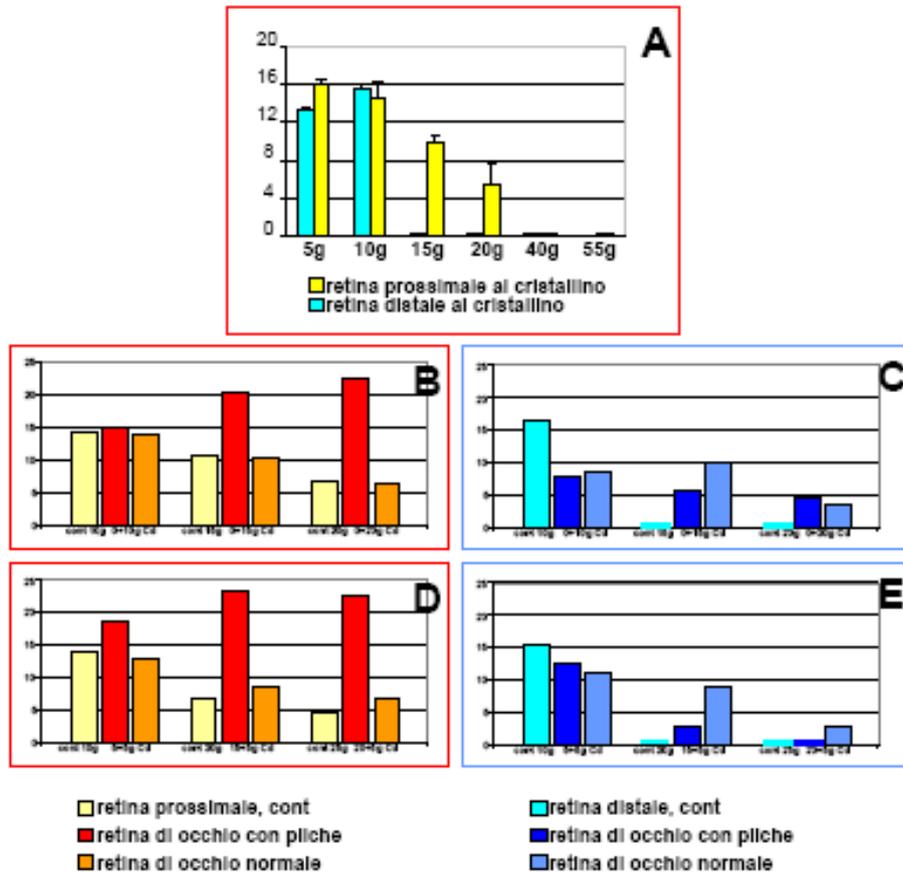


Figura 47: indici di proliferazione nella retina prossimale e distale al cristallino in embrioni di controllo (A), trattati con cadmio al momento della deposizione (B-C) o in tempi successivi (D-E). (A) Gli indici, inizialmente alti, si abbassano rapidamente nella retina distale al cristallino e, piu' lentamente, nella retina prossimale. A 40 giorni le cellule in mitosi sono molto rare in tutta la retina. (B e D) retina prossimale; nell'occhio normale l'indice resta a valori comparabili ai controlli; nelle pieghe l'indice aumenta significativamente. (C e E) retina distale; nei campioni 0+10 e 5+5 gli indici si mantengono su valori inferiori a controllo sia nell'occhio normale che con pliche. Nei campioni ai tempi successivi la situazione si inverte e negli occhi trattati l'indice e' sempre superiore ai controlli.

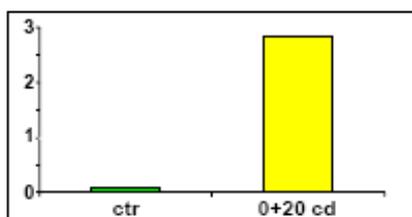


Figura 48: indici di proliferazione (in %) nella parete del tetto ottico del mesencefalo in embrioni di controllo o trattati. Il numero di cellule in mitosi presenti per unità arbitraria di superficie è maggiore dopo trattamento.

CAPITOLO 9: DISCUSSIONE

Gli esperimenti dimostrano che il cadmio alle concentrazioni utilizzate, simili a quelle presenti in natura in ambienti inquinati, esercita effetti tossici. Anche se la mortalità nel corso degli esperimenti è stata praticamente nulla, quasi i 2/3 degli embrioni al momento del prelievo presentava l'organizzazione generale e istologica degli organi conservata ma significative alterazioni a livello dell'encefalo e dell'occhio. Con molta probabilità la concentrazione di cadmio utilizzata, può essere considerata al limite: una concentrazione maggiore del metallo avrebbe avuto effetti più nocivi e forse bloccato lo sviluppo.

I risultati hanno dimostrato che il cadmio ha agito sullo sviluppo degli embrioni, indipendentemente dalla durata del trattamento e dal momento in cui è iniziato il trattamento stesso. Infatti, il risultato degli esperimenti condotti durante le fasi precoci dello sviluppo (0+10, 0+15, 5+5) sono paragonabili a quelli ottenuti in esperimenti condotti tardivamente (15+5, 20+5).

Le alterazioni più evidenti sono state riscontrate nell'encefalo e nell'occhio: il fegato, intestino, rene e polmone, classici organi bersaglio dell'intossicazione da cadmio non presentano alterazioni di rilievo. Questi dati contrastano con quanto riportato in letteratura: il cadmio assorbito e trasferito in circolo, raggiunge facilmente i principali organi interni dove si accumula. Il passaggio dello ione nell'encefalo è invece ostacolato dalla presenza della barriera ematoencefalica. Negli ultimi anni, studi condotti su *Podarcis* (Trinchella et al., 2006) hanno dimostrato che tale barriera rappresenta una protezione solo parziale perché il cadmio riesce ad entrare nell'encefalo e può anche accumularsi. Lo smaltimento del cadmio nell'encefalo è più lento che negli organi: questo bioaccumulo (Trinchella et al., 2006) spiegherebbe le alterazioni riscontrate nell'encefalo e non negli organi.

Le osservazioni dimostrano che le alterazioni a livello dell'encefalo riguardano le vescicole anteriori: telencefalo, diencefalo e mesencefalo. Sebbene questo dato sia di difficile interpretazione, è possibile ipotizzare che ci siano differenze legate a diversi pattern di espressione genica, spaziali e/o temporali. Una possibilità sarebbe che le vescicole anteriori siano sotto il controllo di geni 'diversamente' sensibili all'azione del cadmio rispetto a quelle posteriori.

Il cadmio induce alterazioni significative anche a livello dell'occhio, in particolare della retina, solo occasionalmente nella mucosa olfattiva, negli organi vomero nasali e nei canali semicirculari dell'orecchio. Questo dato può essere spiegato tenendo conto solo la retina, ha un'origine embrionale strettamente connessa a quella delle vescicole encefaliche: al diencefalo da

un punto di vista anatomico e al mesencefalo da un punto di vista funzionale. Nei rettili, infatti, il mesencefalo è la vescicola deputata all'elaborazione delle informazioni visive e alla loro integrazione con le informazioni provenienti dagli altri distretti.

Le diverse alterazioni cadmio-indotte possono essere così raggruppate:

1) alterazioni legate ad interferenza del cadmio con i pattern corporei. Asimmetria, mancato sviluppo, interruzioni delle pareti ed exencefalia, probabilmente dovute a chiusura difettosa del tubo neurale (Fernandez et al., 2004), potrebbero dipendere da alterazioni nell'espressione di alcuni geni regolatori espressi in fasi relativamente precoci dello sviluppo.

2) alterazioni dovute a interferenza del cadmio con le pompe ioniche. Gli squilibri osmotici, indotti sperimentalmente, indurrebbero edema e dilatazione cellulare (Simoniello et al., 2007) e potrebbero essere alla base della dilatazione osservata dei ventricoli del diencefalo e mesencefalo.

3) alterazioni dovute a interferenza del cadmio con i meccanismi di controllo del ciclo cellulare e, in particolare, della proliferazione. Tale interferenza causerebbe una crescita anomala della parete del tetto del mesencefalo e della retina causando la formazione delle pliche che invadono il ventricolo mesencefalico e la cavità oculare. Questa ipotesi è confermata dalla down regolazione del gene *Fzr* dimostrata mediante Northern blot, dalla over-espressione di *Pax6* dimostrata dalle ibridazioni in situ e dall'aumento delle cellule in mitosi.

Altre malformazioni riscontrate negli embrioni trattati riguardano l'interruzione della volta cranica associate all'estrusione delle vescicole mesencefliche, le alterazioni della base del cranio e della mandibola (dati non mostrati). Sebbene in letteratura sia stata descritta un'interferenza del cadmio con il metabolismo del calcio, in questo caso l'alterazione ossea sembra essere presente solo a livello cranico. Pertanto, più che un meccanismo generalizzato di osteoporosi (Kaji T. et al., 1988), il quale avrebbe dovuto interessare anche altre parti del sistema scheletrico, si potrebbe pensare ad una specifica interferenza del cadmio nel processo di induzione che si stabilisce durante lo sviluppo tra le masse nervose dell'encefalo ed il derma sovrastante o ad un meccanismo analogo a quello descritto da Boncinelli e coll. (2000) sul ruolo dei geni *Otx* sullo sviluppo dell'encefalo e sulla formazione della scatola cranica.

La presenza delle malformazioni potrebbe essere correlata ad una inefficace difesa da parte delle proteine a funzione protettiva quali la metallotioneina. Questa proteina infatti gioca un ruolo importante non solo per catturare i metalli (Zn Cu Fe) che entrano nei processi fondamentali della cellula (proliferazione, respirazione) (Vallee, 1995), ma anche per la difesa dei metalli (Palmiter, 1998).

Le MT sono presenti nel follicolo ovarico di *Podarcis sicula* e nell'embrione durante lo sviluppo svolgendo un ruolo protettivo che riduce i danni dovuti all'azione tossica dei metalli pesanti con i quali l'embrione di *Podarcis* può trovarsi a contatto per l'inquinamento del terreno. È stato dimostrato mediante analisi di Northern blot, che nell'ovaio durante la fase di accrescimento ovocitario si verifica un accumulo di MT-mRNA (Riggio et al., 2003). Mediante ibridazioni in situ utilizzando una sonda omologa è stato dimostrato che durante le prime fasi dell'accrescimento il messaggero è accumulato nel citoplasma e che durante la previtellogenesi l'ovocita non trascrive MT-mRNA. In questa fase sono le cellule follicolari piriformi che lo trascrivono e lo trasferiscono all'ovocita mediante i ponti intercellulari, una attiva via di trasferimento mRNA e rRNA verso l'ovocita (Motta et al 1995)

La presenza di MT-mRNA nella discoblastula suggerisce che i messaggeri ovocitari vadano a far parte di quel pool di molecole che vengono trasferite ed utilizzate dall'embrione durante lo sviluppo. Le ibridazioni in situ hanno dimostrato che durante le prime fasi di sviluppo il messaggero materno si concentra nel sistema nervoso e nella retina. I dati suggeriscono quindi che i messaggeri presenti nelle prime fasi dello sviluppo siano di origine materna e che i geni embrionali per la MT si attivino dopo durante lo sviluppo. Queste ipotesi potrebbero essere sostenute dal dato che nel telencefalo, diencefalo e mesencefalo si osserva un'assenza di messaggeri nella fase compresa tra i 35 e i 45 giorni. La presenza del messaggero nelle tre vescicole prima della schiusa dimostrerebbe che in queste vescicole i geni embrionali per le MT si sono attivati e che il messaggero è di nuova sintesi. L'esistenza di fenomeni di inattivazione temporanea è stata descritta anche nel topo: nel fegato di feti di topo di venti giorni e nei neonati di quattro giorni, l'MT è presente nel citoplasma e nel nucleo degli epatociti. Con la crescita post natale (tra i diciotto e i ventisette giorni di vita), la MT tende a scomparire: prima dal nucleo e poi dal citoplasma. In topi di due mesi, la MT viene di nuovo sintetizzata, infatti l'MT è di nuovo presente nel citoplasma e nel nucleo degli epatociti (Bhaer e Thomas, 1991)

L'accensione dei geni embrionali è ben evidente negli organi interni. Infatti negli embrioni di 20 giorni risultano marcati per la prima volta i glomeruli renali; più tardi, a 40 giorni, il polmone e, prima della schiusa, l'intestino ed il fegato. La comparsa del trascritto in questi organi inizialmente negativi, dimostra che questi messaggeri sono di origine embrionale ed è possibile ipotizzare che tale comparsa sia probabilmente correlata all'avvio dell'attività funzionale. La MT, svolgendo il ruolo di difesa della cellula dall'azione tossica dei metalli pesanti, è di fondamentale

importanza per il corretto funzionamento dei reni, organi detossificanti, e dei polmoni, organi soggetti all'azione delle sostanze volatili come il cadmio.

L'assenza del messaggero per la MT nelle tre vescicole dell'encefalo, è contemporaneo all'inversione di marcatura che si riscontra nel midollo spinale: l'ibridazione in situ mette in evidenza che l'mRNA per le MT è espresso nella sostanza bianca e non nelle cellule della sostanza grigia, in precedenza positive alla reazione.

La presenza di messaggeri per la MT nelle cellule gliali della sostanza bianca del midollo spinale può essere legata all'importante ruolo che esse hanno di regolare e di mantenere basse le concentrazioni di zinco nello spazio extracellulare del tessuto nervoso. Queste cellule infatti sono dotate di un efficiente sistema di canali ionici che consente di eliminare lo zinco dalle regioni prossime alle sinapsi (Lopez , 2001) e di garantire la necessaria concentrazione di zinco, oligoelemento essenziale per la trasmissione sinaptica (Bryce-Smith, 1989) e per la proliferazione cellulare (Hanas et al., 1983; Grummt et al., 1986).

L'osservazione che in una prima analisi può sembrare contraddittoria della mancanza di alterazioni indotte dal cadmio negli organi interni, può essere motivata dal dato ottenuto che il cadmio induce l'espressione del messaggero delle MT nell'intestino e nel fegato. Ciò probabilmente dipende dal fatto che in questi organi le cellule sono sempre pronte ad attivare il meccanismo di trascrizione degli mRNA e quindi a svolgere un ruolo di difesa dagli stress. La rapida trascrizione del messaggero produrrebbe sintesi "de novo" di MT, la quale, come è noto dalla letteratura (Trinchella et al., 2006), è in grado di sequestrare il cadmio libero, riducendone gli effetti tossici (su di esso). Un altro dato interessante che emerge è che nel fegato di embrioni non trattati e di adulto le MT sono normalmente espresse solo nelle cellule di Kupffer; dopo trattamento con cadmio nell'embrione si attivano le cellule dei sinusoidi, nell'adulto restano positive all'ibridazione sempre e comunque solo le Kupffer.

Il dato che nel fegato di embrioni prossimi alla schiusa il trascritto è relegato alle cellule del Kupffer e che non sia presente negli epatociti non deve sorprendere, deve invece essere considerata una prova dell'importante ruolo svolto dalle cellule del Kupffer nel processo di detossificazione del fegato (Mc Kim, 1992). In letteratura è riportato che i livelli endogeni di MT normalmente presenti nelle cellule del Kupffer, sono nettamente superiori a quelli riscontrati nelle cellule del parenchima. In topi trattati con cadmio, è stato riscontrato un forte accumulo del metallo nelle cellule del Kupffer, mentre la quantità di cadmio accumulato nelle cellule del parenchima è poco significativa (Mc Kim, 1992).

Nell'encefalo e nell'occhio degli animali trattati con cadmio non è stata riscontrata induzione di messaggero della MT. In particolare, negli embrioni in uno stato avanzato dello sviluppo, la mancanza di espressione di MT anche dopo trattamento con cadmio suggerisce che nel telencefalo diencefalo e mesencefalo non ci sia metallotioneina ad un livello tale da garantire un'efficace protezione contro gli effetti tossici del cadmio. Infatti, proprio in queste vescicole sono state riscontrate evidenti alterazioni morfologiche. Il motivo per cui il cadmio non induca espressione del messaggero della MT nell'encefalo potrebbe dipendere dal fatto che la concentrazione di cadmio che riesce a superare la barriera ematoencefalica sia bassa a tal punto da indurre danno, considerato il tipo di tessuto, ma non l'induzione della MT. Questo spiegherebbe perché l'encefalo sia più sensibile all'azione del cadmio, rispetto agli organi considerati bersaglio. Un'altra spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che i geni per la metallotioneina sono al massimo della loro attività e non possono essere ulteriormente indotti. In *Podarcis* è stato dimostrato (Trinchella et al., 2006) che nell'encefalo i diversi tipi di trattamento (cronico ed acuto) e le vie di somministrazione (intraperitoneale o alimentare) non inducono ulteriormente l'espressione della MT.

Le malformazioni osservate a livello dell'encefalo potrebbero derivare dall'effetto del cadmio sull'espressione di geni specifici che regolano l'ontogenesi. L'asimmetria di formazione dei due emisferi telencefalici e mesencefalici, l'interruzione degli strati di sostanza grigia, l'anomala proliferazione cellulare con conseguente ripiegamento degli strati della corteccia, potrebbe derivare da un cattivo funzionamento, indotto dal cadmio, di geni specifici.

Per definire se tali alterazioni potessero essere associate all'alterazioni dei geni coinvolti nello sviluppo sono stati presi in considerazione i geni Pax6 ed Otx2: geni altamente conservati nel corso dell'evoluzione (Nishina et al 1999) e coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso centrale e dell'occhio (Walther e Gruss 1991; Simeone et al.,1994; Acampora et al., 1995). I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza di *Otx2* negli embrioni di controllo in tutto il sistema nervoso e nella retina dai primi stadi dello sviluppo e questo dimostrerebbe la sua fondamentale funzione nel regolare lo sviluppo del sistema nervoso e la formazione dell'occhio. Questo è in accordo con la letteratura: infatti, topi mutanti *Otx2*^{-/-} risultano mancanti della regione anteriore del tubo neurale (mesencefalo ed encefalo anteriore) (Acampora et al., 1995) e mutazioni di questo gene causano microftalmia ed anoftalmia in molte specie di vertebrati, uomo compreso (Ragge et al., 2005).

I risultati ottenuti mediante Northern blot hanno dimostrato che negli embrioni trattati c'è un aumento dell'espressione dei geni *Pax 6 ed Otx2*. Le ibridazioni in situ hanno anche dimostrato che non cambia la localizzazione e la maggiore espressione dei messaggeri di *Otx2* e *Pax 6* è dovuta ad un'up regolazione di questi nelle zone dove esso è normalmente espresso, non ad una induzione in zone diverse.

I risultati hanno dimostrato che nei controlli ma anche negli embrioni trattati il messaggero per *Pax6* e la relativa proteina si esprimono secondo un pattern spazio-temporale: ad uno stadio precoce nel telencefalo, nel diencefalo e nel mesencefalo, successivamente nel telencefalo e diencefalo, e al momento della schiusa solo nell'ependima del telencefalo.

I risultati hanno anche dimostrato che *Pax-6* regola nella retina il differenziamento delle cellule e la loro organizzazione in strati. Questi dati concordano con quanto riportato in letteratura: *Pax6* sembra essere coinvolto a molteplici livelli in diversi processi come nell'induzione, nel controllo della mitosi e del differenziamento della retina (Hitchcock et al., 1996; Hirsch e Harris 1997).

Negli embrioni trattati l'aumento delle cellule in mitosi responsabili della formazione delle pliche del mesencefalo e della retina potrebbe essere spiegato dalla down regulation del gene *Fzr*, un gene che controlla il ciclo cellulare regolando l'attivazione del ciclosoma, un pathway della proteolisi cellulare mediato da ubiquitina. Diversi studi hanno infatti dimostrato che tale gene è up-regolato quando le cellule sono nella fase post-mitotica e che l'up regolazione è essenziale per il blocco della proliferazione cellulare in determinate fasi dello sviluppo embrionale (Sigrist e Lenher, 1997). La down regolazione di *Fzr* dimostrerebbe che il cadmio abbia effetti sull'attività cellulare. D'altra parte, in letteratura è riportato che il Cd esercita il suo effetto proliferativo interagendo con la proteina chinasi C, enzima noto per il suo ruolo nei meccanismi di crescita e differenziamento cellulare (Beyersmann et al., 1994). Si presuppone, infatti, che il cadmio si sostituisca allo zinco nel dominio regolatore della chinasi attivandola. Il cadmio agendo direttamente o indirettamente su *Fzr* impedirebbe il blocco della mitosi attivando la proliferazione. In particolare, nella retina il cadmio sembra agire sulle cellule della retina prossimale al cristallino. In questa regione, in condizioni normali, l'attività proliferativa è mantenuta fino a circa 20 giorni, mentre nella retina distale fino a 10 giorni. La riduzione delle cellule in proliferazione, prima nella retina distale e poi in quella prossimale, è associata alla stratificazione che inizia nella retina distale al cristallino, e alla presenza del messaggero di *Pax6* e alla relativa proteina.

Il dato che nella retina degli occhi trattati ma morfologicamente sani non ci sia un aumento delle cellule in mitosi conferma che le pliche sono una diretta conseguenza dell'aumento delle cellule in proliferazione. Questo escluderebbe l'ipotesi che la formazione delle pliche sia una conseguenza di squilibri osmotici che il cadmio potrebbe indurre, provocando il collassamento della retina. non si può escludere comunque che la proliferazione possa essere almeno in parte dovuta anche al fatto che con la formazione della plica una maggiore superficie della retina vada a contatto e/o si approssimi al cristallino, noto induttore della proliferazione. La formazione delle pliche nella retina e del tetto ottico, quindi, sono dovute perciò ad un effetto diretto del cadmio sull'attività proliferativa delle loro cellule.

In conclusione, i risultati hanno dimostrato che nonostante le alterazioni, l'organizzazione generale e l'impalcatura istologica e citologica degli organi è conservata e che le alterazioni sono indipendenti dal tipo di trattamento. Questi risultati indurrebbero a pensare che le alterazioni osservate possono essere associate all'azione del Cd sui geni funzionali e regolativi.

CAPITOLO 10: BIBLIOGRAFIA

- Acampora D, Gulisano M, Broccoli V, Simeone A, (2001) "Otx genes in brain morphogenesis" *Progress in Neurobiology* 64 69–95
- Acampora D, Gulisano M, Broccoli V, Simeone A, (2001) "Otx genes in brain morphogenesis" *Progress in Neurobiology* 64 69–95
- Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A and Brûlet P, (1995) "Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation" *Development* 121, 3279-3290.
- Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A and Brûlet P, (1995) "Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation" *Development* 121, 3279-3290.
- Achanzar WE, Achanzar KB, Lewis JG, Webber MM, Waalkes MP; 2000 "Cadmium induces c-myc, p53 and c-jun expression in normal prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis". *Toxicol Appl Pharmacol* 164: 201-300.
- Ahokas RA., Dilts PV. Jr. (1979) "Cadmium uptake by the rat embryo as a function of gestational age.", *Am J Obstet Gynecol.* 135(2):219-22.
- Alabi. (1985) "Interactive effects of organic and inorganic selenium with cadmium and mercury on spermatozoal oxygen consumption and motility in vitro".
- Ananthan J, Goldbery AL, Voellmy R; 1986. "Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes". *Science* 232: 191-197
- Andrews G.K. (1990) "Regulation of metallothionein gene expression". *Prog Food Nutr Sci*, 14, 193-258
- Andrews; (2000) "Regulation of metallothionein gene expression" *Biochem Pharmacol.* Jan 1;59(1):95-104
- Angerer LM, Kawczynski G, Wilkinson DG, Nemer M, Angerer RC "Spatial patterns of metallothionein mRNA expression in the sea urchin embryo". *Dev Biol.* 1986 Aug;116(2):543-7.
- Arnoult et al (2002) "Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli". *J Cell Biol* 159:923
- Au DW, Reunov AA, Wu RS; 2001. "Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium. Part II: Effects on sperm development". *Environ Pollut* 111 (1): 11-20.
- Bally-Cuif L, Gulisano M, Broccoli V, Boncinelli E. (1995) "c-otx2 is expressed in two different phases of gastrulation and is sensitive to retinoic acid treatment in chick embryo" *Mech Dev.* ;49(1-2):49-63
- Banerjee-Basu, A.D. Baxevanis, (2001) Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors, *Nucleic Acids Res.* 29 3258–3269.
- Baranski B. 1984 "Effect of exposure of pregnant rats to cadmium on prenatal and postnatal development of the young.", *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1984;29(3):253-62.
- Barlow SM, Sullivan FM. Reproductive hazards and industrial chemicals. *Ann Occup Hyg.* 1981;24(4):359-61
- Bauman JW, Liu J, Klaassen CD; 1993. "Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals". *Fundam Appl Toxicol* 21 (1): 15-22
- Baumgartner S, Bopp D, Burri M, Noll M. (1987) "Structure of two genes at the gooseberry locus related to the paired gene and their spatial expression during Drosophila embryogenesis". *Genes Dev.*;1(10):1247-67.

- Beach LR, Palmiter RD (1981) „Amplification of the metallothionein-I gene in cadmium-resistant mouse cell“*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Apr;78(4):2110-4
- Benters J, Schafer T, Beyersmann D, Hechtenberg S; 1996. “Agonist-stimulated calcium transients in PC12 cells are affected differentially by cadmium and nickel”. *Cell Calcium* 20 (5): 441-6.
- Beyersmann D., Block C., Malviya AN. 1994“Effect of cadmium on nuclear protein Kinase C.”, *Environ Health Perspect* 102, 177-180.
- Beyersmann D., Hechtenberg S. (1997)“Cadmium gene regulation and cellular signaling in mammalian cells.”, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144. 247-261.
- Biagioli M., Watjen W., Beyersmann D., Zoncu R., Cappellini C., Ragghianti M., Cremisi F., Bucci S. (2001) “Cadmium-induced apoptosis in murine fibroblast is suppressed by Bcl₂.” *Arch.Toxicol.* 75, 313-320.
- Braat AK, van de Water S, Korving J, Zivkovic D. A zebrafish vasa morphant abolishes vasa protein but does not affect the establishment of the germline.*Genesis*. 2001 Jul;30(3):183-5.
- Brama M, Gnessi L, Basciani S, Cerulli N, Politi L, Spera G, Mariani S, Cherubini S, Scotto d’Abusco A, Scandurra R and Migliaccio S (2007) “Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ER α -dependent mechanism” *Mol Cell Endocrinol.* 29;264(1-2):102-8.
- Brama M, Gnessi L, Basciani S, Cerulli N, Politi L, Spera G, Mariani S, Cherubini S, Scotto d’Abusco A, Scandurra R and Migliaccio S (2007) “Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ER α -dependent mechanism” *Mol Cell Endocrinol.* 29;264(1-2):102-8.
- Brandeis M and Hunt T, (1996) The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J.* 1; 15(19): 5280–5289.
- Brasfield SM., Bradhaam K., Wells JB., Talent LG., Lanno RP., Janz DM., (2004),”Development of a terrestrial vertebrate model for assessing bioavailability of cadmium in the fence lizard (*Sceloporus indulatus*) and in ovo effects on hatchling size and thyroid function.” *Chemosphere.*54 (11): 1643-51
- Brown V, Shurben D, Miller W, Crane M; (1994). “Cadmium toxicity to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum and brown trout *Salmo trutta* L. over extended exposure periods”. *Ecotoxicol Environ Saf* 29 (1): 38-46.
- Burglin T.R., A comprehensive classification of homeobox genes, “1994”, in: D. Duboule (Ed.) *A Guidebook for Homeobox Genes*, pp. 25–71.
- Calevro F, Beyersmann D, Hartwig A; (1998). “Effect of cadmium(II) on the extent of oxidative DNA damage in primary brain cell cultures from *Pleurodeles* larvae”. *Toxicol Lett* 94 (3): 217-25.
- Carginale V, Scudiero R, Capasso C, Capasso A, Kille P, diPrisco G, Parisi E. “Cadmium-induced differential accumulation of metallothionein isoforms in the Antarctic icefish, which exhibits no basal metallothionein protein but high endogenous mRNA levels”. *Biochem J.* 1998 332:475-81.
- Casalino E, Calzaretti G, Sblano C, Landriscina C; (2002). “Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium”. *Toxicology* 179 (1-2): 37-50.
- Cesen et al(1998) *Carcinogenesis* 19:61-67
- Chan PK e Cheng SH; (2003). “Cadmium-induced ectopic apoptosis in zebrafish embryos”. *Arch Toxicol* 77 (2): 69-79.
- Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P; (1999). “Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway”. *Curr Biol.* 9(17): 967-70.
- Chen B e Hales BF; (1994). “Cadmium-induced rat embryotoxicity in vitro is associated with an increased abundance of E-cadherin protein in the yolk sac”. *Toxicol Appl Pharmacol* 128 (2): 293-301.

- Cheng SH, Wai AWK, So CH, Wu RSS; (2000). "Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos". *Environ Toxicol Chem* 19: 3024-3031.
- Cherian MG. "The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells". *Environ Health Perspect.* 1994 3:131-5.
- Chin TA e Templeton DM; (1993). "Protective elevations of glutathione and metallothionein in cadmium-exposed mesangial cells". *Toxicology* 77 (1-2): 145-56.
- Chisholm AD, Horvitz HR.1995 Patterning of the *Caenorhabditis elegans* head region by the Pax-6 family member vab-3. *Nature.* 1995;377(6544):52-5
- Choudhuri S, McKim JM Jr, Klaassen CD; (1992)." Role of hepatic lysosomes in the degradation of metallothionein". *Toxicol Appl Pharmacol.* 115:64-71
- Cohen e Jürgens, (2000) Distal-less function during *Drosophila* appendage and sense organ development. *Panganiban G.Dev Dyn.* 218(4):554-62
- Congiu AM, Calendi E, Ugazio G;(1984), "Effects of metal ions and CCl₄ on sea urchin embryo (*Paracentrotus lividus*).", *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 43(2):317-23
- Cousins RJ; (1985)."Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and metallothionein". *Physiol Rev.* (2):238-309
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. (2002)"Metallothionein: the multipurpose protein". *Cell Mol Life Sci.* Apr;59(4):627-47.
- Craig, A, Hare L, Tessier, A (1999) "Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri*" *Aquat Toxicol* 44: 255-262 Craig et al (1999) *Aquatic toxicology* 44 :255-262
- Curtis et al (1996) "Res Subacute exposure to cadmium chloride induces HSP-72 in rat liver" *Commun Mol Pathol Pharmacol* 94:221
- Cvekl A., e Piatigorsky J. (1996) Lens development and crystallin gene expression: many roles for Pax-6. *Bioessays* 18(8):621-30.
- Dally H e Hartwig A; (1997). "Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells". *Carcinogenesis* 18(5):1021-6.
- Danielsson B, Alberg H.; (1995)."The public view on cardiovascular risk factors and changes in lifestyle". *Scand J Prim Health Care.* Mar;13(1):74-80.
- Davis JA, Reed RR (1996). Role of Olf-1 and Pax-6 transcription factors in neurodevelopment. *J Neurosci*;16:5082-94.
- Dixon RL. (1979) "Role of epidemiology in toxicology. Concluding remarks". *Fed Premark.* *Fedroc.* 1979 Apr;38(5):1897-8.
- Dolle P, Izpisua-Belmonte JC, Boncinelli E, Duboule D (1991) "The Hox-4.8 gene is localized at the 5' extremity of the Hox-4 complex and is expressed in the most posterior parts of the body during development" *Mech Dev.*36(1-2):3-13.
- Dorsky RI, Rapaport DH, Harris WA (1995) "Xotch inhibits cell differentiation in the *Xenopus* retina". *Neuron.*14(3):487-96
- Duboule D. (1992) "The vertebrate limb: a model system to study the Hox/HOM gene network during development and evolution". *Bioessays*; 14(6):375-84.
- Dwivedi C.(1983) "Cadmium-induced sterility: possible involvement of the cholinergic system" *Toxicol* 12:151-6
- Ercal N, Gurer-Orhan , Aykin-Burns N; (2001). "Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage". *Curr Top Med Chem.* 1(6): 529-39
- Fabisiak J.P., Tyurin V. A., Tyurina Y. Y. (1999) "Redox regulation of copper-metallothionein". *Arch. Biochem.Biophys.* 1;363, 171-81
- Fang MZ, Mar W, Cho MH. (2002) "Cadmium affects genes involved in growth regulation during two-stage transformation of Balb/3T3 cells". *Toxicology* ;177(2-3):253-65

- Fernandez EL, Svenson C, Dencker L, Gustafson AL (2004) "Disturbing endoderm signaling to anterior neural plate of vertebrates by the teratogen cadmium". *Reprod Toxicol.*;18(5):653-60.
- Fernandez EL, Svenson C, Dencker L, Gustafson AL (2004) "Disturbing endoderm signaling to anterior neural plate of vertebrates by the teratogen cadmium". *Reprod Toxicol.*;18(5):653-60.
- Fernandez EL., Gustafson AL, Andersson M, Hellman B, Dencker L. (2003) "Cadmium-induced changes in apoptotic gene expression levels and DNA damage in mouse embryos are blocked by zinc.", *Toxicol Sci.*; 76(1):162-70
- Fernandez EL., Gustafson AL, Andersson M, Hellman B, Dencker L. (2003), "Cadmium-induced changes in apoptotic gene expression levels and DNA damage in mouse embryos are blocked by zinc.", *Toxicol Sci.*; 76(1):162
- Finkelstein e Boncinelli E, (1994) "From fly head to mammalian forebrain: the story of otd and Otx" *Trends Genet.*;10(9):310-5. R ;
- Finkelstein R, Perrimon (1991) "The molecular genetics of head development in *Drosophila melanogaster*". *N.Development.* Aug;112(4):899-912
- Fischer AJ, Reh TA, (2000). "Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens" *Dev Biol.* 15;220(2):197-210
- Flament S., Kuntz S., Chesnel A., Grillier-Vuissoz I., Tankozic C., Penrad-Mobayed M., Auque G., Shirali P., Schroeder H., Chardard D. (2003). "Effect of cadmium on gonadogenesis and metamorphosis in *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian).", *Aquat Toxicol.* 64(2):143-53
- Foran CM, Peterson BN, Benson WH. (2002)"Influence of parental and developmental cadmium exposure on endocrine and reproductive function in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* Nov;133(3)
- Foran, J.M., Norton, A.J., Micallef, I.N.M., Taussig, D.C., Amess, J.A.L., Rohatiner, A.Z.S. & Lister, T.A. (2001) "Loss of CD20 expression following treatment with rituximab (chimaeric monoclonal anti-CD20): a retrospective cohort analysis". *British Journal of Haematology*, 114, 881–883.
- Frenkel K, Karkoszka J, Cohen B, Baranski B, Jakubowski M, Cosma G, Taioli E, Toniolo P; (1994). "Occupational exposures to Cd, Ni, and Cr modulate titers of autoantibodies". *Environ Health Perspect.* 102 Suppl 3:221-5
- Gachot B e Poujeol P; (1992). "Effects of cadmium and copper on zinc transport kinetics by isolated renal proximal cells". *Biol Trace Elem Res* 35 (2): 93-103.
- Galliot B., Vargas C., Miller D,(1999) "Evolution of homeobox genes: Q50 paired-like genes founded the paired class" *Dev. Genes Evol.*209 186–197.
- Garcia ME, Cappelletti CA, Salibian A. "Sublethal maternal pre-exposure of fish to cadmium. Effect on the survival of the newly hatched alevins". *Arch Physiol Biochem.* 1999 Apr;107(2):152-8
- Garcia-Fernandez J., Holland P.W.H.(1994) "Archetypal organization of the amphioxus *Hox* gene cluster" *Nature* 370 63–566.
- Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu H-J, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW (2002) "Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor α ". *Cell* 110:763–773
- Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G; (2001). "Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death". *Biochem Biophys Res Commun* 2001. 286 (3): 433-42
- Gaubin Y, Vaissade F, Croute F, Beau B, Soleilhavoup J, Murat J; (2000). "Implication of free radicals and glutathione in the mechanism of cadmium-induced expression of stress proteins in the A549 human lung cell-line". *Biochim Biophys Acta.*1495(1): 4-13.

- Gehring WJ. (1996) "The master control gene for morphogenesis and evolution at the eye". *Genes Cells*;1:11–15.
- Ghosh, S. and P. Thomas. (1995) . "Antagonistic effects of xenobiotics on steroid-induced final maturation of Atlantic croaker oocytes in vitro". *Mar. Environ. Res.* 39:159-163
- Gill TS., Epple A. (1992). "Impact of cadmium on the mummichog *Fundulus heteroclitus* and the role of calcium in suppressing heavy metal toxicity.", *Comp Biochem Physiol C.* 101(3):519-23.
- Glaser RL, Spradling AC. (1994) „Unusual properties of genomic DNA molecules spanning the euchromatic-heterochromatic junction of a *Drosophila* minichromosome". *Nucleic Acids Res.* 1994 Nov 25;22(23):5068-75
- Glaser T, Lane J, Housman D (1990) „A mouse model of the aniridia-Wilms tumor deletion syndrome" *Science.* 9;250(4982):823-7.
- Gleichmann et al (2000) "Insulin-like growth factor-1-mediated protection from neuronal apoptosis is linked to phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD but not to inhibition of cytochrome c translocation in rat cerebellar neurons" *Neurosci Lett.* 2000 Mar 17;282(1-2):69-72.
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991) "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway". *Nature.* Jan 10;349(6305):132-8.
- Goering PL, Klaassen CD. (1984b) "Zinc-induced tolerance to cadmium epatotoxicity". *Toxicol Appl Pharmacol.* 74:299-307.
- Gomot A. (1998), "Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring." *Ecotoxicol Environ Saf.* 41(3):288-97.
- Goulding M, Sterrer S, Fleming J, Balling R, Nadeau J, Moore KJ, Brown SD, Steel KP, Gruss P (1993) ."Analysis of the Pax-3 gene in the mouse mutant splotch". *Genomics.*17(2):355-63
- Green DR, Reed JC. (1998) "Mitochondria and apoptosis" . *Science.* Aug 28;281(5381):1309-12.
- Guidice et al (1999) "Develop Growth Diff Studies on heat shock proteins in sea urchin development". *Dev Growth Differ.* 1999 (4):375-80. Review.
- Guillou M, Ouiniou F, Huart B, Pagano G; (2000). "Comparision of embryonic development and metal contamination in several populations of the sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck) exposed to anthropogenic pollution". *Arch Environ Contam Toxicol.* 39 (3): 337-44.
- Guthrie SC, Gilula NB; (1989). "Gap junctional communication and development". *Trends Neurosci.* 12(1): 12-6.
- Guyen, DePomerai DI (1995) "Calcium moderation of cadmium stress explored using a stress-inducible transgenic strain of *Caenorhabditis elegans*" *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1995 Jan;110(1):61-70.
- Habeebu et al (2000) "Toxicol.Sci Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium" *Toxicol Sci.* 2000 May;55(1):223-32.
- Halder G, Callaerts P, Flister S,(1998). "Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during *Drosophila* compound eye development". *Development*; 125:2181–91.
- Halder G, Callaerts P, Gehring WJ, (1995)"New perspectives on eye evolution". *Curr Opin Genet Dev.* 5(5):602-9.
- Hamer DH. (1986) "Metallothionein". *Annu Rev Biochem.*;55:913-51
- Hanna LA, Peters JM, Wiley LM, Clegg MS, Kenn CL; (1997). "Comparative effects of essential and nonessential metals on preimplantation mouse embryo development in vitro". *Toxicology.* 116(1-3): 123-31.

- Hart BA, Lee CH, Shukla GS, Shukla A, Osier M, Eneman JD, Chiu JF; (1999). "Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress". *Toxicology*. 133(1): 43-58.
- Hartwing A. (1994). "Role of DNA repair inhibition in lead and cadmium induced genotoxicity: a review". *Environ Health Perspect*. 102 Suppl 3:45-50.
- Hassoun EA, e Stohs SJ; (1996). "Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures". *Toxicology* 112 (3): 219-26.
- Herkovits J, Perez-Coll CS. (1990) Zinc protection against delayed development produced by cadmium". *Biol Trace Elem Res*. Mar;24(3):217-21
- Hershko A, Ganoth D, Pehrson J, Palazzo RE, Cohen LH (1991) "Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts". *J Biol Chem*.266(25):16376-9.
- Heuchel R., Radtke F., Georgiev O., Stark G., Aguet M., Schaffner W. (1994). "The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression". *EMBO J*, 13:2870-2875
- Hever AM, Williamson KA, van Heyningen V . (2006). "Developmental malformations of the eye: the role of PAX6, SOX2 and OTX2". *Clin Genet*. 2006 Jun;69(6):459-70
- Higtower IE; (2000). "Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity". *Cell* 66, 191-197.
- Hill RE, Hanson IM, (1992) "Molecular genetics of the Pax gene family". *Curr Opin Cell Biol*. 1992 Dec;4(6):967-72
- Hirsch N, Harris WA. (1997). "Xenopus Pax-6 and retinal development". *J Neurobiol*;32:45-61.
- Hitchcock PF, Macdonald RE, VanDeRyt JT, (1996). "Antibodies against PAX6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of the goldfish". *J Neurobiol*;29:399-413.
- Hitchcock PF, Macdonald RE, VanDeRyt JT, *et al.* (1996) "Antibodies against PAX6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of the goldfish" *J Neurobiol*;29:399-413.
- Hockenbery et al (1993) "Cell Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis". *Cell*. 75(2):241-51.
- Hoffmann L, Putzke HP, Bendel L, Erdmann T, Huckstorf C; (1988). "Electron microscopic results on the ventral prostate of the rat after CdCl₂ administration. A contribution towards etiology of the cancer of the prostate". *J Cancer Res Clin Oncol* 114 (3): 273-8.
- Holloway WR, Collier FM, Herbst RE, Hodge JM, Nicholson GC. (1996). "Osteoblast-mediated effects of zinc on isolated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and enhancement of osteoclast number."
- Holst N, Kierulf KH, Seppälä M, Koistinen R, Jacobsen MB (1997) "Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 and progesterone secretion from human granulosa-luteal cells: effects of octreotide and insulin". *Fertil Steril*;68(3):478-82.
- Holt, C. E., Bertsch, T. W., Ellis, H. (1988). "Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth". *Neuron* 1:15-26.
- Hunt WP, Gore RS, Miller KJ (1991) 'Diglyceride Kinase Activity in Cell Extracts of *Rhizobium meliloti*: Evidence for a Diglyceride Cycle during Cyclic beta-1,2-Glucan Biosynthesis" *Appl Environ Microbiol*. Dec;57(12):3645-3647.
- Isani G, Andreani G, Kindt M, Carpenè E. (2000) "Metallothioneins (MTs) in marine molluscs". *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 46(2):311-30.
- Ishido et al (1999) "Cadmium-bound metallothionein induces apoptosis in rat kidneys, but not in cultured kidney LLC-PK1 cells". *Life Sci*. 1999;64(9):797-804.

- Izpisua-Belmonte JC, Falkenstein H, Dollé P, Renucci A, Duboule D.(1991). « Murine genes related to the Drosophila AbdB homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body”.EMBO J. 1991
- Jacob C, Maret W, Vallee BL; (1998). “Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins”. Proc Natl Acad Sci USA 95 (7): 3489-94.
- Jacob C, Maret W, Vallee BL; (1998). “Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins” Proc Natl Acad Sci USA 95 (7): 3489-94.
- Jahroudi N, Foster R, Price-Haughey J, Beitel G, Gedamu “1990” L.”Cell-type specific and differential regulation of the human metallothionein genes. Correlation with DNA methylation and chromatin structure”. J Biol Chem. 265:6506-11.
- Järup L., Alfvén T., Persson B., Toss G., Elinder C (1998) “Cadmium may be a risk factor for osteoporosis” Occup Environ Med; 55:435–439.
- Järup L., Alfvén T., Persson B., Toss G., Elinder C (1998) “Cadmium may be a risk factor for osteoporosis” Occup Environ Med; 55:435–439.
- Jarup L., Bellander T., Hogstedt C., Spang G. (1998) "Mortality and cancer incidence in Swedish battery workers exposed to cadmium and nickel"Environ Med. 55(11): 755–759.
- Jarup L., Bellander T., Hogstedt C., Spang G. (1998) "Mortality and cancer incidence in Swedish battery workers exposed to cadmium and nickel"Environ Med. 55(11): 755–759.
- Jeong SH, Abeebu SS, Klassen CD; (2000). “Cadmium decreases gap junctional intercellular communication in mouse liver”. Toxicol Sci. 57(1): 156-66
- Jiang LJ, Maret W, Vallee BL. “The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zincdepleted sorbitol dehydrogenase”. Proc Natl Acad Sci U S A.1998 95:3483-8.
- Jin P Ringertz NR; (1990). “Cadmium induces transcription of proto-oncogenes c-jun and c-myc in rat L6 myoblast”. J Biol Chem 265(24): 14061-4
- Kägi J.H.R., Vallee B.L. (1960) “Metallothionein: a cadmiumandzinc-containing protein from equine renal cortex”. J Biol Chem., 235, 3460-3465
- Kagi JH; (1991). “Overview of metallothionein”. Methods Enzymol 205: 613-26.
- Kallio M, Weinstein J, Daum JR, Burke DJ, Gorbsky GJ “Mammalian p53CDC mediates association of the spindle checkpoint protein Mad2 with the cyclosome/anaphase-promoting complex, and is involved in regulating anaphase onset and late mitotic events”. J Cell Biol. 1998 Jun 15;141(6):1393-406
- Kammenga et al (1998) “HSP60 as a potential biomarker of toxic stress in the nematode plectus acuminatus” Arch Environ Contam Toxicol 34:253
- Kappen C, Schughart K, Ruddle FH.(1989).”Two steps in the evolution of Antennapedia-class vertebrate homeobox genes”.Proc Natl Acad Sci U S A.;86(14):5459-63
- Karch F, Weiffenbach B, Peifer M, Bender W, Duncan I, Celniker S, Crosby M, Lewis EB. (1985) “The abdominal region of the bithorax complex”Cell. Nov;43(1):81-96
- Karin M, Richards RI. (1984) “The human metallothionein genefamily: structure and expression”. Environ Health Perspect.1984 54:111-5.
- Kato K, Ito H, Iwamoto I, Lida K, Inaguma Y; (2001). “Protein kinase inhibitors can suppress stress-induced dissociation of Hsp27”. Cell Stress Chaperones. 6(1): 16-20.
- Kawakami A, Kimura-Kawakami M, Nomura T, et al. (1997) “Distributions of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases at chick brain”
- Kertesz V, Fancsi T. (2003), “Adverse effects of (surface water pollutants) Cd, Cr and Pb on the embryogenesis of the mallard” . Aqua Toxicol. Dec 10;65(4):425-33.
- Kim, MS., BJ., Woo, NH., Kim, KW., Kim, KB., Kim, IK., Jung, YK. (2000) “Cadmium induces caspase-mediated cell death: suppression by Bcl-2.”, Toxicology 145, 27-37.

- Kiss T, Osipenko ON; (1994). "Toxic effects of heavy metals on ionic channels". *Pharmacol Rev.* 46 (3): 245-67.
- Klaassen CD, Liu J. (1998) "Induction of metallothionein as an adaptive mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury". *Environ Health Perspect.* Feb;106 Suppl 1:297-300. Review.
- Kojima Y, Hunziker P;E "1991" "Amino acid analysis of metallothionein". *Methods Enzymol.*;205:419-21.
- Kondoh M., Araragi S., Sato K., Hagashimoto M., Takiguchi M., Sato M. (2002). "Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells.", *Toxicology* 170(1-2): 111-7.
- Konecki J, Blazejowski J, Slowinski J, Helewski K. "Influence of chronic cadmium exposure during pregnancy on DNA synthesis in different organs of rat offspring". *Med Sci Monit.* 2000 Nov-Dec;6(6):1077-81
- Krumlauf, R. (1994). "*Hox* genes in vertebrate development". *Cell* 78, 191-201.
- Kultima K., Fernández L., Scholz B., Gustafson^b A., Dencker L, Stigson M. 2006 "Cadmium-induced gene expression changes in the mouse embryo, and the influence of pretreatment with zinc" *Repr. Tox* 22,(Issue 4) : 636-646.
- Kummer et al (1997) "Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase". *J Biol Chem.* 15;272(33):20490-4.
- Lappin TR, Grier DG, Thompson A, Halliday HL. (2006). "HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms" *Ulster Med J.*;75(1):23-31. Review. Erratum in: *Ulster Med J.*;75(2):135.
- Laskey JW, Berman E, Ferrell JM. 1995. "The use of cultured ovarian fragments to assess toxicant alterations in steroidogenesis in the Sprague-Dawley rat". *Reprod Toxicol* 9:131-141
- Layton WM Jr, Layton MW; (1979)."Cadmium induced limb defects in mice: strain associated differences in sensitivity". *Teratology.* 19(2):229-35
- Lazo JS, Kondo Y, Dellapiazza D, Michalska AE, Choo KH, Pitt BR. (1995) "Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes". *J Biol Chem.* 270:5506-10.
- Leber AP, Miya TS.; (1976) "A mechanism for cadmium- and zinc-induced tolerance to cadmium toxicity: involvement of metallothionein" *Toxicol Appl Pharmacol.* 37(3):403-14
- Leroyer A, Hemon D, Nisse C, Auque G, Mazzuca M, Haguenoer JM; (2001). "Determinants of cadmium burden levels in a population of children living in the vicinity of nonferrous smelters". *Environ Res* 87 (3): 147-59.
- Leroyer A, Hemon D, Nisse C, Auque G, Mazzuca M, Haguenoer JM; (2001). "Determinants of cadmium burden levels in a population of children living in the vicinity of nonferrous smelters". *Environ Res* 87 (3): 147-59
- Lewin B. (2000) "Homeodomains bind related targets in DNA". In *Genes VII.* 660-62.
- Lewis EB (1978) "A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*". *Nature.* Dec 7;276(5688):565-70
- Liao X, Lee G., Shimizu H, Collins M. (2007) "Comparative molecular pathology of cadmium- and all-trans-retinoic acid-induced postaxial forelimb ectrodactyly" *Toxicology and Applied Pharmacology* 225 47–60.
- Liao X, Lee G., Shimizu H, Collins M. "Comparative molecular pathology of cadmium- and all-trans-retinoic acid-induced postaxial forelimb ectrodactyly" *Toxicology and Applied Pharmacology* 225 (2007) 47–60.
- Linde AR, Klein D, Summer KH. (2005). "Phenomenon of hepatic overload of copper in *Mugil cephalus*: role of metallothionein and patterns of copper cellular distribution."

- Lorca T, Castro A, Martinez AM, Vigneron S, Morin N, Sigrist S, Lehner C, Dorée M, Labbé JC (1998) "Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in *Xenopus* egg extracts" *EMBO J.* 17, 3565-3575
- Lyon TD, Aughey E, Scott R, Fell GS; (1999). "Cadmium concentrations in human kidney in the UK: 1978-1993". *J Environ Monit.* 1(3): 227-31.
- Maret W, Vallee BL. (1998) "Ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters". *Proc Natl Acad Sci US A.* 95:3478-82.
- Maret W; (2000). "The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state". *J Nutr* 130 (5S Suppl): 1455S-8S.
- Margoshes M, Vallee BL (1957) "A cadmium binding protein from equine kidney cortex". *J Am Chem Soc.*, 79, 4813-4814
- Marimoto RI; (1993). "Cell in stress: transcriptional activation of at schok genes". *Science* 259: 1409-1410.
- Martin Mateo MC, Martin B, Santos Beneit M, Rabadan J. (1997) "Catalase activity in erythrocytes from colon and gastric cancer patients. Influence of nickel, lead, mercury, and cadmium" *Biol Trace Elem Res.* 57(1):79-90
- Martínez-Morales JR, Dolez V, Rodrigo I, Zaccarini R, Leconte L, Bovolenta P, Saule S. (2003) "OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation" *J Biol Chem.* 2003 Jun 13;278(24):21721-31. Epub Mar 27
- Matsumoto 1997 "A fission yeast homolog of CDC20/p55CDC/Fizzy is required for recovery from DNA damage and genetically interacts with p34cdc2". *Mol.Cell. Biol.* 17,742-750
- Matsuo, Kuratani S., Rimura C., Takeda and Aizawa, (1995) . "Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rosrta head". *Genes Dev.* 9: 2646-2658 Matsuo, 1993
- McAleer MF, Tuan RS. "Metallothionein overexpression in human trophoblastic cells protects against cadmium-induced apoptosis". *In Vitro Mol Toxicol.* 2001 14:25-42.
- McGinnis W, Hart CP, Gehring WJ, Ruddle FH.1984; "Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*" *Cell.* 1984 Oct
- McLachlan JA, Newbold RR, Burow ME (2001) . "From malformations to molecular mechanisms in the male: three decades of research on endocrine disrupters". *APMIS.*;109(4):263-72
- Meinelt T., Playle RC., Pietrock M., Burnison BK., Wienke A., Steinberg CE. (2001), "Interaction of cadmium toxicity in embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*) with calcium and humic substances.", *Aquat Toxicol*; 54(3-4):205-15.
- Misra U.K., Gawdi G., Akabani G., Pizzo S.V. (2002), "Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal trasduction mechanisms.", *Cell Signal.* 14, 327-340
- Morgan D. et al., (1999) Regulation of the APC and the exit from mitosis.
- Morgan DO. *Nat.Cell biol.* 1,E47-E53
- Mounaji K, Erraiss NE, Wegnez M. (2002). "Identification of metaflthionein in *Pleurodeles waltl.*"
- Mueller et al (1998) "Environ Health Persp New approaches for detecting thresholds of human nephrotoxicity using cadmium as an example" *Environ Health Perspect.*;106(5):227-30.
- Nakagawa et al (2000) "Nature Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta" *Nature* 403(6765):98-103.
- Nath R, Prasad R, Palinal VK, Chopra RK. « Molecular basis of cadmium toxicity". *Prog Food Nutr Sci.* 1984 8:109-63.
- Nayak BN, Ray M, Persaud TV, Nigli M. "Embryotoxicity and in vivo cytogenetic changes following maternal exposure to cadmium chloride in mice". *Exp Pathol.* 1989;36(2):75-80

- Nishina S., Kohsaka S., Yamaguchi Y., Handa H., Atsushi Br (1999). "PAX6 expression in the developing human eye" *J. Ophthalmol.* 1999;83:723-27
- Nordberg GF, Jin T, Nordberg M; (1994). "Subcellular targets of cadmium nephrotoxicity: cadmium binding to renal membrane proteins in animals with or without protective metallothionein synthesis". *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3: 191-4.
- Nordberg GF, Jin T, Nordberg M; (1994). "Subcellular targets of cadmium nephrotoxicity: cadmium binding to renal membrane proteins in animals with or without protective metallothionein synthesis". *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3: 191-4.
- Oberdorster G; (1986). "Airborne cadmium and carcinogenesis of the respiratory tract". *Scand J Work Environ Health* 12 (6): 523-3
- Oberhammer FA, Payelka M, Sharma S, Tiefenbacher R, Purchio AF, Bursch W, Schutle-Hermann R; (1992). "Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1". *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(12):5408-12
- Ohnuma S, Harris WA (2003) "Neurogenesis and the cell cycle". *Neuron.* 9;40(2):199-208
- Oskarsson A, Palminger Hallen I, Sundberg J, Petersson GraweK (1998). "Risk assessment in relation to neonatal metal exposure". *Analyst* 123:19-23.
- Padmanabhan R, Al-Menhali NM, Ahmed I, Kataya HH, Ayoub MA. (2005). "Histological, histochemical and electron microscopic changes of the placenta induced by maternal exposure to hyperthermia in the rat." *Int J Hyperthermia.*; 21(1):29-44.
- Paksy K, Rajczy K, Forgacs Z, Lazar P, Bernard A, Gati I, Kaali GS; (1997). "Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells". *J Appl Toxicol* 17 (5): 321-7.
- Palmiter RD; (1998). "The elusive function of metallothioneins". *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (15): 8428-30.
- Palmiter RD; (1998). "The elusive function of metallothioneins". *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (15): 8428-30.
- Pannese, M., Polo, C., Andreazzoli, M., Vignali, R., Kablar, B., Barsacchi, G. and Boncinelli, E. (1995). "The *Xenopus* homologue of *Otx2* is a maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions" *.Development* 121, 707-720
- Papaconstantinou AD, Brown KM, Noren BT, McAlister T, Fisher BR, Goering PL; (2003). "Mercury, cadmium, and arsenite enhance heat shock protein synthesis in chick embryos prior to embryotoxicity". *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 68 (6): 456-64.
- Pauwels M, van Weyenbergh J, Soumillion A, Proost P, De Ley M. "1994" "Induction by zinc of specific metallothionein isoforms in human monocytes". *Eur J Biochem.* 220:105-10.
- Pearson CA., Lamar PC., Prozialeck WC. (2003), "Effects of cadmium on E-cadherin and VE-cadherin in house lung." *Life sci.* 31; 72 (11): 1303-20
- Penkowa M, Nielsen H, Hidalgo J, Bernth N, Moos T. (1999) "Distribution of metallothionein I + II and vesicular zinc in the developing central nervous system: correlative study in the rat". *J Comp Neurol.* 412:303-18.
- Perez-Coll CS., Herkovits J., Salibian A. (1985), "Effects of cadmium on the development of an amphibian", *Arch Biol Med Exp (Santiago).* 18(1):33-9
- Perez-Coll CS., Herkovits J., Salibian A. (1986), "Teratogenic effects of cadmium on *Bufo arenarum* during gastrulation." *Experientia.* 42(10):1174-6.
- Piasek, M., and Laskey, J. W. (1994). "Acute cadmium exposure and ovarian steroidogenesis in cycling and pregnant rats". *Reprod. Toxicol.* 8, 495-507
- Plowman MC, Grbac-Ivankovic S, Martin J, Hopfer SM, Sunderman FW Jr (1994). "Malformations persist after metamorphosis of *Xenopus laevis* tadpoles exposed to Ni²⁺, Co²⁺, or Cd²⁺ in FETAX assays". *Teratog Carcinog Mutagen.* 14(3):135-44

- Pourahmad J e O'Brien PJ; (2000). "A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺". *Toxicology* 143 (3): 263-73.
- Prasad AR, Datta K. (1984) "Altered regulation of hepatic heme metabolism in cadmium exposed chick embryo". *Biochem Int. Feb*; 8(2):289-98
- Proskuryakov Sy, Konoplyannikov AG, Gabai VL; (2003). "Necrosis: a specific form of programmed cell death?". *Exp Cell Res.* 283(1): 1-16
- Quaife C.J., Findley S.D., Erickson J.C., Froelick G.J., Kelly E.J., Zambrowicz BP., Palmiter RD. (1994) "Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia". *Biochemistry*, 33, 7250-7259
- Ragge NK, Brown AG, Poloschek CM, Lorenz B, Henderson RA, Clarke MP, Russell-Eggitt I, Fielder A, Gerrelli D, Martinez-Barbera JP, Ruddle P, Hurst J, Collin JR, Salt A, Cooper ST, Thompson PJ, Sisodiya SM, Williamson KA, Fitzpatrick DR, van Heyningen V, Hanson IM. (2005) "Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations". *Am J Hum Genet.* 2005 Jun;76(6):1008-22.
- Regulski M, Harding K, Kostriken R, Karch F, Levine M, Mc Ginnis W (1985) „Homeo box genes of the Antennapedia and bithorax complexes of *Drosophila*". *Cell.* Nov;43(1):71-8
- Rie MT, Lendas, KA, Callard, IP (2001) "Cadmium: tissue distribution and binding protein induction in the painted turtle, *Chrysemys picta*" *Comp Biochem Physiol C* 130: 41-51
- Riggio M, Trinchella F, Filosa S, Parisi E, Scudiero R. (2003) "Accumulation of zinc, copper, and metallothionein mRNA in lizard ovary proceeds without a concomitant increase in metallothionein content". *Mol Reprod Dev.* Dec;66(4):374-82.
- Riggio M., Filosa S., Parisi E., Scudiero R. (2003), "Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish)". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 135(2):191-6. Robertson, Orrenius (2000) *Crit Rev Toxicol* 30:609
- Robertson JD, Orrenius S; (2000). "Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals". *Crit Rev Toxicol.*30(5): 609-27
- Roccheri MC, Agnello M, Bonaventura R, Matranga V; (2004). "Cadmium induces the expression of specific stress proteins in sea urchin embryos". *Biochem Biophys Res Commun* 321 (1): 80-7.
- Rosbash M, Ford PJ, Bishop JO, (1974) "Analysis of the C-value paradox by molecular hybridization" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71(9):3746-50.
- Rotchell JM, Ulnal E, Van Beneden RJ, Ostrander GK. *Mar Biotechnol* (NY). 2001 "Retinoblastoma gene mutations in chemically induced liver tumor samples of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)". *Jun* ;3(Supplement 1):S44-9
- Rubenstein JL, Martinez S, Shimamura K, Puellas L. Rubenstein et al., (1994) "The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model". *Science.* 266(5185):578-80
- Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. (1991) "The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity". *J Biol Chem.* 266:11632-9.
- Ryan JA, Hightower LE."Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology". *EXS.* 1996;77:411-24.
- Salvatori F., Talassi CB., Salzgeber SA., Spinosa HS., Bernardi MM. (2004). "Embryotoxic and long-term effects of cadmium exposure during embryogenesis in rats.", *Neurotoxicol Teratol.*; 26(5):673-80.
- Samali, Cotter TG (1996) "Heat shock proteins increase resistance to apoptosis". *Exp Cell Res.* 1996 Feb 25;223(1):163-7

- Samson SL, Gedamu L. (1998) "Molecular analyses of metallothionein gene regulation". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*;59:257-88.
- Sánchez-Herrero E, Vernós I, Marco R, Morata G (1985) "Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex." *Nature*. Jan 10-18;313(5998):108-13.
- Sánchez-Herrero E, Vernós I, Marco R, Morata G.(1985) "Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex" *Nature*.10-18;313(5998):108-13
- Sanglang, G.B. and O'Halloran, M.J., "Adverse effects of cadmium on Brook trout testis and on in vitro testicular androgen synthesis", *Biol. Reprod.* (1973): 9, 394
- Santovito G, Irato P, (2002). "Metal interaction and regulation of *Tetrahymena pigmentosa* metallothionein genes". Piccinni E.
- Sato M, Kondoh M; (2002). "Recent studies on metallothionein. Protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals". *Tohoku J Exp. Med* 196(1): 9-22.
- Sato M, Sasaki M, Hojo H. (1995) "Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6". *Arch Biochem Biophys.* 316:738-44.
- Schierwater, (2004) "The *Trox-2 Hox/ParaHox* gene of *Trichoplax* (Placozoa) marks an epithelial boundary" *Dev. Genes Evol.* 214 (2004)170-175
- Schilderman PA, Moonen EJ, Kempkers P, Kleinjans JC; (1997). "Bioavailability of soil-adsorbed cadmium in orally exposed male rats". *Environ Health Perspect* 105 (2): 234-8.
- Schilderman PA, Moonen EJ, Kempkers P, Kleinjans JC; (1997). "Bioavailability of soil-adsorbed cadmium in orally exposed male rats". *Environ Health Perspect* 105 (2): 234-8.
- Schroder HC, Hassanein HM, Lauenroth S, Koziol C, Mohamed TA, Lacorn M, Steinhart H, Batel R, Muller WE; (1999). "Induction of DNA strand breaks and expression of HSP70 and GRP78 homolog by cadmium in the marine sponge *Suberites domuncula*". *Arch Environ Contam Toxicol* 36(1): 47-55
- Scott MP, Weiner AJ (1984) "Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the *Antennapedia*, *Ultrabithorax*, and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(13):4115-9.
- Scudiero R, C. Capasso, V. Carginale, M. Riggio, A. Capasso, M. Ciaramella, S. Filosa, E. Parisi. (1997b) "PCR amplification and cloning of metallothionein complementary DNAs in temperate and Antarctic sea urchin characterised by a large difference in egg metallothionein content". *Cell. Mol. Life Sciences*, 53: 472-477
- Scudiero R, Carginale V, Capasso C, Kille P; (1998). "Biochemical and molecular studies on metallothionein in Antarctic Aquatic organisms". *Trends in comp. Physiol.* 4: 153-164.
- Scudiero R, Carginale V, Capasso C, Riggio M, Filosa S, Parisi E. "Structural and functional analysis of metal regulatory elements in the promoter region of genes encoding metallothionein isoforms in the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* (icefish)". *Gene*. 2001 274:199-208
- Scudiero R, Carginale V, Riggio M, Capasso C, Capasso A, Kille P, di Prisco G, Parisi E (1997) . "Difference in hepatic metallothionein content in Antarctic red-blooded and haemoglobinless fish: undetectable metallothionein levels in haemoglobinless fish is accompanied by accumulation of untranslated metallothionein mRNA". *Biochem J.*
- Scudiero R, Verde C, Carginale V, Kille P, Capasso C, Di Prisco G, Parisi E; (2000). "Tissue-specific regulation of metallothionein and metallothionein mRNA accumulation in the Antarctic notothenioid, *Notothenia coriiceps*". *Polar Biol* 23: 17-23.
- Seydoux G. (1996), "Mechanisms of translational control in early development". *Curr Opin Genet Dev.*;6(5):555-61. Review

- Sheng G, Thouvenot E, Schmucker D, Wilson DS, Desplan C (1997) "Direct regulation of rhodopsin 1 by Pax-6/eyeless in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors". *Genes Dev.* May 1;11(9):1122-31
- Shimada A, Yanagida M, Umemura T. (1997) "An immunohistochemical study on the tissue-specific localization of metallothionein in dogs". *J Comp Pathol.* 116:1-11.
- Shimizu M, Hochadel JF, Waalkes MP; (1997). "Effects of glutathione depletion on cadmium-induced metallothionein synthesis, cytotoxicity, and proto-oncogene expression in cultured rat myoblasts". *J Toxicol Environ Health* 51(6):609-21.
- Sigrist S, Jacobs H, Stratmann R, Lehner CF (1995) "Exit from mitosis is regulated by *Drosophila* fizzy and the sequential destruction of cyclins A, B and B3". *EMBO J.* 1995 Oct 2;14(19):4827-38
- Sigrist SJ, Lehner CF (1997) "*Drosophila* fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles". *Cell.* 1997 Aug 22;90(4):671-81.
- Simeone, 1998 Otx1 and Otx2 in the development and evolution of the mammalian brain. Simeone A. *EMBO J.* 1998 Dec 1;17(23):6790-8. Review
- Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'apice, M.R., Nigro, V., Boncinelli, E., (1993). "A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo". *EMBO J.* 12, 2735-2747.
- Simeone, A., Gulisano, M., Acampora, D., Stornaiuolo, A., Rambaldi, M. and Boncinelli, E. (1992b). "Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila empty spiracles* gene are expressed in the embryonic cerebral cortex". *EMBO J.* 11, 2541-2550.
- Simoniello P.; Tammaro S.; Motta C. M.; Filosa S. (2007). Cadmium cytotoxicity in *Podarcis sicula* liver. In: Bologna M.A.; Capula M.; Carpaneto G.M.; Luiseli L.; Marangoni C.; Venchi A.. *Atti del 6° Congresso nazionale della Societas Herpetologica Italica.* LATINA: Edizioni Belvedere. (Articolo su libro)
- Singhal et al (1985) *Endocrine Toxicology* 149-180 Raven-Press, New York
- Smith JB, Smith L, Pijuan V, Zhuang Y, Chen YC (1994);. "Transmembrane signals and protooncogene induction evoked by carcinogenic metals and prevented by zinc". *Environ Health Perspect.* 102 Suppl 3: 181-9.
- Sorahan T, Esmen Na; (2004). "Lung cancer mortality in UK nickel-cadmium battery workers, 1947-2000". *Occup Environ Med.* 61(2): 108-16.
- Sorahan T, Esmen Na; (2004). "Lung cancer mortality in UK nickel-cadmium battery workers, 1947-2000". *Occup Environ Med.* 61(2): 108-16.
- Soumillion A., Van Damme J., De Ley M. (1992). Cloning and specific polymerised-chain-reaction amplification of a third charge-separable human metallothionein isoform. *Eur. J. Biochem.*, 209, 999-1004
- Spahn SA, Sherry TW; (1999). "Cadmium and lead exposure associated with reduced growth rates, poorer fledging success of little blue heron chicks (*Egretta caerulea*) in south Louisiana wetlands". *Arch Environ Contam Toxicol.* Oct;37(3):377-84.
- Spemann, H. and Mangold, H. (1924). "Über induktion von embryonalanlagen"
- Stebbins-Boaz and Richter, (1997) "Translational control during early development". *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* ; 7(1-2):73-9.
- Stohs S.J., Bagchi D. (1995) "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions". *Free Radic Biol Med.*; 2, 321-36.
- Stoica (2000) "Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium". *Mol Endocrinol.*;14(4):545-53

- Stoykova A, Götz M, Gruss P, Price J. (1997) "Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain" . *Development*. Oct;124(19):3765-77
- Stürzenbaum SR, Georgiev O, Morgan AJ, Kille P (2004) "Cadmium detoxification in earthworms: from genes to cells". *Environ Sci Technol*. Dec 1;38(23):6283-9
- Sturm RA, Herr W."The POU domain is a bipartite DNA-binding structure". (1988) *Nature*. Dec 8;336(6199):601-4.
- Sudakin V, Ganoth D, Dahan A, Heller H, Hershko J, Luca FC, Ruderman JV, Hershko A. (1995) "The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis". *Mol Biol Cell*.;6(2):185-97
- Sunderman FW Jr, Plowman MC, Hopfer SM (1992) ."Teratogenicity of cadmium chloride in the South African frog, *Xenopus laevis*". *IARC Sci Publ*;(118):249-56.
- Sunderman FW Jr, Plowman MC, Kroftova OS, Grbac-Ivankoyic S, Foglia L, Crivello JF; (1995). "Effets of teratogenic exposures to Zn²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, and Cu²⁺ on metallothionein-mRNA contents of *Xenopus* embryos". *Pharmacol Toxicol* 76 (3): 178-8
- Sunderman FW Jr, Plowman MC, Kroftova OS, Grbac-Ivankoyic S, Foglia L, Crivello JF; (1995). "Effets of teratogenic exposures to Zn²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, and Cu²⁺ on metallothionein-mRNA contents of *Xenopus* embryos". *Pharmacol Toxicol* 76 (3): 178-8.
- Suzuki KT, Yamamura M. (1979) "Distribution of cadmium in liver and kidneys by loadings of various Cd-complexes and relative metal ratios in the induced metallothioneins" .*Biochem Pharmacol*. 28:3643-9.
- Tam PP, Liu WK; (1985). "Gonadal development and fertility of mice treated prenatally with cadmium during the early organogenesis stages.", *Teratology*.; 32(3):453-62
- Telford et al (1997); "Zinc reversibly inhibits steroid binding to murine glucocorticoid" receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Sep 8;238(1):86-9.
- Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwarz M, Willecke K. (1997) "High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32". *Curr Biol*. Sep 1;7(9):713-6
- Thiele DJ. (1992) "Metal-regulated transcription in eukaryotes". *Nucleic Acids Res*.;20(6):1183-91. Review
- Thompson J, Bannigan J; (1998). "Effects of cadmium on formation of the ventral body wall in chick embryos and their prevention by zinc pre-treatment". *Science* 281:1312
- Thompson J, Bannigan J; (2001) "Effects of cadmium on formation of the ventral body wall in chick embryos and their prevention by zinc pre-treatment". *Teratology*. 2001 Aug;64(2):87-9.
- Thornalley PJ, Vasak M. (1985) "Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress.Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals". *Biochim Biophys Acta*. 827:36-44.
- Thornberry NA, Lazebnik Y; (1998). "Caspases: enemies within". *Science* 281(5381): 1312-6.
- Tilton SC, Foran CM, Benson WH.(2003) "Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)" .*Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. Nov;136(3):265-76.
- Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van Heyningen V, Hastie ND, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, et al.et al,(1991) "Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region" .*Cell*. 20;67(6):1059-74
- Treisman J, Harris E, Desplan C.,(1991) "The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein"..*Genes Dev*.;5(4):594-604
- Trinchella F, Riggio M, Filosa S, Volpe MG, Parisi E, Scudiero R. (2006) "Cadmium distribution

- and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* Nov;144(3):272-8.
- Trottier B, Athot J, Ricard AC, Lafond J; (2002). "Maternal-fetal distribution of cadmium in the guinea pig following a low dose inhalation exposure.", *Toxicol Lett.*;129(3):189-97.
- Tsangaris GT, Trortzatou-Statopoulou F; (1998). "Cadmium induced apoptosis differentially on immune system cell emes". *Toxicology* 128 (2): 143-50.
- Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y., Tomonaga M. (1991). "The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothioneinlike protein". *Neuron*, 7, 337-347
- Udom AO, Brady FO. (1980) "Reactivation in vitro of zinc-requiring apo-enzymes by rat liver zinc-thionein". *Biochem J.* 1980 187:329-35.
- Usai C, Barberis A, Moccagatta L, Marchetti C; (1999). "Pathways of cadmium influx in mammalian neurons". *J Neurochem* 72 (5): 2154-61.
- Usai C, Barberis A, Moccagatta L, Marchetti C; (1999). "Pathways of cadmium influx in mammalian neurons". *J Neurochem* 72 (5): 2154-61.
- Vallee B. L., Maret W. (1993). "The functional potential and potential functions of metallothioneins: a personal perspective. In *Metallothionein III - Biological roles and medical implications.*" (Suzuki KT., Imura N. & Kimura M Eds.), Birkhauser Verlag, Basel Switzerland, pp. 1-27
- Vallee BL. (1995) "The function of metallothionein". *Neurochem Int.* Jul;27(1):23-33.
- Vassalli JD, Stutz (1995) "A. Translational control. Awakening dormant mRNAs". *Curr Biol.* 1;5(5):476-9
- Visintin R, Craig K, Hwang ES, Prinz S, Tyers M, Amon A. (1998) "The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation". *Mol Cell.* 1998;2(6):709-18
- Waalkes M P, and Rehm S; 1998. "Lack of cancerogenicity of cadmium chloride in female Syrian hamsters". *Toxicology* 126: 173-178.
- Waalkes MP, Coogan TP, Barter RA; (1992). "Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium". *Crit Rev Toxicol* 22 (3-4): 175-201.
- Waddington, C. H. (1932). Experiments on the development of chick and duck
- Walther C, Gruss P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 1991;113:1435-49.
- Walther C. and Gruss P. 1991 "Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS" *Development.* 113(4):1435-49.
- Watjen W, Beyersmann D; (2004). "Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress.", *Biometals* 17, 65-78.
- Webb M, Samarawickrama GP; (1981). "Placental transport and embryonic utilization of essential metabolites in the rat at the teratogenic dose of cadmium". *Appl Toxicol.* Oct;1(5):270-7.
- Weir et al 1990 *Toxicol Appl. Pharmacol.* 105 :156-171
- Winge DR, Miklossy KA. (1982) "Differences in the polymorphic forms of metallothionein" *Arch Biochem Biophys.*;214(1):80-8.
- Wolpert L. 1998 Pattern formation in epithelial development: the vertebrate limb and feather bud spacing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29;353(1370):871-5
- Wong LJ. (1980) 'Effect of sea urchin sperm chromatin on histone acetylation' . *Biochem Biophys Res Commun.* 31;97(4):1362-9.
- Wyllie et al (1980) "Cell death: the significance of apoptosis". *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306
- Yamasaki et al (1991) *Carcinogenesis* 12,1701-1706

- Yuan C, Kadiiska M, Achanzar WE, Mason RP, Waalkes MP; (2000). "Possible role of caspase-3 inhibition in cadmium-induced blockage of apoptosis". *Toxicol Appl Pharmacol* 164 (3): 321-9
- Yuan C, Kadiiska M, Achanzar WE, Mason RP, Waalkes MP; (2000). "Possible role of caspase-3 inhibition in cadmium-induced blockage of apoptosis". *Toxicol Appl Pharmacol* 164 (3): 321-9.
- Zelazowski AJ. (1980) "Methods of selective staining of polyacrylamide gels for -SH groups and cadmium." *Anal Biochem.* Apr;103(2):307-12.
- Zheng H, Liu J, Liu Y, Klaassen CD. (1996) "Hepatocytes from metallothionein-I and II knock-out mice are sensitive to cadmium- and tert-butylhydroperoxide-induced cytotoxicity". *Toxicol Lett.* 87(2-3):139-45
- Zou et al (1999) "APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9". *J Biol Chem.* 274(17):11549-56.
- Zuber ME, Gestri G, Viczian AS, Barsacchi G, Harris WA 2003 Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development.* 2003 Nov;130(21):5155-67. Epub 2003 Aug 27.
- Zuker CS. (1994) "On the evolution of eyes: would you like it simple or compound?" *Science.*;265(5173):742-3..