# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



# DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA AVANZATA XXII CICLO

# Studio comparato dell'azione citotossica del cadmio sull'encefalo e sulla neuroglia di Pesci e Rettili

Relatore Ch.ma Prof.ssa Grimaldi Maria Consiglio

Coordinatore Ch.mo Prof. Luciano Gaudio Candidata Dott.ssa Rossana Favorito

# INDICE

CAPITOLO 1 LA GLIA	<u>1</u>
1.1 SVILUPPO ED ORGANIZZAZIONE DELLA NEUROGLIA 1.2 EUNZIONI DELLA CLIA	4
1.2 FUNZIONI DELLA GLIA 1.3 CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE DELLE CELLULE GLIALI 1.4 RUOLO DETOSSIFICANTE DELLA GLIA	8 16
<b>1.5 PROTEINA GLIOFIBILLARE ACIDA: CARATTERISTICHE E FUNZIONI</b> <b>1.6 PROTEINA S100: CARATTERISTICHE E FUNZIONI</b>	18 20
CAPITOLO 2 IL CADMIO	<u>23</u>

2.1 STORIA E CARATTERISTICHE	24
2.1.1 APPLICAZIONI	25
2.2 ESPOSIZIONE	26
2.3 ASSORBIMENTO E METABOLISMO DEL CADMIO	28
2.4 ASPETTI TOSSICOLOGICI	31
2.4.1 TOSSICITÀ DEL CADMIO SU PESCI E RETTILI	33
2.5 NEUROTOSSICITÀ DEL CADMIO	35
2.6 CADMIO E APOPTOSI	37

CAPITOLO 3 SCOPO DELLA R	ICERCA 41

CAPITOLO 4 MATERIALI E METODI	<u>43</u>
4.1 MATERIALE BIOLOGICO	44
4.2 TRATTAMENTO ACUTO IN VIVO CON CdCh	44
4.3 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI CADMIO	44
4.4 INDAGINI ISTO-MORFOLOGICHE	45
4.4.1 EMALLUME-EOSINA	46
4.4.2 TRICROMICA DI MALLORY SECONDO GALGANO	46
4.4.3 CRESYL-VIOLETTO	47
4.5 ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA	48
4.5.1 METODO AVIDINA-BIOTINA-PEROSSIDASI (ABC)	48
4.5.2 IMMUNOIMPRESSING PER CASPASE	49
4.5.3 TUNEL TEST	50
4.6 INDAGINE ULTRASTRUTTURALE	51
4.7 REALIZZAZIONE DELLE IMMAGINI	52
	02
CAPITOLO 5 RISULTATI	<u>53</u>
5.1 OSSERVAZIONI VISIVE IN PODARCIS SICULA	54
5.2 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI CADMIO IN PODARCIS	54
5.3 INDAGINI ISTO-MORFOLOGICHE IN PODARCIS	55
5.4 ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA	57
5.4.1 VARIAZIONE DEL MARKER GFAP	57
5.4.2 VARIAZIONE DEL MARKER S100	59
5.4.3 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI	60
5.5 ANALISI ULTRASTRUTTURALE	63
5.6 OSSERVAZIONI VISIVE IN DANIO RERIO	64
5.7 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI CADMIO IN DANIO	64
5.8 INDAGINI ISTO-MORFOLOGICHE IN DANIO	65
5.9 ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA	66
5.9.1 VARIAZIONE DEL MARKER S100	66
5.9.2 VARIAZIONE DEL MARKER GFAP	67
5.9.3 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI	68
5.10 ANALISI ULTRASTRUTTURALE	70
CAPITOLO 6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	71
	<u>,                                    </u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	77
TAVOLE	<u>100</u>

# **CAPITOLO 1**

# <u>LA GLIA</u>

Il tessuto nervoso ha una struttura molto complessa e si presenta come un fitto ed intricato reticolo. In passato gli studiosi di neuroanatomia tentarono di chiarire una caratteristica del Sistema Nervoso (SN) che lo rendeva differente da ogni altro dell'organismo umano: in tutti gli organi, infatti, i raggruppamenti cellulari sono connessi da uno speciale tessuto detto "di connessione" o connettivo, ma nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) esso sembrava apparentemente assente. Nel 1859 il patologo tedesco Rudolph Virchow ipotizzava che anche nel SN esistesse un tessuto connettivo, che chiamò "Bindesubstanz" (sostanza cementante) o "Nerve Glue", quest'ultimo successivamente modificato in "Nevroglia". L'ipotesi iniziale considerava la neuroglia come una sostanza interstiziale in cui le cellule erano sospese, cellule perciò dette della glia; tale ipotesi fu supportata dalla comunità scientifica e dal lavoro di un autorevole scienziato italiano dell'epoca, Camillo Golgi, che discuteva tale aspetto (Parent 1996). Nell'inverno del 1873 Golgi effettuò, infatti, la sua principale scoperta: la reazione nera, denominata anche colorazione cromo-argentica. Prima di questa rivoluzionaria scoperta il tessuto nervoso era ispezionabile solo macroscopicamente (un libro della fine del 1800 (Testut 1898) introduce il tessuto nervoso come una "massa voluminosa di sostanza nervosa, ad un tempo bianca e grigia, la quale occupa il canale neurale della colonna vertebrale e dà origine ai nervi") o microscopicamente, con tecniche istologiche classiche. I preparati da esaminare al microscopio erano colorati con sostanze chimiche artificiali come il carminio, senza, però dare un'immagine completa delle cellule nervose. Il Golgi, dopo vari tentativi, una volta indurito il tessuto con bicromato di potassio, sostituì il carminio col nitrato d'argento. Risultò che le cellule nervose s'impregnarono di cromato d'argento, rivelandosi per la prima volta con i loro contorni precisi e con tutte le loro ramificazioni. Grazie a tale tecnica Golgi poté finalmente vedere la cellula nervosa, che gli apparve in tutti i suoi dettagli: un corpo cellulare, dai cui poli partono prolungamenti corti e sottili da un lato, i dendriti, e un prolungamento unico più grosso e più lungo dall'altro, l'assone. La scoperta della reazione nera (colorazione cromo-argentica) accese la scintilla di una vera rivoluzione scientifica che permise di mostrare la morfologia e l'architettura di base del tessuto cerebrale in tutta la sua complessità, contribuendo così alla fondazione delle moderne neuroscienze (Goldaniga 1989). La stessa reazione nera permise di indagare con maggior dettaglio anche le cellule della glia, che furono istologicamente isolate più tardi. Negli anni tra il 1887 e il 1891 Ramón y Cajal e Rio-Hortega distinsero almeno tre tipi di cellule gliali: oligodendrociti, astrociti e microglia. Queste, similmente ai neuroni, hanno un corpo da cui si dipartono prolungamenti che s'intersecano con quelli dei neuroni stessi, rendendo il tessuto nervoso una sorta di complesso canestro finemente intrecciato (Ramón 1899). Il rapporto fra cellule gliali e neuroni è intimo e parzialmente complesso. Entrambi i tipi cellulari, infatti, hanno numerosi prolungamenti, i quali s'intrecciano in un complesso groviglio, il neuropilo, fra le cui maglie sembra non rimanere alcuno spazio (Peters et al. 1991). In realtà l'uso di tecniche di microdiffusione ha dimostrato che lo spazio fra le cellule nervose era di notevole entità: circa il 20% del volume cerebrale (Parent et al. 1996). Questo spazio extracellulare contiene un insieme di molecole, prodotte da neuroni e cellule gliali, che interagiscono fra loro e si aggregano formando una struttura spongiforme: la matrice extracellulare (Nicholson et al. 1998). L'articolo che porta definitivamente all'attenzione della comunità scientifica il glia-issue arriva nel 1990: Cornell-Bell et al. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range Glial Signaling. Science. L'evidenza sperimentale di onde calcio (visibili attraverso fluorescence microscopy (dye: fluo- 3)) registrate all'interno di astrociti in culture ippocampali di ratto, in risposta al rilascio di Glutammato dai terminali sinaptici, chiaramente indica che queste cellule non si limitano soltanto ad una funzione strutturale e di sostegno.

### 1.1 SVILUPPO ED ORGANIZZAZIONE DELLA NEUROGLIA

Nel SNC e sistema nervoso periferico (SNP) vi è una categoria di cellule non nervose che sono globalmente indicate come cellule nevrogliali o neuroglia o glia (il termine glia deriva dall'identica parola greca  $\gamma\lambda i\alpha$ , che significa colla) presenti in numero notevolmente maggiore rispetto ai neuroni (Adamo et al. 2002). Le cellule gliali, infatti, possono occupare, nei primati, fino al 50% della massa cerebrale: sono circa 10-100 volte più numerose dei neuroni, nel nostro cervello sono presenti circa  $\sim 10^{11}$  neuroni e circa  $\sim 10^{13}$  cellule gliali. Il loro numero e grado di differenziazione aumentano durante lo sviluppo (Laming et al. 2000) In base alla sua localizzazione è possibile distinguere la Neuroglia dei centri nervosi, che comprende diversi tipi cellulari localizzati nel SNC e la Neuroglia periferica, costituita da cellule associate agli elementi nervosi del SNP (Rosati e Colombo 1997). La Neuroglia dei centri nervosi si suddivide a sua volta in neuroglia interstiziale e neuroglia epiteliale. La Neuroglia interstiziale raggruppa tutte le cellule neurogliali della sostanza grigia e bianca ossia gli astrociti, gli oligodendrociti e i microgliociti. La Neuroglia epiteliale è costituita da cellule associate in strati monocellulari pseudoepiteliali che rivestono il canale ependimale e le pareti dei ventricoli (Rosati e Colombo 1997).

Vi sono diversi tipi di cellule gliali: gli ependimociti, gli astrociti (o astroglia), gli oligodendrociti (oligodendroglia), le cellule di Schwann dei nervi periferici e le cellule di microglia. Tutte le cellule di neuroglia, ad eccezione della microglia, derivano dall'ectoderma: le prime tre categorie si formano dall'ectoderma del tubo neurale (neuroectoderma) insieme alle cellule nervose.

Molto precocemente le cellule neuroectodermiche si differenziano in due categorie di elementi, i neuroblasti, che emettono i prolungamenti e diventano cellule nervose, e gli spongioblasti che evolvono in cellule della nevroglia. Anche le cellule di Schwann appartengono alla neuroglia che nel corso dello sviluppo abbandonano il SNC accompagnando gli assoni dei nervi periferici (Mirsky et al. 2000). La microglia, non di origine neuroectodermica ma mesodermica, migra nel SNC intorno alla nascita (Adamo et al. 2002). Durante lo sviluppo la piastra neurale s'invagina nella parte mediale (solco neurale) e si chiude per formare il tubo neurale. Dai margini laterali della piastra neurale prolifera, verso il mesoderma, un importante gruppo di cellule dette cellule della cresta neurale, che danno origine al SNP e SNA, alle cellule adrenergiche cromaffini, ai melanociti e ad alcuni tessuti mesenchimali della testa e della faccia (Pat e Pat 1977).

### **1.2** Funzioni della Glia

La glia compare per prima durante la genesi del tessuto nervoso, ed il rapporto cellule gliali/neuroni sembra essere aumentato a favore della glia durante la filogenesi. Di tutte le specie viventi, l'uomo sembra possedere il maggior numero di cellule gliali. Le cellule gliali sono molto più numerose dei neuroni in tutte le regioni cerebrali ed in tutte le specie (Parent et al. 1996). È sorprendente, perciò, osservare come, rispetto ai neuroni, si conosca relativamente poco del ruolo della glia. Questo dipende da un precedente errore storico, che lasciava alle cellule gliali il semplice ruolo passivo d'elementi trofici e protettivi nei confronti delle "nobili" funzioni dei neuroni (Sheperd 1994) e anche dalla mancanza di appropriate tecniche per misurare la "glia activity" (Smith 1994). Questa visione piuttosto semplicistica del cervello ha ormai perso molto del suo significato originale ed il ruolo attribuito alla neuroglia è

profondamente cambiato negli ultimi anni. E' ben noto oggi, infatti, che la glia è capace di influenzare l'eccitabilità, l'attività (Grosche et al. 1999; Alvarez-Maubecin et al. 2000) e la migrazione dei neuroni (McKeon et al. 1995), di modificare il numero di sinapsi (Araque et al. 1999; Ullian et al. 2001) ed il livello extracellulare dei neurotrasmettitori (Lino et al. 2001). Nel SNC le cellule della neuroglia con i loro prolungamenti, formano una fitta rete che riveste estesamente i corpi cellulari, i dendriti e le fibre nervose, costituendo una rete strutturale di sostegno per l'encefalo e il midollo spinale ed il mezzo interno per gli scambi nutritivi e gassosi tra gli elementi nervosi ed il sangue. In aggiunta, le cellule della neuroglia intervengono nella riparazione di lesioni del SN e svolgono una funzione importante nell'attività nervosa isolando i neuroni, fuorché nella zona in cui questi vengono in contatto (Adamo et al. 2002). Le cellule gliali possono modulare l'attività sinaptica (LoPachin e Aschner 1993), rilasciando una gran varietà di principi attivi, come fattori di crescita, interleuchine, aminoacidi neuroeccitatori, l'acido y-aminobutirrico (GABA), i peptidi oppioidi, molti altri neuropeptidi e anche gli ormoni steroidei (Barres 1991; Gadient et al. 1990; LoPachin e Aschner 1993). Nell'embrione le cellule gliali formano una struttura che permette lo sviluppo del resto del SN, e regolano la differenziazione e la sopravvivenza neuronale. La funzione più nota della glia nell'adulto è la formazione della guaina mielinica attorno agli assoni, consentendo una veloce conduzione dell'impulso nervoso (Jessen 2004).

Diverse evidenze indicano che le cellule della glia radiale svolgono diversi ruoli, ad esempio come cellule precursori nel processo di generazione dei neuroni e della glia (Malatesta et al. 2000; Pernavales e Nadarajah 2001; Gotz et al. 2002). Dopo che, negli anni scorsi, gli astrociti sono stati promossi da semplici cellule di supporto strutturale ad elementi in grado di produrre fattori di crescita e di modificare la connettività delle cellule nervose, stimolando la formazione di nuove sinapsi, uno studio condotto al Salk Institute di La Jolla - in California attribuisce una proprietà nuova e inattesa a queste cellule dalla forma a stella. Gli esperimenti di Song e dei suoi colleghi (2002), descritti su Nature, mostrano, infatti, che gli astrociti sono in grado di stimolare la proliferazione delle cellule staminali del cervello e di dirigere il destino delle nuove cellule verso l'acquisizione del fenotipo neurale. "La scoperta giunge inattesa perché, nel corso dello sviluppo, i neuroni si formano prima della glia" scrivono gli autori dello studio (Song et al. 2002). Nel cervello adulto però le cose sembrano andare diversamente. Nel SNC, le aree in cui le cellule staminali possono originare neuroni nuovi sono due: l'ippocampo e la zona periventricolare. I ricercatori statunitensi stavano studiando i fattori ambientali che influenzavano il destino delle cellule neoformate. Mettendo in coltura le staminali dell'ippocampo con cellule nervose e gliali prelevate dalla stessa zona di ratti neonati, i ricercatori si sono accorti che, dopo sei giorni, la neurogenesi era aumentata di otto volte rispetto a quella osservata in piastre in cui le staminali erano coltivate su un substrato di soli fibroblasti. Per determinare se l'effetto fosse dovuto ai neuroni dell'ippocampo o alle cellule gliali, Song e colleghi hanno condotto due serie di esperimenti, in cui le cellule staminali erano fatte crescere su un supporto costituito soltanto da neuroni, oppure da astrociti. Dopo sei giorni, il tasso di neurogenesi nelle piastre in cui era presente la glia era aumentato di dieci volte. Nelle colture che contenevano soltanto neuroni, invece, non si osservava nessun effetto apprezzabile sulla neurogenesi, mentre risultava aumentato in modo significativo il numero di oligodendrociti. "Gli astrociti dell'ippocampo sono sufficienti da soli a promuovere la neurogenesi a partire da cellule staminali" concludono i ricercatori. Analisi successive hanno mostrato che l'effetto è dovuto ad una combinazione di fattori di membrana diffusibili e secreti dalle cellule gliali. L'incremento del numero di neuroni è dovuto a un effetto sul

delle cellule neoformate, differenziamento più che а un'aumentata sopravvivenza delle cellule nervose. Infatti, nelle piastre di coltura, la presenza della glia non influenzava l'indice apoptotico dei neuroni (che mostra il tasso di mortalità delle cellule). Inoltre, l'abilità degli astrociti di promuovere la neurogenesi dipende dalla regione da cui le cellule della glia sono prelevate, visto che il fenomeno non si osserva se le staminali sono messe in coltura con astrociti prelevati dal midollo spinale (Song et al. 2002; Kornyei e Szlavik 2004; Alvarez et al. 2005). A tal proposito si ricorda che alcuni Rettili, come ad esempio la lucertola, hanno capacità di rigenerare il tessuto nervoso, soprattutto in seguito al suo danneggiamento. Ciò si verifica grazie alle cellule gliali localizzate nel telencefalo, che si trovano in uno stato semi-differenziato rispetto a quelle presenti a livello del mesencefalo (Monzon-Mayor et al. 1990c-d; Yanes et al. 1990-1997), a questo corrisponde una marcata capacità rigenerativa nel telencefalo (Lopez-Garcia et al. 1992).

### **1.3** Caratteristiche Morfologiche delle Cellule Gliali

Nel SN si trovano cinque tipi di cellule gliali: oligodendrociti, astrociti, ependimociti, microglia e cellule di Schwann. Questi tipi cellulari possono essere distinti sulla base delle dimensioni, dell'organizzazione intracellulare e della presenza di specifici processi citoplasmatici.

Le **cellule ependimali**, chiamate anche ependimociti, hanno forma cubica o cilindrica e sono fittamente addossate le une alle altre a formare un rivestimento monostratificato che tappezza le cavità ventricolari dell'encefalo ed il canale centrale del midollo spinale. Presentano un nucleo tondo o ovale localizzato nella parte basale della cellula, mentre nella porzione apicale sono localizzati gli organelli citoplasmatici (Adamo et al. 2002). La superficie libera delle cellule ependimali presenta molto spesso delle bande di ciglia che facilitano il flusso del

liquido cerebrospinale attraverso le cavità encefaliche. Inoltre molte cellule ependimali hanno nella loro parte basale delle lunghe espansioni che si estendono in direzione perpendicolare e si approfondano nel tessuto nervoso. In alcuni casi queste espansioni sembrano compiere funzioni simili a quelle degli astrociti. In alcune regioni particolari questa espansione terminale raggiunge la superficie piale (ad esempio nella eminenza mediana ipotalamica) e le cellule vengono denominate taniciti (Seeley 2005).

Fra le cellule della neuroglia, gli astrociti sono le più numerose e le più grandi. Il termine "astrocita" deriva dalla peculiare forma stellata che le cellule in questione presentano, dovuta ai numerosi prolungamenti citoplasmatici che si estendono dal corpo cellulare terminando con un processo bottonuto detto "piede terminale". Questi lunghi processi citoplasmatici radiali si estendono anche fino a 100 µm nel SNC, terminando con le loro estremità sulla superficie vascolare e piale andando a costituire lo strato gliale perivascolare e la membrana limitante esterna della glia, contribuendo così alla formazione e al mantenimento della barriera emato-encefalica (Monzón-Mayor 1998; Elmquist et al. 1994; Lazzari et al. 1997). Proprio per la loro localizzazione e le caratteristiche morfologiche che presentano, gli astrociti sono le prime cellule che vengono a contatto con molecole estranee che attraversano la barriera emato-encefalica (Tiffany-Castiglioni et al. 1989). Si distinguono due varietà di astrociti: astrociti fibrosi, presenti soprattutto nella sostanza bianca del SNC, ricchi di gliofilamenti, con numerosi prolungamenti sottili e lunghi (Rosati e Colombo 1997), e gli astrociti protoplasmatici, presenti nella sostanza grigia del SNC, provvisti di espansioni corte, sinuose, ramificate, e sono scarsi di gliofilamenti. La caratteristica più saliente degli astrociti protoplasmatici è il pleomorfismo (pluralità di forme) dei loro numerosi e tenui processi citoplasmatici, che si insinuano tra i costituenti citoplasmatici del neuropilo

sotto forma di esili lamine (Gartner e Hiatt 2002). Gli astrociti protoplasmatici sono cellule a forma stellata con abbondante citoplasma, nucleo voluminoso e molti prolungamenti che si ramificano. Gli astrociti fibrosi mostrano un citoplasma con scarsi organuli, ribosomi liberi e glicogeno. La caratteristica principale degli astrociti fibrosi è la presenza nel corpo cellulare e nei prolungamenti di spesse strutture fibrillari o gliofibrille, visibili con opportuni metodi di colorazione, che al microscopio elettronico risultano costituite dall'aggregazione di gliofilamenti più sottili (Gartner e Hiatt 2002). I filamenti gliali, detti "gliofilamenti", sono una classe di filamenti intermedi, del diametro di 10 nm, costituiti da un'unica proteina, la proteina Gliofibrillare Acida (GFAP) (Antanitus et al. 1976; Marcus e Easter 1995). La presenza della (GFAP) è riportata in numerosi studi immunocitochimici sulle cellule della glia ependimale e radiale dei Pesci ossei (Onteniente et al. 1983; Anderson et al. 1984; Dahl et al. 1985; Levine 1989; Cardone e Roots 1990; Kawai et al. 2001; Kàlmàn e Ari 2002). Inoltre nel citoplasma spesso si trova del pigmento lipofuscinico e glutammina sintetasi (Leeson 1974). Lo studio ultrastrutturale, sullo sviluppo degli astrociti nel cervello della lucertola Gallotia Galloti, svolto da Monzon-Mayor et al. (1990a) ha permesso di analizzare come caratteristica principale degli astrociti, localizzati nella sostanza bianca, la grande quantità di gliofilamenti presenti attorno al nucleo e sparsi in tutto il citoplasma fino ai lunghi processi. I granuli di glicogeno sono presenti raramente a livello del pericarion o dei processi fibrosi eccetto quando i processi sono a contatto con i capillari. Nella sostanza grigia gli astrociti protoplasmatici presentano gliofilamenti in piccole quantità, con corpi densi e granuli di glicogeno sparsi in tutto il citoplasma. I nuclei di entrambi gli astrociti fibrosi e protoplasmatici presentano forma irregolare con sottili clumps di cromatina sparsa.

Aderendo, alla rete vascolare gli astrociti svolgono numerose funzioni in quanto realizzano una sorta di tessuto di sostegno nel SNC (Colombo e Rosati 1997). Il concetto di funzione astrocitaria è cambiato profondamente negli ultimi 20 anni: le cellule che sembravano essere solo elementi di supporto fisico si sono rivelate avere un grande range di attività nello sviluppo, normale e patologico, del SNC. I primi indizi di un ruolo funzionale degli astrociti si è avuto con l'osservare come le cellule della glia esprimano recettori per quasi tutti i neurotrasmettitori. I recettori dei neurotrasmettitori presenti sugli astrociti sono legati alla produzione di IP3 (inositolo-3-fosfato) ed al rilascio di calcio (Ca<sup>2+</sup>) intracellulare. Gli astrociti svolgono un importante ruolo nell'omeostasi del SNC: mantengono la concentrazione ionica extracellulare rimuovendo gli ioni, in particolare il potassio, proteggendo il potenziale di membrana dalla depolarizzazione; controllano il ciclo metabolico del glutammato e del GABA e riciclano i neurotrasmettitori rilasciati durante la trasmissione sinaptica, quali cAMP (adenosina monofosfato ciclico), dopamina, noradrenalina, serotonina; partecipano alla detossificazione dell'ammonio; regolano la sopravvivenza neuronale e ne controllano la proliferazione (Kettenmann e Ransom 1995; Privat et al. 1995; Carmignoto 2000). I ruoli principali riguardano il supporto strutturale, il riparo di eventuali danni a livello del SNC, la formazione ed il mantenimento della barriera emato-encefalica, l'isolamento della superficie neuronale, inoltre gli astrociti giocano un importante ruolo nel rimodellamento sinaptico nel cervello maturo normale rimuovendo le sinapsi in degenerazione. Dopo un danno al SNC, gli astrociti intervengono nella riparazione strutturale che stabilizza il tessuto e previene da ulteriori insulti, mediante la produzione di tessuto cicatriziale a livello del sito dell'insulto (Dos Santos et al. 2002). Gli astrociti immagazzinano glicogeno come riserva energetica e liberano glucosio e lattato per contribuire al mantenimento energetico dei neuroni (Bloom e

Fawcett 1996). Ancora gli astrociti sono coinvolti nella risposta immunitaria attivando il rilascio della prostaglandina E ed interleuchine. Recenti studi evidenziano che gli astrociti partecipano nei meccanismi di segnalazione tra cellule attraverso il flusso di calcio (Bennett et al. 2003). Diversi studiosi si sono interessanti del ruolo del calcio astrocitario ed in seguito a numerosi esperimenti, in vivo ed in vitro, si è compreso che il  $Ca^{2+}$  svolge un ruolo chiave all'interno di queste cellule. I segnali di calcio negli astrociti giocano lo stesso ruolo del potenziale di azione nei neuroni. Gli astrociti possono interagiscono con il neurotrasmettitore rilasciato a livello della sinapsi portando così all'attivazione dell'astrocita attraverso la variazione di concentrazione di Ca2+ intracellulare (Teichberg 1991; Newman 2001; Porter and McCarthy 1997). Le onde calcio nella glia sorgono in risposta ad un "evento sinaptico" - cioè è il glutammato- il neurotrasmettitore rilasciato dal terminale presinaptico - che interagisce con i processi astrocitari circostanti grazie ai recettori metabotropici del glutammato presenti sulla membrana astrocitaria prossima al vallo sinaptico, e attraverso un meccanismo di trasmissione chimica mediato dall'IP3 (secondo messaggero), determina l'insorgenza di onde calcio, secondo un meccanismo di feedback positivo (Ca<sup>2+-</sup>induced Ca<sup>2+-</sup>release) (Kang et al. 1998; Dani e Smith 1995; Fellin and Carmignoto 2004). Le onde Ca<sup>2+</sup> intercellulari rappresentano un possibile meccanismo biochimico tramite il quale un gruppo di cellule astrocitarie può comunicare con un altro gruppo e coordinare una risposta multicellulare ad un evento locale (Carmignoto 2000).



Gli oligodendriciti assomigliano agli astrociti ma si distinguono da questi in quanto più piccoli e con prolungamenti più radi. Presentano un grosso nucleo e processi più fini e meglio definiti di quelli degli astrociti (McCharty e De Vellis 1980). Essi rappresentano il 75% della popolazione gliale; queste cellule della neuroglia, che si colorano intensamente, sono presenti sia nella sostanza grigia che bianca del SNC. Tradizionalmente vi sono due classi di oligodendrociti. La prima classe è evidenziabile nella sostanza grigia del sistema nervoso centrale, addossata ai pirenofori (oligodendrociti satelliti perineuronali), con funzioni coadiuvanti metaboliche (Bloom e Fawcett 1996). La seconda classe si trova nella bianca del sostanza sistema nervoso centrale (oligodendrociti interfascicolari), intercalata tra gli assoni. Gli oligodendrociti interfascicolari hanno il compito di rivestire gli assoni del sistema nervoso centrale con una sostanza lipidica chiamata mielina producendo la cosiddetta guaina mielinica con proprietà isolanti (Rosati et al. 2001). La guaina isola l'assone permettendo quindi una migliore propagazione dei segnali elettrici (conduzione saltatoria). Al contrario delle cellule di Schwann, gli oligodendrociti possono rivestire più di

> DOTTORATO DI RICERCA BIOLOGIA AVANZATA XXII CICLO

un assone perché forniti di numerosi prolungamenti (Gartner e Hiatt 2002). Gli oligodendrociti sono coinvolti in complesse interazioni con i corpi cellulari degli assoni nel SNC (Barres e Barde 2000). Monzon-Mayor et al. (1990b) hanno descritto quattro tipologie di cellule nel cervello della lucertola Gallotia Galloti: oligodendrociti attivi, light, medium e dark. I primi sono moderatamente scuri e nel loro citoplasma è presente un esteso apparato del Golgi, numerosi mitocondri, microtubuli ed un reticolo endoplasmatico ruvido (RER) spesso organizzato in lunghe parallele pile di sacculi. I nuclei, che hanno solitamente forma irregolare, contengono un nucleolo ed eucromatina ben dispersa in tutto il nucleo con solo un sottile cerchio attaccato alla membrana nucleare. Gli oligodendrociti presentano un citoplasma ricco di ribosomi liberi, numerosi mitocondri, un complesso di Golgi ed abbondanti microtubuli, uno o un paio di centrioli. Gli oligodendrociti medium presentano un citoplasma molto elettrondenso e povero di organelli rispetto agli oligodendrociti attivi; in particolare il numero dei mitocondri e la quantità di RER è molto ridotta. I centrioli si osservano facilmente ed il Golgi è ben identificabile. La principale caratteristica degli oligodendrociti dark è il citoplasma molto elettron-denso.

La **microglia** si compone di piccole cellule disperse nel SNC, somiglianti agli oligodendrociti, ma ancora più piccole e scure. Esse possiedono un nucleo oblungo, allungato o irregolarmente triangolare, scarso citoplasma e numerosi sottili ramificazioni brevi e tortuose. Il corpo cellulare e i processi sono ricoperti di minuscole spine appuntite (Pat e Pat 1977). Sono morfologicamente ed embriologicamente diverse dalle altre cellule della neuroglia. Derivano dal mesoderma e compaiono nel SNC verso la fine della vita fetale migrando dalla pia madre e dall'avventizia dei vasi sanguigni nell'encefalo e nel midollo spinale mediante movimenti ameboidi (Adamo et al. 2002). Queste cellule staminali sono le stesse che daranno vita ai macrofagi tissutali e ai monociti ematici. La microglia rimane segregata nel tessuto nervoso a costituire una forza di difesa mobile, svolgendo funzione fagocitaria nei confronti dei neuroni degenerati; in caso di danno del tessuto queste cellule si differenziano in cellule fagocitiche (Lin e Bergles 2004) ed inglobano rapidamente frammenti cellulari della aree lese, prodotti di rifiuto, agenti patogeni e le sostanze estranee che abbiano invaso il SNC (Adamo et al. 2002). Questa attività è garantita dalla presenza di enzimi idrolitici lisosomiali; quando vengono attivate, agiscono come cellule presentanti l'antigene e secernono citochine (Gartner e Hiatt 2002). Le cellule della microglia sono poco numerose in condizione normale, ma aumentano considerevolmente di numero nelle sedi di lesioni, emorragie, tumori e altre condizioni patologiche di danno del tessuto nervoso.

Diversamente dalle altre cellule di neuroglia, le **cellule di Schwann** sono cellule di glia del SNP, derivate dalle creste neuronali che si avvolgono attorno agli assoni. Hanno una funzione simile a quella degli oligodendrociti formando la guaina mielinica degli assoni del SNP (Adamo et al. 2002). Alcuni assoni del SNP non sono avvolti da un multistrato di mielina, ma solo da uno strato di membrana della cellula di Schwann, in questo caso si parla di *fibre nervose amieliniche* (Adamo et al. 2002; Mirsky et al. 2000). Le **cellule satellite** sono piccole cellule che delimitano la superficie esterna dei neuroni del SNP ed aiutano a regolare l'ambiente chimico esterno.

La forma di glia filogeneticamente più primitiva è rappresentata dalla **glia radiale** (Onteniente et al. 1983; Miller e Liuzzi 1986), che consiste di cellule a forma di perla o di fuso, i cui corpi sono localizzati nello strato ependimale o periependimale (Monzon-Mayor et al. 1990c; Elmiquist et al. 1994; Lazzari et al. 1997). Le cellule della glia radiale sembrano avere specifiche funzioni durante lo sviluppo, formando un ponte per la migrazione neuronale (Rakic 1972; Levitt e Rakic 1980). Di preciso, durante il primitivo sviluppo

dell'encefalo la zona ventricolare dà due tipi di cellule: la glia radiale ed i neuroni. Il meccanismo di migrazione dei neuroni è semplice: la glia radiale manda dei lunghi prolungamenti verso la superficie esterna, piale, dell'encefalo e i neuroni in sviluppo migrano lungo questi prolungamenti gliali. In questa fase "immatura" le cellule della glia radiale esprimono la Vimentina come proteina citoscheletrica principale, che sarà sostituita successivamente dalla GFAP (Voigt 1989). La glia radiale è la prima ad apparire durante l'ontogenesi dei Vertebrati che mostrano una complessa organizzazione gliale (Levitt e Rakic 1980). Nei Mammiferi le cellule della glia radiale si riducono progressivamente e sono virtualmente assenti negli adulti (Pixley e De Vellis 1984; Elmquist et al. 1994). Quelle presenti nel cervelletto prendono il nome di Glia di Bergmann e regolano la plasticità sinaptica. Nella retina la principale cellula della glia è la cellula di Müller che partecipa alla comunicazione bidirezionale con i neuroni (Seeley 2005). Negli altri Vertebrati la glia radiale è conservata nell'adulto (Ebner e Colonnier 1975; Lazzari et al. 1997; Lazzari e Franceschini 2001). Infatti nei Pesci le cellule della glia radiale permangono per tutta la vita (Rubio et al. 1992; Kàlmàn 1998). Nei Teleostei, l'astroglia è rappresentata in gran parte dai taniciti ependimali e dalle cellule della glia radiale (Kruger e Marxwell 1967; Manso et al. 1997; Horstmann 1954). Nell'encefalo di Teleosteo sono stati descritti oltre agli astrociti, (Kruger e Maxwell 1966; Lara et al. 1989; Kàlmàn 1998), anche astrociti reticolari con caratteristiche di cellule epiteliali, comuni nei nervi ottici (Maggs e Scholes 1990).

### 1.4 Ruolo Detossificante della Glia

Le cellule gliali presentano diverse caratteristiche che consentono non solo l'ingresso nel citoplasma ma anche l'accumulo e la detossificazione di diverse sostanze tossiche come gli ioni metallici (Tiffany-Castiglioni e Qian 2001). In

esse sono presenti, infatti, enzimi chiave metallo-dipendenti, come la glutammina sintetasi (Norenberg e Martinez-Hernandez 1979), le rame, zincosuperossido dismutasi (Lindenau et al. 2000) e proteine carrier, come la ceruloplasmina, aventi la capacità di trasportare i metalli all'interno della cellula (Klomp et al. 1996). Gli astrociti possiedono alti livelli citoplasmatici di glutatione, un tripeptide che conferisce gran parte del potenziale redox disponibile nel citoplasma (Tiffany-Castiglioni et al. 1996). Nel loro citosol, in più, vi è un elevato contenuto di metallotioneine (MT) (Young et al. 1991; Penkowa et al. 1999). Le MT sono una super famiglia di proteine citoplasmatiche a basso peso molecolare ricche in cisteina che chelano metalli. La chelazione di cationi mono e bivalenti è mediata dai residui cisteinici, spesso altamente conservativi tra le specie. Questa proprietà suggerisce un possibile ruolo delle MT nell'omeostasi, accumulo, trasporto e detossificazione di ioni metalli. I livelli di MT vengono utilizzati quali indicatori precoci degli effetti biologici dei metalli pesanti (Kagi e Kojima 1987). Diversi studi hanno descritto la distribuzione delle MT nel SNC (Aschner et al. 1995) e Nakajima et al. (1991) hanno evidenziato la presenza delle MT I e II negli astrociti. Mentre l'espressione di MT I e MT II è ubiquitaria in tutti i tessuti animali, il gene per la MT III è ristretto al cervello. Uchida et al. (1991) hanno localizzato la MT III solo negli astrociti e più recentemente Masters et al. (1994) hanno identificato tale proteine nei neuroni dei ratti. La possibilità di chelare metalli liberi nel cervello permette all'astroglia di svolgere un'azione neuroprotettiva (Aschner e LoPachin 1993; Aschner et al. 1998). Quando il SNC subisce un danno gli astrociti si attivano producendo mediatori pro-infiammatori e formano una barriera física che impedisce inizialmente la rigenerazione assonale e la riparazione del tessuto (Silver e Miller 2004) e successivamente essi garantiscono la sopravvivenza neuronale promuovendo la riparazione dei tessuti

dopo danno al SNC, con la produzione di fattori neurotrofici e/o fattori di crescita, e comportandosi come spazzini di radicali liberi (Ransom et al. 2003).

### 1.5 PROTEINA GLIOFIBRILLARE ACIDA (GFAP): CARATTERISTICHE E FUNZIONI

La proteina acida gliofibrillare è la caratteristica proteina filamentosa intracitoplasmatica dell'astroglia ed è quindi considerata come marcatore molecolare specifico per questo tipo cellulare. La GFAP è una proteina citoscheletrica, presente nelle cellule mature del lineage astrocitario ed appartiene alla famiglia delle proteine dei filamenti intermedi della classe III, coinvolti nella formazione delle strutture citoscheletriche (Dahl e Bignami 1985). Le proteine dei filamenti intermedi di tipo III sono caratterizzate dalla capacità di generare dimeri e alti oligomeri. Essi sono abbondanti nella frazione citoscheletrica e sono integrati in vivo nella rete cellulare filamentosa (Eng et al. 2000; Fuchs e Cleveland 1998; Fuchs e Weber 1994). La GFAP ha un peso molecolare di circa 50kD. Studi immunocitochimici hanno rivelato che essa può esistere in due forme, diffusa nel citoplasma o organizzata in gliofilamenti, e queste a loro volta corrispondono alle forme solubili e non, in acqua. La funzione della GFAP non è stata del tutto determinata ma evidenze sperimentali hanno mostrato che essa svolge un ruolo importante nella fibrillogenesi, processo, a sua volta, associato alla differenziazione astrocitario (Rutka 1997). Questa proteina è espressa nei gliofilamenti di tutti i tipi di astrociti: fibrosi e

Questa proteina e espressa nel gnomanenti di tutti i tipi di astroctiti. norosi e protoplasmatici; glia di Bergmann, glia radiale periependimale, e glia radiale ependimale o taniciti (Wasowicz et al. 1994; Naujoks-Manteuffel e Meyer 1996). Nei Vertebrati la GFAP non è espressa solo dagli astrociti, ma l'immunorettività a tale proteina è stata osservata anche nella glia enterica (Jessen e Mirsky 1980), in una sottopopolazione delle cellule di Schwann nel nervo sciatico (Yen e Fields 1981; Dahl et al. 1982) nelle cellule reattive di

Muller della retina e nei pituiciti della neuroipofisi (Hatfield et al. 1984). La GFAP umana è un polipeptide lungo composto da 432 amminoacidi, codificato da un gene localizzato sul cromosoma 17q21 (Bongcam-Rudloff et al. 1991; Eng et al. 2000; Reeves et al. 1989). Questo gene è filogeneticamente antico (Balcarek e Cowan 1985; Condorelli et al. 1999). La GFAP mostra un'apprezzabile stabilità nelle proprie caratteristiche molecolari ed antigeniche lungo la filogenesi dei Vertebrati, come indicato dall'osservazione che in tutti i gruppi di vertebrati la GFAP mostra cross-reattività all'anticorpo anti-GFAP di Mammifero (Onteniente et al. 1983; Dahl et al. 1985; Bodega et al. 1994). Onteniente et al. (1983) hanno visualizzato la GFAP in vari vertebrati osservando immunoreattività in molte specie (Teleostei, Rettili, Uccelli, e molti Mammiferi placentati), tranne che in alcuni anfibi e ciclostomi. Gli astrociti positivi alla GFAP sono stati identificati inizialmente nei serpenti, e molte cellule presenti negli uccelli mostravano un pattern di distribuzione simile a quello dei Mammiferi. Tra i Mammiferi sono state osservate poche differenze riguardo la localizzazione riscontrata tra specie differenti, tranne che nel corpo calloso, ependima e strato subependimale. Lunghi e dritti processi sono stati osservati in lampreda, carpa e tartaruga. In zebrafish il gene della GFAP ha la stessa organizzazione esoni-introni del gene ortologo dei Mammiferi. Inoltre esso mostra le caratteristiche funzionali delle proteine dei filamenti intermedi ossia il potenziale di dimerizzazione, la capacità di assemblare i filamenti e di garantire la localizzazione citoscheletrica. Mutazioni a carico del gene umano della GFAP comportano una grave malattia che colpisce il cervello dei bambini detta malattia di Alexander. Il dato interessante è che le mutazioni colpiscono specificamente aminoacidi residui della GFAP, conservati durante l'evoluzione (Nielsen e Jørgensen 2003).

### 1.6 Proteina S100: caratteristiche e funzioni

Le proteine S100 sono espresse abbondantemente nel SN in molte isoforme, quelle maggiormente studiate sono la S100A1 e S100ß (Donato 1999). Le S100 sono piccole proteine acide di circa 10-12 kDa (Schafer e Heizmann 1996) che si trovano sia in forma solubile (approssimatamene il 90%) che legata alla membrana (Cocchia 1981; Rickmann e Wolff 1995). Questa famiglia di proteine comprende diversi elementi, molti dei quali non ancora del tutto identificati, espressi principalmente in Vertebrati (Zimmer et al. 1995). Diversi studiosi hanno indicato un alto grado della stabilità di struttura in tutta la filogenesi (Moore 1982; Donato 1986; Kligman e Hilt 1988) anche se è stato riportato una micro-eterogeneità delle subunità della proteina S100 fra diverse specie (Isobe et al. 1983). I membri della famiglia S100 sono attualmente considerati proteine multifunzionali che dipendono dalla presenza intra- ed extracellulare di calcio. Essi sono implicati nella regolazione dinamica del citoscheletro e nella crescita e sopravvivenza cellulare (Zimmer et al. 1995), ma anche nella modulazione della memoria, dell'apprendimento e nella patogenesi di disordini quali il morbo d'Alzheimer e Sindrome di Down (Donato 1999). Inoltre partecipano sia intrache extra-cellularmente nella regolazione di molti processi come la fosforilazione delle proteine, regolazione del ciclo cellulare, trascrizione e differenziamento (Donato 2001). Più recentemente, Baudier e Coworkers (1992) hanno mostrato che p53, un moderatore negativo del ciclo cellulare, può essere bersaglio della Sl00. La proteina S100ß è capace di legarsi alla proteina p53 e di impedire la sua fosforilazione e dunque il suo passaggio in forma attiva. Ne risulta un'inibizione della moltiplicazione cellulare: un aumento della proteina S100, per esempio, per deregolazione dell'espressione del suo gene, sembra poter essere responsabile di un'eccessiva proliferazione cellulare (Rustandi et al. 1998). Un'altra funzione intracellulare delle proteine S100 è quella di

modificare la concentrazione dell'AMP ciclico (Zimmer et al. 1995). La S100ß è prodotta primariamente dagli astrociti ed esercita effetti autocrini e paracrini, sulla glia radiale, sui neuroni e sulla microglia (Adami et al. 2001); è rilasciata da cellule della glia radiale, attraverso un meccanismo simile a quello utilizzato per il rilascio di altri fattori come interleukina-1 $\alpha$  e 1 $\beta$ , o come il fattore di crescita endoteliale umano (Barger et al. 1992a). S100ß determina un aumento della concentrazione del  $Ca^{2+}$  in cellule gliali e neuronali (Barger et al. 1992b). È un basso regolatore di un set di geni implicati nell'apoptosi (c-fos, c-jun, bax, bcl-x, p-15, e p-21) (Fulle et al. 2000) e determina il rilascio del citocromo C e l'attivazione della cascata delle Caspasi (Huttunen et al. 2000). S100ß sembra essere coinvolta nella regolazione del metabolismo energetico cellulare del cervello, in quanto capace di incrementare l'attività enzimatica del fruttosio-1,6bisfosfato aldolase (Zimmer e Van Eldik 1986) e della fosfoglucomutasi (Landar 1996). Le sperimentazioni sul topo hanno mostrato che il livello di sintesi della proteina S100<sup>B</sup> è quadruplicato durante la fase di sviluppo cerebrale, confermando, così il suo ruolo nello sviluppo del SNC. L'insieme di queste osservazioni conferma un ruolo importante della proteina S100<sup>β</sup> nello sviluppo fisiologico e nel mantenimento del tessuto nervoso centrale sia dei neuroni sia delle cellule astrogliali (Beaudeux et al. 1999). Nei Mammiferi, la S100 è stata trovata principalmente nel nucleo e nel citoplasma di astrociti, oligodendrociti, ependimociti, glia radiale e cellule di Schwann (Cocchia 1981); comunque alcuni studi riportano la positività alla S100 anche nei neuroni (Cocchia 1981). Sebbene molti studi confermano la presenza della proteina S100 in astrociti di Mammifero (Langley et al. 1984), la positività a tale proteina è stata riscontrata anche in una sottopopolazione di oligodendrociti di ratti (Rickmann e Wolff 1995), e oligodendrociti immaturi di gatti (Dyck et al. 1993) e Uccelli (Linser e Perkins 1987). Inoltre la proteina S100 è stata trovata anche in ependimociti e

nella glia radiale dei Mammiferi (Cocchia 1981; Engel e Muller 1989) e Pesci (Manso et al. 1997). Pochi dati si conoscono circa l'espressione della S100 nel SNC nei Rettili, bassi Vertebrati amnioti, che presentano un'elevata capacità di riparo del SNC in seguito a danni (Lang et al. 1998-2002).

# **CAPITOLO 2**

# **IL CADMIO**

DOTTORATO DI RICERCA BIOLOGIA AVANZATA XXII CICLO. La ricerca ha dimostrato che il progressivo inquinamento ambientale ed alimentare che accompagna e caratterizza la società industrializzata mette in crisi il nostro sistema detossificante, producendo una diffusione di malattie cronico-degenerative, quali cancro, immunodeficienze, autismo, Alzheimer e la comparsa di sintomatologie difficilmente inquadrabili. I metalli tossici, mercurio, piombo, alluminio, cadmio, arsenico sono certamente i principali responsabili; essi sono sostanze inquinanti che penetrano in maniera insidiosa nel nostro organismo attraverso cibi, bevande, aria atmosferica, abiti e trasporti. I metalli si accumulano lentamente e progressivamente negli organi (ossa, fegato, rene, SNC, tessuto adiposo) e nei tessuti dove svolgono la loro azione dannosa. L'eccesso di metalli nel nostro corpo blocca l'attività di numerosi complessi enzimatici a molti e diversi livelli, con conseguente danno metabolico ed energetico, inducendo una vasta gamma di sintomi spesso di difficile interpretazione (Rabitti 1998).

### 2.1 Storia e Caratteristiche del Cadmio

Il cadmio (Cd) (dal latino *cadmia*, a sua volta dal greco *kadmeia*, calamina) fu scoperto nel 1817 in Germania dal chimico tedesco Friedrich Strohmeyer, che lo individuò nelle incrostazioni presenti all'interno di una fornace di zinco (http://www.webelements.com/cadmium/). Il cadmio è un metallo di transizione tossico, relativamente raro; dall'aspetto duttile e malleabile, di colore bianco-argenteo con riflessi azzurrognoli, numero atomico 48 e peso atomico 112.4. Presenta un solo stato di ossidazione (<sup>2+</sup>), ma può formare complessi tetraedrici con valenza 4, complessi alogenati del tipo  $[CdX_3]$  e  $[CdX_6]^{4-}$  e sali stabili come il cadmiato sodico (Na<sub>2</sub>[Cd(HO)<sub>4</sub>]) (Lucisano 1994). Fonde a 321 °C, bolle a 765 °C, ha densità di 8,64 g/cm<sup>3</sup>.

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 (<u>http://www.webelements.com/cadmium/</u>). Esso deriva le sue proprietà tossicologiche dalla somiglianza chimica allo zinco, un micronutriente essenziale per le piante e gli animali; ma rispetto allo zinco tende a formare composti più complessi (www.ing.unitn.it/~..). Il cadmio è distribuito uniformemente lungo la crosta terrestre ed essendo un elemento volatile può essere trasportato a grandi distanze dagli agenti atmosferici. Rari sono i giacimenti di minerali nei quali può essere rinvenuto come componente principale (ad esempio la greenockite o CdS) (www.dsa.unipr.it..).

### 2.1.1 APPLICAZIONI

Il cadmio viene usato soprattutto nella cadmiatura, nella fabbricazione di cuscinetti e nella saldatura. La sua produzione è pari a 17.000 tonnellate, con conseguente emissione in atmosfera di 7.000 tonnellate di metallo. Per quanto poco utilizzato allo stato puro, il cadmio è un costituente di molte leghe così come molto utilizzati sono i suoi composti (ossido, solfato e cloruri), alcuni dei quali (antranilato di Cd) un tempo trovavano impiego, per altro attualmente abbandonato, nella pratica terapeutica guali antielmintici, acaricidi, nematodici ed antisettici (Venugopal e Luckey 1978). In lega con piombo, stagno e bismuto viene utilizzato per preparare metalli fusibili che trovano impiego nella produzione di varie apparecchiature elettriche. 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, porcellane e ceramiche. Il solfuro di cadmio (CdS), un composto giallo chiaro che si ottiene come precipitato da soluzioni di sali di cadmio, è usato come pigmento e trova applicazione anche nella realizzazione di celle fotovoltaiche; le celle elettrochimiche a nickel-cadmio inoltre sono ampiamente utilizzate in settori specialistici (http://web.romascuola.net...).

### **2.2** Esposizione

Le fonti di contaminazione di metalli pesanti hanno due origini: naturale ed antropica. La fonte naturale è rappresentata dal substrato geologico stesso mentre, tra le sorgenti di origine antropica le più rilevanti sono dovute alle attività civili, industriali e alle pratiche agricole (Casalicchio 2000). Tra le pratiche agricole di particolare interesse e rilevanza è il riutilizzo nell'agricoltura di fanghi e compost ricchi in sostanze organiche e minerali, prodotti dalla depurazione delle acque di scarico urbane (reflue), la cui principale limitazione d'uso dipende dai loro contenuti in metalli pesanti (Adriano 1986). Le condizioni ambientali ed in particolare il pH, il potenziale di ossido-riduzione e la presenza di composti organici o inorganici, giocano un ruolo fondamentale nella speciazione degli elementi e quindi nella loro biodisponibilità (Kabata-Pendias 1992). In particolare, le variazioni di pH e più in generale le alterazioni delle proprietà chimiche del suolo registrate nella rizosfera (Ross 1994; Kashem e Singh 2002) determinano per questi elementi un decorso differente da quello nella grande massa di terreno (Zaccheo e Crippa 2004). Fra le fonti di contaminazione ambientale Stoeppler (1991) ricorda come il cadmio sia altresì presente nei fertilizzanti, nelle acque di scarico e nei fanghi di origine urbana. Gli studi in questo senso indicano che nelle aree non contaminate la presenza naturale del cadmio ammonta alle concentrazioni di seguito riportate (Tab.1):

Comparto ambientale	Concentrazione (ppb)
Acque dolci	0.05-0.2
Oceani	0.01-0.1
Sedimenti dei fiumi dei laghi	5.000
Sedimenti marini	30.100
Suoli di origine vulcanica	10-1.000
Suoli vulcanici	4.500
Rocce ignee	1-600
Rocce fosfatiche	100.000

Гаb.	1
------	---

Questi valori, che vengono comunemente ritenuti non tossici, possono divenirlo nell'evenienza che il metallo sia in forma disponibile per una sua assunzione e, al proposito, va altresì sottolineato come queste concentrazioni possano essere oggetto di marcato incremento per fenomeni di bioaccumulo che possono determinare un incremento a valori tali da far risultare alcune specie fonte di tossicità per l'uomo o altri animali (Shuster e Pringle 1969; Zaroogian e Cheer 1976; Zaroogian 1979). Ad esempio, gli effetti tossici sui microrganismi con inibizione della crescita si riscontrano con una concentrazione di cadmio pari a circa 0,25 mg/l (www.dsa.unipr.it/trezzo/uni..). Sebbene il Cd risulti alquanto idrosolubile, la presenza di ioni solfuro in grado di precipitare il metallo come CdS fa si che l'uomo, in genere, assuma solo una piccola percentuale del cadmio direttamente dall'acqua potabile o dall'aria. Fanno eccezione gli individui che vivono in prossimità di miniere e di fonderie, in modo particolare quelle che producono zinco. Esistono aree isolate in cui la concentrazione di cadmio presente nell'acqua potabile è talmente elevata che la comune assunzione giornaliera risulta raddoppiata. Anche i fumatori risultano esposti al cadmio, assorbito da parte delle foglie di tabacco, dal suolo e dall'acqua. Si pensi al tal proposito che un pacchetto di sigarette può portare all'inalazione di circa 2-4 µg di Cd (www.assincer.it/assincer/..).

Quasi tutti gli alimenti contengono cadmio in misura variabile per effetto della contaminazione ambientale (http://www.izslt.it/csra..). I frutti di mare (molluschi) e gli organi interni, in particolare i reni, possiedono le concentrazioni più elevate (100  $\mu$ g o più/kg) rispetto agli altri alimenti. Occorre precisare che la maggior quantità di metallo presente nell'alimentazione deriva in genere dalle patate, dal grano, dal riso e altri cereali (www.ing.unitn.it/..).

### 2.3 Assorbimento e Metabolismo del Cadmio

Le principali vie di assorbimento per l'uomo e gli animali sono rappresentate principalmente da quella inalatoria e gastroenterica; la prima riveste particolare importanza soprattutto per l'uomo, che può risultare esposto al cadmio per motivi occupazionali (dal 10 al 40% della quantità inalata viene assorbita dal polmone). L'entità nel tratto gastroenterico è influenzata non solo dalla solubilità del sale ma anche dai livelli di zinco presenti nell'organismo (l'intestino assorbe dallo 0.5% ad un massimo del 12% della quantità ingerita) (Johnson e Sigman 1971; McLellan et al. 1978; Friberg et al. 1986; Nordberg et al. 1985). Il Cd in circolazione nel corpo è prevalentemente intraeritrocitario (90-95%), fissato all'emoglobina e alla metallotioneina (MT), nel sangue esso ha un'emivita di oltre 2 ore; nel rene e nel fegato si deposita in notevole circa 1'80% (almeno 1/3di quella presente normalmente quantità, nell'organismo) permanendovi per 15-20 anni (Waalkes 2003). E' scarsamente eliminato con urine e feci e la sua emivita globale nell'organismo è di 10-30 anni, con conseguente aumento della concentrazione nei tessuti per tutta la vita. L'assorbimento per via cutanea è praticamente trascurabile (Panebianco 1976). Non passa la barriera placentare, ma può bloccare e ridurre il passaggio di zinco e rame, essenziali per lo sviluppo del feto (www.webalice.it/..). L'assunzione oligoelementi metallici da parte degli organismi è mediata degli dall'alimentazione: lo zinco e il rame, per esempio, sono assorbiti attraverso l'apparato gastrointestinale, messi in circolo sottoforma di complessi proteici con l'albumina e rapidamente distribuiti agli organi (Cousins 1985). Il meccanismo di trasporto dei metalli nelle cellule non è completamente chiarito. Specifici trasportatori denominati MIT (Metal Iron Transporter) sono implicati nell'uptake, nella distribuzione intracellulare e nella loro eventuale escrezione (Knoop et al. 2005). All'interno della cellula i metalli possono reagire con vari

componenti citosolici, essere compartimentalizzati in organuli come i lisosomi e i mitocondri o essere trasportati nel nucleo (Ahearn et al. 2004). E' noto che la maggior parte dei metalli risultano notevolmente tossici se presenti in forma libera nella cellula. Essi non subiscono biotrasformazione e la tolleranza biologica nei loro confronti non può essere realizzata, come nel caso delle sostanze organiche, da processi di demolizione in prodotti meno tossici. Pertanto la loro omeostasi è finemente regolata e la richiesta fisiologica di oligoelementi metallici è correlata a meccanismi molecolari adibiti al trasporto e al deposito di metalli in forma non tossica. Il cadmio penetra nella cellula utilizzando i canali del calcio voltaggio dipendenti o associati a recettori trans-membrana. Una volta penetrato può legarsi con vari costituenti citoplasmatici e nucleari interferendo con i normali processi di proliferazione e differenziamento cellulare (Beyersmann e Hechtenberg 1997). Il cadmio, essendo chimicamente molto simile allo zinco e al calcio, interferisce con la loro omeostasi e si sostituisce nei meccanismi di trasporto e nei siti di legame (Kiss e Osipenko 1994). In particolare può sostituirsi al calcio nel legame alla calmodulina, proteina preposta alla regolazione di numerosi processi calcio-dipedenti, il che si traduce in un'azione calcio-agonista da parte del metallo, che può determinare, in funzione della sua concentrazione, un'attivazione o un'inibizione degli enzimi calmodulino-sensibili, quali la fosfodiesterasi e l'adenosin-trifosfatasi Ca/Mg dipendente; il fenomeno trova convalida nel fatto che un trattamento con calmodulina-inibitori si dimostra in grado di apportare miglioramenti al quadro tossico (Donnelly 1978; Forsen et al. 1979; Anderson et al. 1984; Cox e Harrison 1983; Richard et al. 1985).

Il cadmio si lega ai residui cisteinici delle proteine e, con alta affinità, anche ai domini Zinc-binding di molte metalloproteine, interferendo, o addirittura bloccando, le funzioni cellulari Zn-dipendenti. Il Cd, inoltre, causa

perossidazione dei lipidi e, nel nucleo, rotture nel DNA con inibizione dei meccanismi di riparo (Hassoun e Stohs 1996). Molti di questi effetti sono legati alla produzione di specie ossigeno reattive (ROS) e/o all'abbassamento dei livelli di glutatione (Stohs e Bagchi 1995) e degli enzimi antiossidanti (Casalino et al. 2002). Inoltre induce inibizione del rilascio di neurotrasmettitori (acetilcolina, MAO), inibizione del riassorbimento a livello sinaptico di colina, GABA (acido  $\gamma$ -aminobutirrico), acido glutammico e catecolamine, necrosi delle cellule nervose, osteoporosi, osteomalacia, ipertensione arteriosa, arteriosclerosi, impotenza, necrosi tubulare renale, iperattività e disturbi dell'apprendimento, alopecia, anemia, malattie cardiovascolari, fertilità (www.mineral-test...).

Concentrazioni citotossiche di cadmio esercitano marcati effetti anche sulla sintesi proteica che risulta in alcuni casi inibita, in altri marcatamente aumentata soprattutto per quanto riguarda alcune specifiche classi di proteine come i protooncogeni (Jin e Ringertz 1990), geni soppressori tumorali e proteine a funzione protettiva, come le metallotioneine (Theocharis et al. 2003) e le heat shock proteins, la superossido-dismutasi, la catalasi e l'ubiquitina (Zikic et al. 2001). Queste proteine agiscono con meccanismi diversi: chelano il metallo prevenendone gli effetti tossici, rimuovono le specie ossigeno reattive, riparano i danni alle membrane plasmatiche e al DNA, rinaturano o degradano le proteine denaturate. Le Metallotioneine (MT), proteine di basso peso molecolare (6-8 KDa) e ricche di residui cisteinici, sono in grado di formare complessi con i metalli pesanti. L'espressione delle MT è indotta in seguito all'esposizione dell'organismo ad elevate concentrazioni di metalli pesanti e questa risposta costituisce una difesa rapida ed efficiente da parte degli organismi viventi all'esposizione indesiderata ai metalli tossici come il cadmio. Il Cd induce la sintesi epatica e renale di metallotioneina, e se questo meccanismo di difesa è sopraffatto il cadmio danneggia i tubuli contorti prossimali, causando proteinuria (Robbins 1999).



### 2.4 ASPETTI TOSSICOLOGICI

Il Cd è un minerale estremamente tossico, secondo alcuni autori circa mille volte più tossico del piombo, al quale si avvicina dal punto di vista tossicologico, cioè per quanto riguarda gli effetti sull'organismo umano (www.erboristeriaedaltro..). In funzione delle sue azioni su numerosi sistemi enzimatici, il cadmio si dimostra in grado di esplicare notevoli effetti tossici, con variazioni connesse a differenze nella via di assorbimento, nel dosaggio, nella specie e nel sesso. Il fegato e i reni sono le zone in cui si depositano cadmio e zinco; il cadmio poi si stabilisce nelle arterie, aumentando la pressione arteriosa

e causando arteriosclerosi. Il cadmio può aumentare lo spessore della membrana basale dei piccoli vasi e dei capillari riducendo la circolazione (Zikic 1995). Nelle donne viene interessata anche la circolazione uterina con conseguente possibile prematurità o deformità del feto (www.ilsecondorinascimento.it..). I suoi composti sono irritanti: gli effetti acuti comprendono irritazioni alla cute, mucosa nasale e bronchiale, edema polmonare; gli effetti tossici cronici sono a carico del rene (Robbins 1999). La tossicità del Cd nell'organismo viene tenuta sotto controllo dallo zinco, ed un'interferenza con il metabolismo di quest'ultimo potrebbe favorire l'azione tossica del cadmio. La presenza dello zinco sembra stimoli in ambito epatico la sintesi di MT capaci di bloccare cadmio bivalente, mentre un basso tenore alimentare di rame può diminuire la tolleranza al cadmio (Ferrando 1971). Sulla base d'indagini effettuate su più di 1000 persone nel corso di un periodo di 10 anni, uno studio recente (Steassen et al. 1999) ha confermato che l'esposizione bassa-moderata al cadmio è associata alla demineralizzazione dello scheletro. Ciò porta ad una maggiore fragilità delle ossa e al rischio di fratture. In Giappone si è verificata una grave forma di inquinamento ambientale tra gli anni '60 e '70: il più grave incidente ambientale nel mondo riguardante il cadmio è avvenuto nella regione di Jintsu, dove le colture di riso per il consumo locale venivano effettuate con acqua di irrigazione attinta da un fiume contaminato da cadmio proveniente da operazioni di estrazione e fusione dello zinco che si svolgevano a monte della regione stessa. La malattia, riscontrata nel 1946, è caratterizzata da osteomalacia con fratture patologiche, con incidenza prevalente fra donne di età medio - avanzata. I sintomi prevalenti erano dolori ai reni, da cui il nome dato alla sindrome "Itai, itai" (grido di dolore equivalente a "ahi, ahi") così denominata per gli acuti dolori localizzati alle articolazioni (Nogawa e Kido 1993). Diverse malattie sono connesse all'inquinamento da cadmio, la malattia itai - itai, che scoppiò nel

bacino del fiume Jinzu-gawa nella prefettura di Toyama, i disturbi respiratori delle cinture industriali di Tokyo - Yokohama, Nagoya e Osaka - Kobe. Queste forme di inquinamento furono il risultato delle priorità date alla rapida crescita economica e dell'abbassamento degli standard per la protezione della salute e della sicurezza della popolazione. Le conseguenze portarono il Giappone a stabilire dagli anni '60 in poi regole rigide per proteggere l'ambiente. Test di laboratorio hanno confermato che il Cd può indurre una serie di tumori al fegato, ai polmoni e alla prostata (Nogawa e Kido1993; Ogawa et al. 2004). L'agenzia internazionale per le ricerche sul cancro (International Agency for Research on Cancer-IARC) ha classificato il cadmio come sostanza cancerogena per le persone (categoria I, IARC) (Huff 2007). Prima di essere vietato dall'EPA (Environmenta Protection Agency [Agenzia per la protezione dell'Ambiente]) negli USA alcuni composti chimici contenenti cadmio erano usati come fungicidi per i prati da golf e domestici (www.ecplanet.com/canale/salute....).

### 2.4.1 Tossicità del Cadmio su Pesci e Rettili

Gli effetti del cadmio sugli animali terrestri e acquatici includono tossicità acuta e cronica. I principali segni dell'avvelenamento da cadmio nei mammiferi sono anemia, articolazioni ingrossate, cattivo stato del pelo, riduzione della crescita e lesioni al fegato e ai reni (http://eurosalus.com/..). Gli organismi acquatici sono molto più vulnerabili rispetto a quelli terrestri. Pesci presenti in aree contaminate sono spesso esposti ad alte concentrazioni di cadmio, che può causare cambiamenti morfologici di variabile gravità in vari organi (Lemaire-Gony e Lemaire 1992; Battaglini et al. 1993). I pesci esposti a concentrazioni elevate di cadmio sviluppano rapidamente una carenza di calcio e una bassa concentrazione di emoglobina nel sangue. Alti livelli di cadmio sono stati individuati nei reni, fegato e branchie (Cattani et al. 1996). La tossicità del
metallo varia molto da specie a specie. Nel pesce gatto le concentrazioni di metallo sono inversamente correlate al pH e al calcio dell'acqua (Bentley 1991). L'assorbimento del Cd attraverso il tratto digerente potrebbe essere mediato da aminoacidi, come sembrano confermare dei risultati preliminari ottenuti in Centropristis striata (Fair e Stick 1984). Nella carpa Cyprinus carpio esposta al cadmio è stata osservata una conseguente diminuzione dello zinco e dell'attività di metalloenzimi quali la fosfatasi alcalina (Ikeda et al. 1986). Quanto riportato è sufficiente per indicare la pericolosità di questo elemento non soltanto per l'acquacoltura ma anche per la salute umana. E' stato dimostrato, ancora, che il cadmio induce apoptosi nelle cellule epiteliali della carpa (Iger et al. 1994) e trota (Lyons-Alcantara et al. 1998). Per quanto riguarda gli animali terrestri, i rettili solo negli ultimi tempi sono stati considerati modelli per studi ecotossicologici (Lambert 2004; Mann et al. 2006) e la maggior parte degli studi concernenti questi organismi è rivolta unicamente all'analisi dell'accumulo di metalli negli organi, in seguito a campionamento degli animali in siti inquinati (Hopkins 2006). Sebbene un numero sostanziale di questi studi descriva l'accumulo di cadmio (e altri elementi) in squamati (Campbell e Campbell 2000; Linder e Grillitsch 2000; Campbell e Campbell 2001; e più recentemente Burger et al. 2004), ci sono pochi lavori sperimentali che valutano la cinetica e i susseguenti effetti dell'accumulo di cadmio nei rettili, e molto poco è noto circa l'assimilazione e l'accumulo di contaminanti inorganici nel loro organismo. Recentemente Mann e collaboratori (2006) hanno valutato l'assimilazione di cadmio nella lucertola europea Podarcis carbonelli esposta oralmente al Cd per 21 settimane, riscontrando che questo metallo si accumula inizialmente nell'intestino e lentamente negli altri tessuti, quali fegato e reni. Studi riguardo lucertole orientali (S. undulatus) e occidentali (S. occidentalis) hanno messo in evidenza che queste specie di rettili si rivelano adatte come organismi di

laboratorio per investigazioni tossicologiche. Queste lucertole, infatti, sono esposte a contaminanti ambientali presenti nel suolo in tutti gli stadi di vita a partire dalla deposizione dell'uovo nel terreno. Così il contatto con il suolo contaminato rappresenta un rischio di esposizione agli inquinanti iniziando dall'uovo e continuando per tutta la gestazione dello stesso. Ma anche gli adulti continuano ad essere esposti direttamente attraverso il contatto e l'ingestione di cibo contaminato (Brasfield et al. 2002; Talent et al. 2002).

### 2.5 NEUROTOSSICITA' DEL CADMIO

Solo recentemente il cadmio è stato riconosciuto come neurotossina in quanto danneggia il sistema nervoso. Nell'uomo, in particolare, l'esposizione occupazionale al Cd è associata a disordini neuronali (Hart et al. 1989). Il cadmio produce neurotossicità causando complesse patologie che includono disfunzioni neurologiche in adulti e bambini (Shukla e Singhal 1984; Hart et al. 1989), alterazioni neurochimiche del SNC (Gupta et al. 1993-1995; Gutierrez-Reves et al. 1998; Antonio et al. 1999) e alterazioni nel comportamento di giovani ratti (Wong e Klaassen 1982; Holloway e Thor 1988). Nei primi trenta giorni di vita, il cadmio comporta aumento dell'attività locomotoria, della sintesi del turnover delle MAO (mono-ammino ossidasi). Anomalie del e comportamento diventano più apparenti con la maturità degli animali. Inoltre, studi condotti su topi neonati hanno rivelato che iniezioni intraperitoneali di CdCl<sub>2</sub> provocano nel cervello diversi danni istopatologici come edema, pinocitosi e gli animali che riescono a sopravvivere fino all'ottava settimana di vita presentano anomalie comportamentali e deficit cerebrali persistenti. Inoltre, indagini ultrastrutturali mostrano emorragia e cambiamento strutturale dei capillari (Webster e Valois 1981). I danni sono quindi maggiori in organismi giovani, questo è sicuramente dovuto alla presenza di una barriera ematoencefalica non completamente sviluppata (Pal et al. 1993). Modelli

> DOTTORATO DI RICERCA BIOLOGIA AVANZATA XXII CICLO

animali rivelano che il Cd induce degenerazione dei gangli basali in associazione con disfunzioni comportamentali come iperattività e perdita dell'equilibrio (Webster e Valois 1981). Alcuni esperimenti condotti su ratto hanno evidenziato che il Cd produce danni ossidativi in nervi ottici isolati (Fern et al. 1996) ed in colture di neuroni corticali (Lopez et al. 2003). Inoltre, iniezioni di Cd producono alterazioni in neurotrasmettitori come serotonina cerebrale e acetilcolina corticale provocando disturbi comportamentali e perdita di memoria (Das et al. 1993). Come per molti altri elementi, la sua correlazione con la neurodegenerazione è evidente in situazioni di esposizione acuta: è stato riportato ad esempio che l'intossicazione acuta da Cd in lavoratori addetti alla saldatura comporta la manifestazione di sintomi parkinsoniani (Okuda et al. 1997). L'esposizione al cadmio sembra essere la causa della sclerosi laterale amotrofica (Bar-Sela et al. 2001) e del morbo di Parkinson (Okuda et al. 1997). I meccanismi coinvolti nella neurotossicità sono scarsamente compresi. Lo stress ossidativo è stato proposto come meccanismo alla basa della tossicità del cadmio in diversi tessuti come rene (Bagchi et al. 1997), fegato (Liu et al. 2002), e cervello (Kumar et al. 1996). Il cadmio, infatti, causa formazione dei ROS e perossidazione lipidica delle membrane (Shaikh et al. 1999; Szuster-Ciesielska et al. 2000). Non è conosciuto il meccanismo specifico con cui il Cd causa la formazione di radicali liberi (Stohs e Bagchi 1995). Wang e collaboratori (2004) hanno ipotizzato un meccanismo in cui l'inibizione del complesso III della catena di trasporto mitocondriale comporta il blocco del trasferimento elettronico e l'accumulo del semiubichinone, il quale, essendo instabile a sua volta, cede un elettrone all'ossigeno molecolare con formazione di O2<sup>-</sup>. Lafuente et collaboratori (2005) hanno valutato possibili cambiamenti del contenuto dell'acido g-amminobutirrico (GABA) e della taurina nell'ipotalamo, eminenza mediana e striato dopo esposizione a diverse dosi di cadmio. Essi

hanno osservato che, in effetti, il cadmio comporta decremento globale del contenuto di GABA e taurina nelle diverse aree cerebrali studiate.

Diversi studi sono stati svolti sull'effetto tossico di metalli pesanti sulla glia, grazie ai quali è stato possibile osservare che metalli come Cd, Tl, Zn e Pb inducono cambiamenti morfologici nelle popolazioni di cellule gliali (Reyners et al. 1982) ed incremento dell'espressione di MT negli astrociti (Sawada et al. 1994). E' stato osservato che il cobalto ed il cadmio bloccano la differenziazione morfologica di colture di astrociti in vitro provocando il blocco della cAMP (MacVicar 1987). Il Cd si accumula nel cervello, danneggiando sia i neuroni sia le cellule gliali e causa apoptosi negli oligodendrociti, con attivazione della Caspase 9 (Almazan et al. 2000; Watjen 2002). Secondo alcuni studi l'esposizione al Cd causa danno alla sostanza bianca del SNC (Fern et al. 1996), determina aumento del calcio citosolico negli astrociti, con aumento dei ROS e danno mitocondriale (Yang et al. 2007). Il piombo ed il cadmio evidentemente modulano la differenziazione delle cellule gliali in quanto incrementano il tasso di accrescimento e allo stesso tempo comportano il decremento dell'espressione di markers strutturali (GFAP, S100) (Stark et al. 1992).

### 2.6 CADMIO E APOPTOSI

Un danno alle cellule, comprese quelle del tessuto nervoso, da parte di agenti chimici o altri stimoli tossici può innescare una complessa serie di eventi che culmina nella morte cellulare. L'apoptosi, o morte cellulare programmata, non avviene solo in seguito ad eventi patologici, ma è un meccanismo utilizzato dall'organismo per il normale sviluppo fisiologico. Ad esempio, durante lo sviluppo del SNC e SNP, molti neuroni muoiono per apoptosi, processo che prende il nome di "sinaptogenesi". Dal punto di vista morfologico, le cellule apoptotiche perdono contatto con le cellule circostanti e vanno incontro a

condensazione e frammentazione. Gli organelli citoplasmatici si compattano, ma la caratteristica principale è la condensazione della cromatina, accompagnata da frammentazione del DNA. In seguito, frammenti di materiale nucleare vengono circondati dalla membrana plasmatica e conferiscono alla cellula un aspetto a bolle (blebbing). La membrana plasmatica, che delimita queste protuberanze, si salda e dà origine ai "corpi apoptotici". Questi ultimi si staccano dalla cellula mantenendosi integri ed in tal modo impediscono la dispersione del materiale cellulare, così il danno non viene propagato alle cellule vicine. A differenza del rapido turnover delle cellule dei tessuti in proliferazione, i neuroni generalmente sopravvivono per tutta la durata della vita di un organismo. Ciò consente il mantenimento delle specifiche connessioni neuronali e di conseguenza ne garantisce la conservazione di molte delle funzioni. Sfortunatamente, in molti individui si verifica una morte eccessiva di una o più popolazioni neuronali, in seguito ad una malattia o ad un insulto tossico.

I fattori ambientali e genetici che scatenano l'apoptosi neuronale e gliale possono essere differenti in ambito fisiologico o patologico, ma molti degli eventi biochimici che eseguono il processo di morte cellulare sono estremamente conservati. Segnali biochimici in grado di dare inizio al processo apoptotico sono molteplici, i più noti sono la carenza del fattore neurotrofico, che si pensa essere coinvolto in varie patologie degenerative, l'eccitotossicità, determinata dall'iperattivazione dei recettori per il glutammato, lo stress ossidativo dovuto ai ROS e l'esposizione ad insulti di tipo tossico (Mattson 2000). Il mitocondrio svolge un ruolo di primo piano nell'esecuzione del programma di morte cellulare. Nelle cellule che entrano in apoptosi, la produzione di ROS aumenta notevolmente e si assiste all'apertura di pori nella membrana mitocondriale e al rilascio nel citoplasma del citocromo C, normalmente localizzato tra la membrana esterna e quella interna.

Fondamentali in questa fase sono le proteine della famiglia Bcl-2 (B-cell Lymphoma-2) che comprende fattori sia pro- che anti-apoptotici. Tra gli antiapoptotici i più noti sono Bcl-2 e Bcl-xL, mentre tra i promotori ricordiamo Bax (Bcl-2 associated X-protein), che inattiva Bcl-2, e Bad (Bcl-associated death promoter) (Mattson 2000; Lossi e Merighi 2003). I meccanismi tramite i quali le proteine anti-apoptotiche Bcl-2 esercitano la loro funzione possono essere differenti: "scavenging" dei radicali liberi, soprattutto a livello della membrana, di citoplasmatici segregazione componenti necessari all'esecuzione dell'apoptosi o modulazione dell'apertura dei pori mitocondriali e della concentrazione di Ca<sup>2+</sup>. I veri fattori di esecuzione del programma apoptotico sono, però, le caspasi (Cysteinil Aspartate-specific Proteases), una famiglia di proteasi, presenti nel citoplasma sottoforma di zimogeni ed attivate durante l'apoptosi. Le caspasi umane sono piuttosto numerose e si dividono in iniziatrici (caspasi-2, -8, -9 e -10) ed effettrici (-3, -6 e -7). L'attivazione di questi enzimi è autocatalitica ed avviene tramite un meccanismo a cascata. L'attivazione di una caspase iniziatrice richiede la presenza di un complesso, detto apoptosoma, dove il citocromo C e il fattore APAF1 si legano alla caspase-9 (oppure -12), iniziando la catena di eventi che poi porteranno alla comparsa dei segni morfologici dell'apoptosi, quali il blebbing della membrana e la frammentazione del DNA. Tale frammentazione è operata da una DNAsi, la cui attivazione è dipendente da quella delle caspasi (Artal-Sanz e Tavernarakis 2005). Un'alta dose di cadmio, corrispondente ad un'esposizione acuta, induce sia necrosi sia apoptosi. Il rapporto tra entrambi i tipi di morte cellulare dipende dalla dose e dal tipo di cellula. L'effetto pro-apoptotico del cadmio è mediato da vari pathways di segnali che possono essere caspase-dipendenti o caspaseindipendenti (Linder e Grillitsch 2000). In entrambi i processi apoptotici è stato descritto un incremento del contributo di calcio intracellulare (Beyersmann e

Hechtenberg 1997). Dunque gli eventi apoptotici indotti dal cadmio derivano da un'interferenza nell'omeostasi probabilmente del calcio intracellulare. Zou et al. (1997) hanno dimostrato che il cadmio agisce alterando la permeabilità delle membrane mitocondriali causando la traslocazione del Citocromo C nel citoplasma e determinando attivazione delle Caspasi (Risso-de Faverney et al. 2004; Shimizu et al. 1999). Molti studi hanno dimostrato che il cadmio risulta tossico per molti tessuti e induce apoptosi in vitro ed in vivo (Ishido et al. 1995-1998; Habeebu et al. 1998). Risso-de Faverney et al. (2001) avevano scoperto che l'apoptosi indotta dal Cd in epatociti di trota era dovuta all'attivazione della Caspase-3 e induzione della frammentazione del DNA. Ricerche successive svolte dagli stessi autori hanno messo in luce che il Cd induce l'attivazione della caspase -3, -9 e -8 ed il rilascio del citocromo C dai mitocondri (Risso-de Faverney et al. 2004). Il rilascio del citocromo C sembra giocare un ruolo chiave nell'attivazione di Apaf-1, che come detto sopra legandosi alla caspase-9 (oppure -12), determina l'inizio della catena di eventi che poi porteranno alla comparsa dei segni morfologici dell'apoptosi, quali il blebbing della membrana e la frammentazione del DNA (Green 1998; Green e Kroemer 1998).

# **CAPITOLO 3**

# **SCOPO DELLA RICERCA**

Lo scopo della presente ricerca è valutare la tossicità del cadmio sull'encefalo e sulla neuroglia di Pesci e Rettili. Come modello sperimentale tra i Pesci è stato scelto Danio rerio (Zebrafish), e tra i Rettili la lucertola Podarcis sicula. I Pesci Teleostei rappresentano un modello sperimentale in continua ascesa, in quanto presentano delle caratteristiche peculiari nella struttura encefalica e nella sua formazione, inoltre sono di forte interesse per le applicazioni in biotecnologie animali ed ambientali. I Rettili possono essere considerati degli ottimi bioindicatori della contaminazione ambientale da cadmio, in quanto hanno colonizzato numerosi habitat (acque dolci e salate, ambienti terrestri). Ad oggi poco conosciuti sono gli effetti tossici di questo metallo pesante sulla neuroglia di entrambe le specie. E' apparso interessante, quindi, affrontare uno studio comparato che valuta come, e se, cambia la risposta alla neurotossicità indotta dal cadmio in specie che vivono in ambienti diversi. Lo studio è stato articolato su livelli differenti, integrando diverse metodologie, come l'analisi istologica ed immunoistochimica, tecniche di Microscopia Elettronica a Trasmissione e la Spettroscopia ad Assorbimento Atomico.

# **CAPITOLO 4**

# **MATERIALI E METODI**

# 4.1 MATERIALE BIOLOGICO

Per la valutazione della tossicità dovuta al cadmio sono stati utilizzati esemplari adulti di *Podarcis sicula* e di *Danio rerio*. Le lucertole, catturate nei dintorni di Napoli, sono state tenute in terrari in condizioni di temperatura e umidità controllati, nutriti a libitum con larve di mosche. I pesci, acquistati in attività commerciali d'acquariologia, sono stati stabulati ed acclimatati in vasche dotate di ossigenatore, mantenuti ad una temperatura di 26 °C con fotoperiodo naturale e nutriti con cibo commerciale.

# 4.2 TRATTAMENTO ACUTO IN VIVO CON CdCl2

Esemplari adulti di *Podarcis sicula* sono stati esposti a Cd, sottoforma di cloruro di cadmio (CdCl<sub>2</sub>), come di seguito descritto: una singola dose di CdCl<sub>2</sub> pari a 2,0 mg/Kg di peso corporeo è stata somministrata per via intraperitoneale su un gruppo di animali. Un secondo gruppo di animali è stato utilizzato come controllo e trattato con soluzione fisiologica. Esemplari adulti di Zebrafish, invece, sono stati sono stati suddivisi in due vasche: una di controllo con acqua incontaminata ed una in cui è stato aggiunto cloruro di cadmio (CdCl<sub>2</sub>) in ragione di 1,0 mg/L. Per valutare l'andamento dei danni, sono state scelte tre finestre temporali in cui andare a cercare le specifiche alterazioni, e precisamente a 2, 7 e 16 giorni. Gli esemplari raccolti sono stati anestetizzati in ghiaccio ed immediatamente sacrificati con taglio cervicale.

# 4.3 Determinazione del Contenuto di Cadmio

La determinazione di cadmio totale nell'encefalo degli animali trattati rispetto ai controlli è stata eseguita mediante Spettrofotometria ad Assorbimento Atomico

utilizzando lo strumento Varian AA280FS (AAS) Atomic Absorption Spectrometer. Gli encefali sono stati rapidamente rimossi dalla scatola cranica, pesati e congelati a -80°C. La metodica utilizzata per la determinazione del metallo è APAT IRSA-CNR, Sezione 3000, "Metalli e specie metalliche", divisione 3010, "Trattamento preliminare dei campioni per l'analisi dei metalli mediante mineralizzazione attraverso il sistema aperto con acido nitrico e cloridrico, analizzati attraverso lo spettrofotometro ad assorbimento atomico in fiamma". Procedimento con il sistema aperto - Mineralizzazione con acido nitrico e cloridrico. Il campione è stato trasferito in una beuta, a cui si è aggiunto 3 mL di acido nitrico, riscaldato su una piastra e fatto evaporare, evitando di raggiungere l'ebollizione. Successivamente la soluzione ottenuta è stata raffreddata, sono stati aggiunti 5 mL di acido nitrico, coprendo con un vetro di orologio e nuovamente riscaldata, aumentando la temperatura fino ad ottenere un leggero riflusso. Il digestione riscaldamento è proseguito fino a completa del campione. successivamente la soluzione è stata fatta evaporare fino ad un volume di 5 mL e raffreddata nuovamente. Sono stati aggiunti 10 mL di acido cloridrico e 15 mL di acqua. La soluzione è stata riscaldata per altri 15 minuti, per sciogliere il precipitato o il residuo, raffreddata e trasferita in un matraccio; le pareti della beuta ed il vetro di orologio sono stati lavati con acqua versandola, dopo filtrazione, nello stesso matraccio. Infine questa soluzione è stata portata a volume ed analizzata mediante lo spettrofotometro ad assorbimento atomico.

### 4.4 Indagini Isto-Morfologiche

Alla data prestabilita, gli animali sono stati sacrificati mediante decapitazione e gli encefali rapidamente rimossi dalla scatola cranica sono stati fissati in Bouin per 24 ore, disidratati in scale successive di alcool ed inclusi in paraffina a 56°C. I pezzi raffreddati e montati sul portapezzo sono stati sezionati, saggittalmente, al microtomo ad uno spessore di 6 um. Su sezioni seriali di encefalo sono state eseguite specifiche colorazioni istologiche, di seguito descritte.

### 4.4.1 Emallume-Eosina

Questa tecnica consiste nella colorazione del nucleo con una lacca ematossilinica, come l'emallume acido di Mayer, a cui si fa seguire una colorazione citoplasmatica con un colorante acido, come l'eosina acidificata con 1-3 gocce di acido acetico per 100 ml di soluzione colorante. Avvenuta la colorazione, il preparato viene sciacquato con acqua distillata, disidratato nella serie ascendente degli alcoli (un soggiorno più prolungato nell'alcool a 75° è sufficiente per eliminare un eventuale eccesso di colore), chiarificato con xilolo e montato con balsamo. I nuclei appaiono viola; i territori extranucleari (citoplasma e territori interstiziali) appaiono in rosa, con varia gradazione.

### 4.4.2 TRICROMICA DI MALLORY

Questo metodo, che deriva dall'originale di Mallory (1900), permette un'agevole differenziazione dei tipi cellulari ottenendo un quadro completo degli elementi presenti nell'encefalo (Mazzi, 1977). Per eseguire tale metodica le sezioni sono state sottoposte ai seguenti passaggi: in seguito a sparaffinatura e idratazione con una serie decrescente di alcoli, le sezioni sono trattate con emallume per 1-3 minuti, passate sotto acqua di fonte per 10 minuti, per ottenere il viraggio, e poi in acqua distillata. In seguito le sezioni sono colorate con fucsina acida (0.1%) acidificata con 10 gocce di acido acetico ogni 100 ml di soluzione, lavate in acqua distillata e

quindi trattate con acido fosfomolibdico (1%) per 5 minuti. In seguito si esegue la differenziazione con acqua di fonte, bloccata poi con una soluzione acquosa all'1% di acido acetico. Nella fase successiva, le sezioni vengono nuovamente passate in una soluzione acquosa di acido fosfomolibdico (1%) per 5 minuti, sciacquate con acqua distillata e poi colorate con la miscela Mallory per circa 30-45 minuti al buio. Questa miscela è costituita da una soluzione di orange G, blu di metile e acido ossalico. Terminata la colorazione, le sezioni sono sottoposte ad un accurato lavaggio in acqua distillata per poi essere disidratate attraverso la serie ascendente degli alcoli, schiarite in xilolo ed i vetrini montati con balsamo del Canada. I nuclei si colorano in rosa, i citoplasmi in arancio e il connettivo in azzurro.

### 4.4.3 Cresyl-Violetto

Questa colorazione permette la differenziazione tra neuroni e cellule gliali. In seguito a sparaffinatura e idratazione in una serie decrescente di alcoli, le sezioni di encefalo sono immerse nella Working solution per 20 minuti. La Working solution è preparata a partire da 1 mL di Stock solution in 100 mL di Buffer solution. La Stock solution contiene 2 g di cresyl-violet in 100 mL di acqua distillata; la Buffer solution è composta da 2 g di acetato di sodio in 1 L d'acqua e con l'aggiunta di 3 mL di acido acetico glaciale. Avvenuta la colorazione, le sezioni vengono immerse in acqua di fonte per 10 minuti e brevemente sciacquate in acqua distillata; successivamente disidratate nella serie ascendente degli alcoli chiarificate con xilolo ed i vetrini montati con balsamo del Canada. La glia appare di colore viola chiaro mentre i neuroni appaiono colorati in viola scuro.

### 4.5 Analisi Immunoistochimica

### 4.5.1 METODO AVIDINA-BIOTINA-PEROSSIDASI (ABC)

Le sezioni per l'immunoistochimica sono state montate sui vetrini e dopo sparaffinamento in xilolo e idratazione nella serie decrescente degli alcoli, fino ad acqua distillata, si è proceduto allo smascheramento degli antigeni. Il processo è stato svolto secondo i seguenti passaggi: trattamento con perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% per 10 minuti, inducendo cosi l'inibizione delle perossidasi endogene dei tessuti. Lavaggi delle sezioni in acqua distillata e trattamento di 20 minuti con blocking, (soluzione di albumina serica bovina all'1%), per evitare la formazione di legami aspecifici. Le sezioni sono state poi incubate tutta la notte a 4°C, in camera umida, con i seguenti anticorpi policlonali: anti-GFAP e anti-S100, diluiti 1:100. Dopo aver eseguito 3 lavaggi in tampone fosfato/cloruro di sodio/acqua distillata (in rapporto 1:1:8), le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario biotinilato per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente e poi sottoposte ad un'altra serie di lavaggi con la soluzione di lavaggio suddetta. Successivamente le sezioni sono state sottoposte per 30 minuti ad un trattamento con il complesso rivelatore ABC (Avidina-Biotina-Perossidasi; kit ABC Elite). La biotina dell'anticorpo secondario si va a legare all'avidina del complesso con un amplificazione di quattro volte (1:4). La perossidasi poi si lega ad un cromogeno, applicato dopo il lavaggio dell'ABC, in questo caso la DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma), utilizzata ad una concentrazione di 3 mg in 10 ml di tampone fosfato (PB) e 4 gocce di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. Si sviluppa così un colore marroncino scuro nelle zone positive, successivamente tutti i vetrini sono stati contrastati per 30 secondi con emallume di Mayer, disidratati e montati con balsamo del Canada. Il controllo è stato eseguito omettendo l'uso dell'anticorpo primario. Questa tecnica consente l'identificazione di tutte le componenti gliali e la valutazione di variazioni della distribuzione ed espressione dei markers astrogliali considerati, in condizioni basali e dopo esposizione ai trattamenti.

### 4.5.2 IMMUNOIMPRESSING PER CASPASI-3

Sistema altamente sensibile nella localizzazione di antigeni, estremamente stabile che permette una notevole amplificazione dell'avvenuta reazione tra antigene ed anticorpo. Questa tecnica ha lo scopo di individuare le Caspasi-3, proteasi che sono attivate durante i processi apoptotici ed in grado di indurre la distruzione degli elementi strutturali e funzionali della cellula tipici dell'apoptosi.

Tutte le sezioni, dopo la sparaffinatura, sono state trattate con  $H_2O_2$  allo 0,3% per 10 minuti, necessaria per bloccare le perossidasi endogene del tessuto. Dopo 3 sciacqui in acqua distillata, i preparati sono stati trattati con blocking, soluzione di albumina serica bovina all'1%, per impedire i legami aspecifici. A questo punto le sezioni sono state incubate, over-nigth in camera umida a 4°C con l'anticorpo monoclonale Caspase-3 (Anti Mouse Ig ). Il giorno successivo dopo 3 lavaggi in tampone fosfato/cloruro di sodio/acqua distillata (1:1:8), le sezioni sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario Immpress reagent Anti-Mouse Ig. A questo punto è stata eseguita una serie di lavaggi con il tampone fosfato e poi per la rivelazione è stato utilizzato il cromogeno DAB (3,0 mg in 10 ml di PB), attivato con 4 gocce di  $H_2O_2$  al 3%. Dopo 2 lavaggi in acqua distillata, le sezioni sono state contrastate con emallume acido di Mayer per 30 secondi. Si è quindi passati alla differenziazione in acqua di fonte per 10 minuti e quindi al lavaggio in acqua distillata. Le sezioni portate all'acqua distillata sono state sottoposte a disidratazione nella serie ascendente degli alcoli (fino all'alcool assoluto) e chiarificate in xilolo (2 passaggi da 5 minuti). I vetrini sono stati montati con il balsamo del Canada.

### 4.5.3 TUNEL TEST

Il metodo TUNEL (TdT-mediated dUTP-digoxigenin Nick End Labeling) rivela la frammentazione del DNA in situ a livello delle cellule apoptotiche. I reagenti contenuti nel Kit ApopTag Peroxidase servono ad individuare i terminali liberi 3'-OH del DNA in situ, con l'utilizzo di nucleotidi marcati. I nucleotidi contenuti nel Reaction Buffer sono coniugati con digoxigenin e aggiunti enzimaticamente al DNA ad opera della Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT). Il TdT catalizza il legame dei nucleotidi trifosfato ai terminali 3'-OH della singola e della doppia catena di DNA. I frammenti di DNA marcati con questi nucleotidi sono rilevati grazie all'utilizzo dell'anticorpo anti-digoxigenin opportunamente coniugato con la molecola rivelatrice (perossidasi). La rivelazione avviene attraverso l'impiego della DAB; in quanto la perossidasi sottrae idrogeno alla DAB e lo trasferisce alla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La diamminobenzidina deidrogenata che si forma precipita e si concentra così nelle strutture ove è localizzato l'enzima.

Tutte le sezioni, dopo la normale sparaffinatura, sono immerse in una soluzione di lavaggio costituita da tampone fosfato salino per 5 minuti ed incubate poi con la proteina chinasi per 15 minuti. Per disattivare la perossidasi endogena del tessuto le sezioni sono state trattate con acqua ossigenata al 3% in tampone fosfato salino per 5 minuti. E' stato applicato il Buffer Equilibration per 10 secondi e subito dopo una soluzione costituita da 70% di Reaction Buffer e 30% di TdT enzima, in camera umida a 37°C, per 1 ora. In seguito al lavaggio le sezioni sono state immerse nel Wash Buffer, tampone fosfato salino (PBS), per 3 volte ed è stato applicato

l'anticorpo anti-digoxigenin coniugato alla perossidasi per 30 minuti. Successivamente la rivelazione è stata eseguita con la DAB (DAB Dilution Buffer e DAB substrate) al microscopio. Dopo di che sono stati eseguiti 3 lavaggi in acqua distillata ed infine il contrasto delle cellule è stato effettuato con una soluzione di Metil Green allo 0,5% per 10 minuti. Le sezioni sono state sottoposte poi a disidratazione attraverso sciacqui in butanolo, chiarificazione in xilene per 2 minuti ed infine montaggio con il balsamo del Canada.

### **4.6** Indagine Ultrastrutturale

Per individuare nelle cellule e nel tessuto nervoso degli animali studiati possibili danni ultrastrutturali imputabili al cadmio è stata utilizzata la Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM). L'analisi ultrastrutturale è stata eseguita utilizzando campioni di encefalo di controllo ed esposti al Cd. L'animale è stato prima perfuso con soluzione salina (NaCl 0,7%) a temperatura ambiente per 2 minuti (per lavare via il sangue) e successivamente con la miscela Karnovsky, (paraformaldeide 4% e glutaraldeide solubilizzata in PB) preparata al momento.

Una volta estratto l'encefalo è stato ulteriormente fissato immergendolo nella stessa miscela per 2 ore a +4°C. Dopo la fissazione è seguito un passaggio in PBS per 1 ora a 4°C. In seguito gli encefali sono stati divisi in blocchi più piccoli, lasciati tutta la notte in PBS a 4°C, e post-fissati in tetrossido di osmio 1% in PB, per 1 ora. Poi lavati con cloruro di sodio e disidratati mediante immersione in etanolo a concentrazioni crescenti. Sono seguiti passaggi in ossido di propilene ed immersione della miscela (1:1) ossido di propilene e resina epossidica. La resina epossidica è stata preparata mescolando: Epon 812, DDSA (dodecanil-succinil anidride), NMA (nadil-metil anidride), BDMA (benzil-dimetil-ammina). Dopo

completa evaporazione dell'ossido di propilene sotto cappa, si è proceduto con l'inclusione in resina; i blocchetti preparati sono stati lasciati in stufa a 58°C per 48 ore, per favorire la polimerizzazione della resina. I blocchetti ottenuti sono stati poi sezionati con l'ultramicrotomo, strumento che consente, mediante l'utilizzo di una lama di diamante, di ottenere delle sezioni ultrafini di ~70 nm. Le sezioni sono state raccolte su retini di rame e contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo, elementi ad elevato numero atomico. Gli atomi di questi sali, interagendo selettivamente con il preparato biologico, aumentano la possibilità di scattering con il fascio elettronico del microscopio che si traduce nella formazione di un'immagine ad elevato contrasto. I retini sono stati quindi osservati al TEM.

### 4.7 Realizzazione delle Immagini

Le immagini di microscopia ottica contenute nel presente lavoro sono state realizzate presso il Dipartimento delle Scienze Biologiche, sezione di Biologia Evolutiva e Comparata, mediante l'analizzatore di immagine Kontron Elektronic Imaging System KS300 (Zeiss) ed elaborate tramite il programma Adobe Photoshop 3.0. Le immagini di microscopia elettronica sono state realizzate tramite il microscopio elettronico Leo 912AB, presente alla "Stazione Zoologica Antonio Dorhn" ed il microscopio elettronico Philips, EM 208S, presso il Centro Interdipartimentale di Servizio per la Microscopia Elettronica (CISME).

# **CAPITOLO 5**

# **RISULTATI**

### 5.1 OSSERVAZIONI VISIVE IN PODARCIS

Tutte le lucertole prima dell'esperimento presentavano buone condizioni fisiche, buona appetenza e nessun segno di malessere. Gli animali sottoposti a trattamento con CdCl<sub>2</sub>, invece, hanno mostrato segni d'irritabilità, aggressività e inappetenza.

### 5.2 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI CADMIO IN PODARCIS

Allo scopo di determinare l'accumulo di cadmio nell'encefalo, gli esemplari di *Podarcis* sono stati trattati con una singola dose di CdCl<sub>2</sub> somministrata per via intraperitoneale (2,0 mg/Kg peso corporeo) e gli encefali prelevati ad intervalli di tempo. Come descritto nei Metodi, al termine del trattamento, i cervelli degli animali di controllo e trattati, una volta prelevati, sono stati sottoposti a digestione acida ed il contenuto del metallo è stato misurato mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico. I risultati, espressi in ppm sono riportati nella Tabella 1, come media  $\pm$  deviazione standard, e rappresentati nel grafico 1.

Controllo	$1,07 \pm 0,09$
2 giorni	25,27 ±0 ,17
7 giorni	47,08 ± 2,45
16 giorni	58,06 ± 3,35

**Tabella 1.** Accumulo di cadmio nel cervello di *P. sicula* dopo un'unica somministrazione di  $CdCl_2$  per via intraperitoneale. In tabella è riportata la media e la deviazione standard dei valori ottenuti da 3 distinti campioni per ciascun punto sperimentale.

I risultati dimostrano che tracce di cadmio si ritrovano in tutti i cervelli, anche in quelli provenienti da animali di controllo, forse a causa della presenza naturale di tracce di cadmio nell'ambiente. Dopo il trattamento, la quantità di cadmio aumenta, ma tende a variare nel tempo. La concentrazione di cadmio, infatti, aumenta già 2 giorni dopo il trattamento ed è massima a 16 giorni.



**Grafico 1.** Rappresentazione grafica dell'accumulo di cadmio nel cervello di *P. sicula* dopo iniezione del metallo e prelievo dei tessuti a diversi tempi d'esposizione.

### 5.3 Indagini Isto-Morfologiche in *Podarcis*

Le colorazioni istologiche utilizzate in questo studio hanno permesso di riconoscere alterazioni isto-morfologiche nell'encefalo degli animali trattati rispetto a quelli di controllo.

Il sistema nervoso di *Podarcis sicula* al pari di altri rettili, presenta due emisferi cerebrali poco sviluppati e sottili, con bulbi olfattivi in parte peduncolati; la sostanza grigia si mostra già dispiegata in campi di notevole estensione, ma non raggiunge la complessità della corteccia presente nei mammiferi. E' inoltre evidente che la porzione basale è maggiormente sviluppata che negli anfibi e che il mesencefalo, nei Lacertiliani, raggiunge un più alto sviluppo filogenetico.

I lobi ottici sono molto sviluppati: infatti, nella gran maggioranza dei rettili, il senso della vista riveste una notevole importanza. Sono inoltre presenti fibre a breve decorso, che associano le vari aree corticali, e fibre a lungo decorso ed è possibile notare l'inizio di una struttura che nei mammiferi raggiungerà un alto grado di sviluppo (neocorteccia) e che nei rettili è denominata "primordio di neocorteccia" (Liem 2002).

Nelle lucertole di controllo il tessuto nervoso appariva ben conservato, le cellule erano distribuite omogeneamente in tutte le regioni con la loro tipica morfologia. A livello ventricolare, gli ependimociti presentavano forma ovoidale e contorni ben definiti, si presentavano come piccole cellule organizzate in file regolari e ravvicinate tra loro, in seguito alla colorazione cresyl violetto apparivano di colore viola chiaro (fig. 1). Nel chiasma ottico il tessuto era compatto, le cellule distribuite in gruppi o isolate, aventi nucleo piccolo e tondeggiante (fig. 4, 5). Nella sostanza grigia del cervelletto le cellule erano ravvicinate, con forma tonda e citoplasma con scuri, le cellule del Purkinje presentavano citoplasma colorato granuli intensamente, nucleo grande con nucleolo ben visibile (fig. 8). Il tessuto appariva ben vascolarizzato ed i capillari presentavano dimensioni discrete (fig. 11, 13). Gli animali trattati dopo 2 giorni non mostravano evidenti anomalie nel tessuto nervoso, le cellule erano simili a quelle del controllo. Dopo 7 giorni d'esposizione acuta a CdCl<sub>2</sub>, invece, sono state osservate diverse alterazioni morfologiche in varie zone dell'encefalo. Tramite la colorazione cresyl violetto è stato possibile osservare che le cellule localizzate a livello ventricolare, gli ependimociti, mostravano una morfologia alterata, denso citoplasma, colorato intensamente e forma allungata. Le cellule non erano compatte ed organizzate come nel controllo ma dislocate tra spazi irregolari presentando, cosi, perdita delle tipiche caratteristiche strutturali (fig. 2). Dopo 16 giorni a livello dei ventricoli le cellule ependimali apparivano scarsamente colorate con disorganizzazione tissutale (fig. 3), diversamente dai controlli. A livello del chiasma ottico, dopo 7 giorni, il tessuto appariva meno compatto ed omogeneo e a ridosso delle cellule si notava una contrazione del tessuto con la comparsa di spazi vuoti (fig. 6, 7). Nella sostanza grigia del cervelletto le cellule, colorate con la cresyl violetto, apparivano più chiare e addossate tra loro, anche le cellule del Purkinje presentavano lieve riduzione del citoplasma e debole colorazione (fig. 9), così come osservato dopo 16 giorni (fig. 10). Tramite la colorazione emallume eosina, a 16 giorni, è stato possibile notare incremento del calibro dei vasi tra le cellule della sostanza grigia del cervelletto, unito a disomogeneità del tessuto (fig. 12). L'incremento del calibro dei vasi è stato riscontrato anche in altre zone come a livello telencefalico, dopo 7 (fig. 14) e 16 giorni, dove anche la dimensione delle cellule appariva aumentata (fig. 15).

### 5.4 Analisi Immunoistochimica

### 5.4.1 VARIAZIONE DEL MARKER GFAP

L'analisi immunoistochimica delle variazioni della distribuzione ed espressione del marker astrogliale **GFAP**, in condizioni basali e dopo esposizione ai trattamenti, ha mostrato i seguenti risultati: nell'encefalo del rettile *Podarcis sicula* di controllo il pattern generale dell'immunopositività alla GFAP era fondamentalmente rappresentato da lunghe e sottili fibre che partendo dai corpi cellulari, localizzati sulla superficie ventricolare si dirigevano verso lo strato meningeo. Nel midollo era presente una ricca rete di fibre intensamente marcate e cellule aventi ampio citoplasma, circondate da corte fibre a decorso trasversale (fig. 16 a-d). In particolare si riconoscevano gli astrociti, cellule gliali stellate dotate di processi lunghi e ramificati (fig. 17a-b). A livello ependimale numerose strutture immunopositive alla GFAP sono state osservate (fig. 18). Nella regione ventricolare del mesencefalo l'ependima mostrava una maggiore positività e la glia radiale era chiaramente distinguibile (fig. 19). Nella sostanza grigia del cervelletto

si osservava un'intensa immunopositività ed anche i neuroni di Purkinje mostravano una lieve immunoreattività nel citoplasma (fig. 20 a-b). Nel tetto ottico è stata osservata la presenza di strutture organizzate nella commessura del tetto, inoltre riconoscibili erano le cellule della glia radiale insieme a sottili strutture GFAP<sup>(+)</sup> (fig. 21 a-d). Nel diencefalo ed in particolare nell'ipotalamo erano presenti numerose fibre a differente decorso (fig. 22). Le diverse regioni della parete telencefalica mostravano un'immunomarcatura di differente intensità; in particolare i corpi cellulari ependimali e i corrispondenti processi radiali mostravano un'intensa colorazione, sia nella parte dorsale sia ventrale (fig. 23 a-d). L'espressione della GFAP è stata rivelata anche a livello del chiasma ottico in cui le fibre mostravano una positività omogenea (fig. 24).

Per quanto riguarda le lucertole esposte a cadmio, già dopo 2 giorni dal trattamento sono stati riscontrati alcuni cambiamenti nella distribuzione della GFAP. Infatti nell'ipotalamo i fasci di fibre erano meno cospicui rispetto a quelli del controllo (fig. 25) e l'intensità del segnale immunoreattivo nella sostanza grigia del cervelletto era meno intensa (fig. 26). Per quanto riguarda, invece, le altre porzioni encefaliche e la glia radiale non sono state evidenziate notevoli alterazioni (fig. 27-32). Dopo 7 giorni persisteva la debole intensità del segnale GFAP<sup>(+)</sup> nel cervelletto (fig. 33, ma si osservava anche una riduzione della distribuzione delle fibre nel tetto ottico (fig. 34) e nel telencefalo (fig. 35). La glia radiale risultava quasi assente in queste regioni ed anche a livello ventricolare (fig. 36, 37). Dopo 16 giorni d'esposizione un ulteriore decremento della glia radiale in diverse zone come nel midollo (fig. 38 a, b), nel tetto (fig. 39 a, b) e nel telencefalo (fig. 40) è stato osservato. Simile al controllo, invece, appariva la positività delle strutture GFAP<sup>(+)</sup> a livello dell'ipotalamo (fig. 41) e chiasma ottico (fig. 42). Nel cervelletto

l'espressione della GFAP era intensa ma rappresentata da un numero minore di strutture (fig. 43).

#### 5.4.2 VARIAZIONE DEL MARKER S100

Nell'encefalo di controllo di Podarcis gli elementi positivi alla proteina S100 mostravano una distribuzione simile a quella osservata per la proteina GFAP. Le differenze più consistenti tra queste due proteine riguardano la distribuzione della glia radiale, non facilmente distinguibile in tutto l'encefalo, e la marcatura degli ependimociti che appare tenue o assente (fig. 44). Nel controllo sono stati osservati fasci di fibre ben definiti nel midollo (fig. 45 a, b, c) che si estendevano oltre il diencefalo giungendo a livello della zona caudale del telencefalo (fig. 46 a, b). Sottili fibre sono state osservate nel tetto (fig. 47), nel cervelletto (fig. 48), mentre il chiasma ottico appariva omogeneamente positivo (fig. 49). Così come analizzato per la GFAP anche la proteina S100 è soggetta alla tossicità del cadmio. Infatti dopo 2 giorni si assisteva ad un decremento del segnale S100<sup>(+)</sup> e della distribuzione delle fibre e degli elementi marcati nel cervelletto (fig. 50). Osservando l'intero encefalo si notava che le fibre S100<sup>(+)</sup> non giungevano al telencefalo, ma si fermavano al diencefalo (fig. 51), dove apparivano meno organizzate. Una notevole diminuzione coinvolgeva anche il telencefalo (fig. 52 a, b, 53); anche nel tetto ottico l'espressione sembrava lievemente ridotta (fig. 54). Dopo 7 giorni d'esposizione al metallo è stato osservato un decremento della distribuzione delle fibre S100<sup>(+)</sup> e dell'intensità del segnale immunoreattivo, prevalentemente a carico dell'ipotalamo (fig. 55), cervelletto (fig. 56), telencefalo (fig. 57 a, b) e tetto (fig. 58 a, b). Nel midollo le strutture positive erano meno cospicue e la rete di fibre sembrava meno fitta (fig. 59 a, b). Altresì dopo 16 giorni si verificava lo stesso decremento con riduzione dell'espressione della proteina S100 nel telencefalo (fig. 60 a, b), tetto (fig. 61 a, b) e midollo (fig. 62 a, b); ma a differenza delle altre zone, nel cervelletto si osservava, invece, una buona reattività (fig. 63, 64).

### 5.4.3 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI

Per confermare la morte di tipo apoptotico, sono stati determinati due eventi di tale processo, la frammentazione del DNA e l'attivazione delle caspasi-3. Come riportato in figura 66 (in basso), in entrambe le condizioni sperimentali si è verificato un aumento significativo delle cellule apoptotiche dopo 2, 7 e 16 giorni dal trattamento, con un massimo, per la maggior parte delle volte dopo 2 e 16 giorni. Sono state scelte le zone encefaliche in cui la presenza delle cellule apoptotiche era più rilevante. La frammentazione del DNA è stata determinata con il TUNEL test. E' stata registrata una significativa induzione nel cervelletto e a livello ependimale dopo 2 e 16 giorni, ma anche nel midollo e nel tetto ottico si è verificato un leggero incremento dell'indice apoptotico (IA). In particolare nel cervelletto del controllo sono state osservate rare cellule apoptotiche, aventi nucleo marcato, disposte a caso  $(1,1 \pm 0.53 \%)$  mentre dopo 2 giorni l'IA (indice apoptotico) incrementava a 22,4  $\pm$  5,15 %, dopo 7 giorni invece a 12,6  $\pm$  6,07 % e dopo 16 giorni a 46,2  $\pm$  7,82 %. A livello ependimale le percentuali analizzate erano: controllo  $(3,4 \pm 1,82 \%)$ , 2 giorni  $(29,0 \pm 4,69 \%)$ , 7 giorni  $(10,6 \pm 11,10 \%)$ , 16 giorni (42,2  $\pm$  5,17 %). Nel midollo le percentuali analizzate erano: controllo  $(3.6 \pm 1.82 \%)$ , 2 giorni  $(12.0 \pm 5.0 \%)$ , 7 giorni  $(7.8 \pm 2.39 \%)$ , 16 giorni  $(16.4 \pm 1.62 \%)$ 2,88 %). Nel tetto le percentuali analizzate erano: controllo  $(4,4 \pm 2,30 \%)$ , 2 giorni  $(22,0 \pm 9,08 \%)$ , 7 giorni  $(7,4 \pm 2,07 \%)$ , 16 giorni  $(31,2 \pm 9,15\%)$ . Il grado di apoptosi è stato quantificato determinando l'indice apoptotico (AI: definito come percentuale di cellule apoptotiche, aventi nucleo marcato, sul totale di cellule presenti, in campi rappresentativi selezionati a random). Alcuni nuclei delle cellule marcate presentavano ancora una buona morfologia, con nucleo tondo e membrana delineata, probabilmente colti nello stadio iniziale di morte cellulare, mentre molte altre presentavano una morfologia alterata, tipica dell'apoptosi con bordi irregolari, scomparsa del nucleolo e frammentazione della cromatina (fig. 65 a-r ), i grafici sono riportati in figura 66 a (in basso).

In seguito, è stata stimata la capacità del cadmio di attivare le caspasi-3. Come si evince dai grafici (fig. 66 b), si è verificato un incremento dell'attivazione delle caspasi-3 già dopo 2 giorni dal trattamento con CdCl<sub>2</sub>. I valori dell'IA di seguito riportati sono relativi alle diverse zone analizzate: nel cervelletto degli animali di controllo i valori erano del 2,6  $\pm$  0,55 %, a 2 giorni del 15,8  $\pm$  5,54 %, a 7 giorni del  $9,6 \pm 1,52$  %, mentre a 16 giorni del  $21,2 \pm 5,07$ %. Nel tetto le percentuali analizzate erano: controllo  $(3,6 \pm 1,52 \%)$ , 2 giorni  $(5,8 \pm 1,79 \%)$ , 7 giorni  $(4,6 \pm 1,52 \%)$ 1,14 %), 16 giorni (6,8  $\pm$  2,17 %). In entrambi i casi si osservavano 2 picchi, uno a 2 giorni e l'altro a 16 giorni, mentre nel midollo e nell'ependima si è osservato un unico picco a 2 giorni e i valori successivi erano minori rispetto alla percentuale di cellule apoptotiche. Midollo controllo  $(2,8 \pm 1,30 \%)$ , 2 giorni  $(21,0 \pm 6,48 \%)$ , 7 giorni (16,4  $\pm$  3,21 %), 16 giorni (15,8  $\pm$  2,86 %). Ependima controllo (3,2  $\pm$  0,84 %), 2 giorni (22,8  $\pm$  5,89 %), 7 giorni (19,0  $\pm$  8,22 %), 16 giorni (20,2  $\pm$  6,57 %). Dal punto di vista morfologico, le cellule apoptotiche apparivano per lo più isolate, con citoplasma compatto, rigonfio e spesso con nucleo ridotto e periferico (fig. 67 a-m).

Figura 66. a) Frammentazione del DNA evidenziata tramite il TUNEL test ed espressa come IA dei nuclei marcati; b) attivazione delle caspasi-3 espressa come IA dei citoplasmi marcati in cellule localizzate nel cervelletto, ependima, tetto ottico e midollo di Podarcis sicula a tempo 0 (controllo) e dopo 2, 7 e 16 giorni dal trattamento con CdCl<sub>2</sub> (2,0 mg/Kg). I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard dell'indice apoptotico.



a)

## 5.5 Analisi Ultrastrutturale

I risultati delle indagini ultrastrutturali hanno evidenziato lievi anomalie a livello encefalico indipendentemente dal tempo trascorso dopo l'iniezione di CdCl<sub>2</sub>. Negli esemplari di controllo i nuclei delle cellule localizzate nel mesencefalo presentavano cromatina poco densa (fig. 68a), citoplasma con reticolo endoplasmatico rugoso organizzato in cisterne parallele (fig. 68 b), granuli di glicogeno sparsi (fig. 69 a, b), mitocondri con creste lamellari ben evidenti e matrice densa (fig. 70). Si osservavano diversi neurofilamenti e numerosi processi neurogliali, terminazioni ricche di vescicole (fig. 69 b).

Negli esemplari esposti dopo 2 e 7 giorni non sono stati riscontrati notevoli cambiamenti, mentre qualche modificazione nell'aspetto del nucleo e degli organuli citoplasmatici è stata osservata negli esemplari trattati dopo 16 giorni, in particolare nel cervelletto, dove le cellule presentavano addensamenti di cromatina (fig. 71 a-c). Era visibile anche un accumulo maggiore delle particelle di glicogeno (fig. 72 a-b). I mitocondri presentavano delle alterazioni, infatti, alcuni erano molto più scuri e con creste addossate (72 a, 73 a-c). I terminali sembravano più voluminosi e colmi di vescicole (fig. 74). Era riconoscibile, inoltre, qualche cellula apoptotica avente nucleo con forma irregolare, addensamento cromatinico e presenza di inclusioni citoplasmatiche (fig. 73 c, 75). Si osservavano ancora zone con spazi vuoti irregolari e discontinuità di tessuto (fig. 74, 76), risultato forse di una disintegrazione delle membrane cellulari.

### 5.6 OSSERVAZIONI VISIVE SU DANIO RERIO

I pesci di controllo nuotavano normalmente senza nessun segno di anormalità, mentre qualche trattato esibiva un nuoto incostante. In generale tra i trattati si osservava uno stato di irritabilità con aumento della velocità di nuoto. Inoltre verso la fine del trattamento i pesci mostravano iperventilazione ed inappetenza.

# 5.7 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI CADMIO IN DANIO

Allo scopo di determinare l'accumulo di cadmio nell'encefalo, gli esemplari di *Danio rerio* sono stati trattati con una singola somministrazione di CdCl<sub>2</sub> in acqua (1,0 mg/L) ed i cervelli prelevati ad intervalli di tempo. Come descritto nei Metodi, al termine del trattamento, i cervelli sono stati sottoposti a digestione acida ed il contenuto del metallo è stato misurato mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico. I risultati, espressi in ppm sono riportati nella Tabella 2, come media  $\pm$  deviazione standard, e rappresentati nel grafico 2.

Controllo	$1,25 \pm 0,2$
2 giorni	22,23 ± 1 ,0
7 giorni	33,16 ± 0,82
16 giorni	45,04 ± 1,02

**Tabella 2.** Accumulo di cadmio nel cervello di zebrafish dopo trattamento. In tabella è riportata la media ± deviazione standard dei valori ottenuti da 3 distinti campioni per ciascun punto sperimentale.

I risultati dimostrano che tracce di cadmio si ritrovano in tutti i cervelli, anche in quelli provenienti da animali di controllo, forse a causa della presenza naturale di tracce di cadmio nell'ambiente. Dopo il trattamento, la quantità di cadmio aumenta, ma tende a variare nel tempo. La concentrazione di cadmio, infatti, aumenta già 2 giorni dopo il trattamento ed è massima a 16 giorni.



**Grafico 2.** Rappresentazione grafica dell'accumulo di cadmio nel cervello di *Danio rerio* dopo somministrazione di cadmio e prelievo dei tessuti a diversi tempi d'esposizione.

### 5.8 Indagini Isto-Morfologiche in Danio

Nell'encefalo del teleosteo *Danio rerio* l'analisi isto-morfologica ha rivelato, così come in *Podarcis*, che il cadmio induce effetti neurotossici negli animali trattati rispetto ai non trattati.

L'encefalo di zebrafish si caratterizza, al pari d'altri pesci Teleostei, da una struttura che già macroscopicamente mostra una discreta lobulazione delle varie componenti. Presenta un telencefalo ben sviluppato a cui si antepongono i lobi olfattivi e a cui segue il diencefalo e il romboencefalo. Una particolarità distintiva presente in zebrafish, come in tutti i Teleostei, è la presenza di un telencefalo costituito da due solidi emisferi separati da un ventricolo mediale che si estendono in senso dorso laterale, come risultato di un particolare evento morfogenetico chiamato "eversione" (Liem 2002).

Nei campioni di controllo il tessuto appariva omogeneo con cellule aventi struttura compatta e contorni ben definiti (fig. 76 a, b). Al contrario, i campioni trattati dopo

7 giorni presentavano superficie ependimale irregolare, a livello dei ventricoli (fig. 77) e del tetto ottico, con cellule dislocate differentemente; mentre più internamente si notavano spazi intercellulari di differente ampiezza (fig. 78). Anche nel midollo si notava una rilevante disorganizzazione tissutale (fig. 79), a differenza del controllo in cui gli elementi cellulari erano ben distribuiti (fig. 80) Dopo 16 giorni, nel tetto ottico il tessuto era alterato con perdita delle caratteristiche strutturali: si evidenziavano, infatti, spazi dilatati, probabilmente di natura edematosa, con all'interno del materiale disomogeneo e le cellule apparivano molto distanziate tra loro (fig. 81). Anche a livello della superficie ependimale il tessuto appariva alterato e disomogeneo (fig. 82), differente da quello del controllo (fig. 83).

### 5.9 Analisi Immunoistochimica

### 5.9.1 VARIAZIONE DEL MARKER S100

Per quanto riguarda l'analisi dei markers astrogliali, le cellule immunoreattive alla **proteina S100** sono state identificate sulla base della loro morfologia e localizzazione nei diversi segmenti dell'encefalo di controllo di zebrafish. Nel telencefalo l'immunoreattività alla proteina S100 appariva debole ma specifica in cellule sparse, localizzate maggiormente nell'area telencefalica dorsale (fig. 84 a, b). Nel mesencefalo l'immunoreattività alla S100 è stata maggiormente osservata nelle fibre del tetto ottico. Le lunghe fibre attraversavano dorso-ventralmente l'intero tetto ottico giungendo alla superficie esterna. Le cellule reattive, sono state localizzate anche nella zona mediale e laterale della valvola cerebelli e nelle cellule subependimali del ventricolo del tetto (fig. 85 a, b). Il corpus cerebellum mostrava immunoreattività in piccoli neuroni localizzati maggiormente nello strato

superficiale (fig. 86 a). Una diffusa immunocolorazione alla S100, inoltre, è stata trovata nella corteccia del cervelletto, nei corpi e nell'albero dendritico di neuroni che formano i nuclei cerebellari (fig. 86 b). Nello strato cellulare della parete del ventricolo diencefalico sono state identificate cellule gliali subependimali e taniciti, che presentavano lunghi processi che entravano nello strato profondo del diencefalo (fig. 87 a-c). Nel midollo si osservava una marcata positività di cellule e fibre (fig. 88 a-c).

Negli animali trattati si assiste ad un cambiamento nella distribuzione delle strutture positive alla proteina S100. Infatti, dopo 2 giorni si verificava un notevole decremento delle strutture S100<sup>(+)</sup> nel midollo (fig. 89 a-c) e a livello ventricolare (fig. 90 a-c), così come dopo 7 giorni, dove sia a livello ventricolare (fig. 91) sia nel cervelletto (fig. 92) e nel telencefalo (fig. 93) il segnale appariva meno marcato rispetto al controllo ed era evidente la riduzione delle strutture immunopositive. Dopo 16 giorni d'esposizione al Cd anche nel tetto ottico (fig. 94), oltre che nel midollo (fig. 95) e nel telencefalo (fig. 96) era possibile notare una riduzione del segnale immunoreattivo.

#### 5.9.2 VARIAZIONE DEL MARKER GFAP

Nell'encefalo di controllo di Zebrafish gli elementi positivi alla **GFAP** mostravano una distribuzione simile a quella osservata per la proteina S100. Molto marcato era il segnale immunoreattivo nel midollo dove erano presenti numerosi fasci di fibre aventi differente lunghezza e decorso (fig. 97 a-c). A livello ventricolare non è stata evidenziata una simile immunoreattività, ma comunque numerosi elementi GFAP erano presenti (fig. 98 a-c). Nel cervelletto diffusa era la reattività nella sostanza grigia e ben evidente appariva il citoplasma dei neuroni di

Purkinje (fig. 99). Nel tetto ottico erano localizzate sottili e rare fibre (fig. 100) allo stesso modo nel telencefalo (fig. 101). Cosi come la proteina S100 anche la GFAP è soggetta alla tossicità del cadmio. Infatti dopo 2 giorni di trattamento è stata osservata una riduzione delle fibre nel tetto ottico (fig. 102), a livello ventricolare (fig. 103) e nel midollo (fig. 104). Dopo 7 giorni d'esposizione a CdCl<sub>2</sub> nei pesci è stato riscontrato cambiamento dell'espressione della GFAP nel cervelletto (fig. 105), nell'ependima (fig. 106) e nel midollo (fig. 107). Dopo 16 giorni oltre a cervelletto e midollo (fig. 108, 109) anche nel telencefalo si osservava una bassa espressione della proteina GFAP (fig. 110).

#### 5.9.3 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI

La tecnica immunocitochimica per la rivelazione delle caspasi-3 nelle cellule apoptotiche ha rivelato che ugualmente nell'encefalo di zebrafish il cadmio provoca apoptosi. I risultati dimostrano che si verifica un aumento significativo delle cellule apoptotiche dopo 2, 7 e 16 giorni dal trattamento, con un massimo, per la maggior parte delle volte dopo 2 e 7 giorni. Nell'animale di controllo sono presenti rare cellule apoptotiche (fig. 111 a-d), aventi nucleo leggermente marcato, processo di certo fisiologico. Nei pesci esposti a Cd numerose cellule marcate erano riconoscibili sia a livello ependimale sia nel midollo. Queste cellule presentano differente forma e citoplasma intensamente marcato. Anche nel cervelletto e nel tetto ottico si osservavano varie cellule apoptotiche a diversi tempi dal trattamento (2 giorni: fig. 111 e-l; 7 giorni fig. 112 a-d; 16 giorni fig. 112 e-h). Per le diverse zone encefaliche analizzate i grafici sono riportati in figura 112• (in basso) ed i valori sono seguenti: ependima: controllo  $(3,6 \pm 1,82 \%)$ , 2 giorni  $(32,0 \pm 10,22 \%)$ , 7 giorni  $(20,0 \pm 6,44 \%)$ , 16 giorni  $(4,2 \pm 1,92 \%)$ ; midollo: controllo  $(3,6 \pm 1,52 \%)$ , 2 giorni  $(12,6 \pm 3,05 \%)$ , 7 giorni  $(31,8 \pm 8,44 \%)$ , 16 giorni  $(16,0 \pm 4,18 \%)$ ; cervelletto: controllo  $(3,0 \pm 1,0 \%)$ , 2 giorni  $(4,2 \pm 1,92 \%)$ , 7 giorni  $(17,8 \pm 6,72 \%)$ , 16 giorni  $(11,6 \pm 3,36 \%)$ ; tetto: controllo  $(2,0 \pm 1,0 \%)$ , 2 giorni  $(26,2 \pm 14,02 \%)$ , 7 giorni  $(13,0 \pm 4,30 \%)$ , 16 giorni  $(3,3 \pm 3,30 \%)$ .



**Figura 112**. Attivazione delle caspasi-3 espressa come IA dei citoplasmi marcati in cellule localizzate nel cervelletto, ependima, tetto ottico e midollo di zebrafish a tempo 0 (controllo) e dopo 2, 7 e 16 giorni dal trattamento con CdCl<sub>2</sub> (1,0 mg/L). I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard dell'indice apoptotico.
# 5.10 Analisi Ultrastrutturale

I risultati delle indagini ultrastrutturali hanno mostrato che anche in *Danio rerio*, cosi come in *Podarcis* si verificano anomalie di debole entità a livello encefalico negli animali esposti a CdCl<sub>2</sub>. Nel controllo il tessuto appariva compatto, ben conservato, ricco di filamenti e processi neurogliali e terminazioni nervose (fig. 113 a, b, 114). I mitocondri presentavano buone caratteristiche (fig. 113, 114). Sparsi granuli di glicogeno erano presenti a livello del mesencefalo (fig. 115).

Alcune moderate alterazioni sono state osservate nel telencefalo dei campioni esposti a 7 giorni dove si osservava la presenza di spazi dilatati tra le cellule (fig. 116 a, b), probabilmente di natura edematosa o risultato di una forte vacuolizzazione, in cui le membrane cellulari si sono disintegrate e sono scomparse. Nel midollo erano presenti diverse cellule apoptotiche aventi condensazione della cromatina, contorni irregolari ed inclusioni lamellari (fig. 117 a, b). Queste inclusioni a volte erano costituite da corpi mielinici scuri formati da membrane concentriche addensate, presenti sovente anche nelle terminazioni (fig. 117 c). In alcune zone i mitocondri presentavano una struttura alterata (fig. 118) e dopo 16 giorni d'esposizione a CdCl<sub>2</sub> gli stessi apparivano, in maniera ricorrente rigonfi con forma irregolare (fig. 119). Un leggero incremento dei granuli di glicogeno è stato osservato in diverse zone (fig. 119), anche i filamenti neurogliali in alcuni casi presentavano discontinuità (fig. 120). Strutture autofagiche e vacuoli sono stati osservati nelle cellule del tessuto nervoso di zebrafish dopo 16 giorni d'esposizione a CdCl<sub>2</sub>. Alcune di queste strutture presentavano un singolo grande vacuolo contenente materiale citoplasmatico (fig. 121 a, b). Nelle porzioni encefaliche analizzate, a 16 giorni, in ogni caso, non sono stati riscontrati numerosi processi apoptotici notevoli, né ampi spazi disomogenei, come osservato a 7 giorni.

# **CAPITOLO 6**

# DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

DOTTORATO DI RICERCA BIOLOGIA AVANZATA XXII CICLO.

Questo studio indica che il cadmio induce cambiamenti morfologici nella struttura e nelle cellule del tessuto nervoso di Podarcis sicula e Danio rerio. I risultati ottenuti hanno evidenziato, oltre all'accumulo di metallo nel cervello, cambiamenti del tessuto nervoso con comparsa di spazi intercellulari irregolari e perdita delle caratteristiche strutturali. Il calibro dei vasi era incrementato e la morfologia delle cellule alterata, con visibili fenomeni degenerativi: a livello ultrastrutturale i mitocondri apparivano leggermente danneggiati, rigonfi e con forma irregolare, con creste addossate e molto più scuri rispetto a quelli presenti nel controllo; alcune cellule mostravano addensamenti di cromatina ed inclusioni citoplasmatiche costituite da corpi mielinici scuri; un leggero incremento dei granuli di glicogeno è stato osservato in diverse zone; strutture autofagiche e vacuoli contenenti materiale citoplasmatico sono stati osservati in diverse cellule. Importante il dato riguardo le proteine markers astrogliali, quali la GFAP e S100. Per entrambe, infatti, si è verificata una riduzione del segnale immunoreattivo e della distribuzione delle strutture positive. Ciò è stato colto in molte regioni encefaliche e a diversi tempi d'esposizione. Infine sono stati osservati numerosi processi apoptotici con attivazione delle caspasi-3 e frammentazione del DNA, in diverse zone come cervelletto, ependima, midollo e tetto ottico.

In questo studio i cambiamenti morfologici riscontrati negli animali esposti al metallo sono comparsi gradualmente e rappresentano una tipica reazione alla presenza del cadmio. Simili cambiamenti, infatti, sono stati descritti da Triebskorn e Kohler (1996) nella lumaca terrestre *Deroceras reticulatum*, da Vega et. al (1989) nelle ghiandola digestiva del mollusco marino *Littorina littorea*, e da Darmono et al. (1990) nelle branchie, nell'epatofegato e nelle appendici dei gamberetti *Penaeus merguiensis* de Man. Almazan e collaboratori (2000) hanno evidenziato che il Cd si

accumula nel cervello, danneggiando sia i neuroni sia le cellule gliali e provoca apoptosi negli oligodendrociti, con attivazione delle Caspasi 9 (Watjen et al. 2002). Anche Reyners e collaboratori (1982) hanno riportato che il Cd induce cambiamenti morfologici nelle popolazioni di cellule gliali. Secondo alcuni studi l'esposizione a questo metallo determina aumento dei ROS e danno mitocondriale in astrociti di ratto (Yang et al. 2007). L'aumento del calibro dei vasi nei tessuti è un dato già descritto da vari autori (Houston 2007; Satarug 2005) i quali riportano, come il cadmio induca ipertensione e vasculite. Schuwerack e Lewis (2003) eseguendo uno studio ultrastrutturale sull'azione tossica del cadmio nella ghiandola digestiva del granchio Potamonautes warreni, hanno riscontrato danni ultrastrutturali con elevate quantità di macrofagi, multivescicole, corpi lamellari ed incremento del numero di fagolisosomi nelle cellule. Queste osservazioni erano in accordo con le ricerche di Thophon et al. (2003) sulle alterazioni istopatologiche provocate dal cadmio nelle branchie, rene e fegato del pesce Lates calcarifer, e gli studi di Farina et al. (1996) riguardo la tossicità del Cd nei polmoni di ratto. La risposta astrocitica all'insulto tossico è evidenziata anche da un incremento nel contenuto di glicogeno, come descritto da vari autori che riportano i possibili coinvolgimenti di vari tipi cellulari in reazioni di degenerazione (Bignami e Ralston 1969; Vaughn e Pease 1970; Vaughn et al. 1970; Sato et al 1978).

Diverse interpretazioni sono state proposte per spiegare gli effetti del cadmio sulla riduzione dell'espressione della GFAP e della S100, markers degli astrociti: tra la gran varietà dei possibili effetti vi è da considerare che il Cd blocca l'attività dei canali del calcio ed interferisce con la sua omeostasi sostituendosi nei meccanismi di trasporto e nei siti di legame (Kiss e Osipenko 1994), riducendo cosi la concentrazione di calcio intracellulare. Molti processi necessari per la divisione

cellulare e la riorganizzazione del citoscheletro sono Ca<sup>2+</sup> dipendenti. È stato dimostrato che la fosforilazione della proteina GFAP in sezioni di ippocampo di ratti adulti dipende dalla concentrazione di calcio esterna (Gottfried 1999); quindi se il cadmio blocca l'azione del calcio comporta di conseguenza una riduzione della sintesi della GFAP, compromettendo così le funzionalità degli astrociti e quindi dell'attività neuronale. Per lo stesso motivo, la produzione della proteina S100, che è una proteina calcio dipendente, a causa di una riduzione della disponibilità di calcio potrebbe essere alterata. In ogni modo i meccanismi coinvolti non sono stati ancora ben compresi. Lo stress ossidativo è stato diverse volte proposto come meccanismo principale della tossicità del Cd nel cervello (Stark 1992). Il mitocondrio svolge un ruolo di primo piano nell'esecuzione del programma di morte cellulare. Zou et al. (1997) hanno dimostrato che il cadmio agisce alterando la permeabilità delle membrane mitocondriali causando la traslocazione del Citocromo C nel citoplasma (Risso-de Faverney et al. 2004; Shimizu et al. 1999). Il rilascio del citocromo C sembra giocare un ruolo chiave nell'attivazione di Apaf-1, che legandosi alle caspasi, determina l'inizio della catena di eventi che poi porteranno alla comparsa dei segni morfologici dell'apoptosi, quali il blebbing della membrana e la frammentazione del DNA (Green 1998; Green e Kroemer 1998; Thornberry e Lazebnick 1998). Diversi studi hanno dimostrato che il cadmio è tossico per molti tessuti e induce apoptosi in vitro ed in vivo (Lohmann e Beyersmann 1994; Ishido et al. 1995-1998; Habeebu et al. 1998; Tsangaris and Tzortzatou-Stathopoulou 1998). Risso-de Faverney et al. (2001) avevano scoperto che l'apoptosi indotta dal Cd in epatociti di trota era dovuta all'attivazione della Caspase-3 e induzione della frammentazione del DNA.

Sebbene diversi esperimenti abbiano dimostrato che esiste un'elevata variabilità individuale nell'assorbimento del metallo, tipica degli organismi acquatici e terrestri, (Horiguchi et al. 2004; Alquezar et al., 2006), ci sono in ogni caso molti fattori che influenzano la velocità di assorbimento e la comparsa di cambiamenti nel tessuto. In conclusione, i dati ottenuti in questo studio dimostrano che gli effetti tossici del cadmio e la modalità di risposta sono simili in entrambe le specie studiate, ma non uguali, infatti, alcune alterazioni sono state osservate in maniera più evidente nei pesci rispetto alle lucertole e viceversa in zone ed in tempi differenti. Ciò potrebbe essere spiegato considerando l'attivazione di meccanismi di difesa a tempi differenti, come la produzione di MT (Theocharis et al. 2003), o enzimi antiossidanti quali la superossido-dismutasi o la catalasi (Casalino et al. 2002; Zikic et al. 2001). Queste proteine agiscono con meccanismi diversi: chelano il metallo prevenendone gli effetti tossici, rimuovono le specie ossigeno reattive, riparano i danni alle membrane plasmatiche e al DNA, rinaturano o degradano le proteine denaturate.

Ciò che s'ipotizza è che il cadmio, iniettato intraperitonealmente nelle lucertole e somministrato in acqua nei pesci, sia penetrato nell'organismo e attraverso il flusso sanguigno (Waalkes, 2003) sia giunto alle arterie encefaliche e, capace di attraversare la barriera emato-encefalica (Tiffany-Castiglioni et al. 1989), si sia accumulato nel cervello (Watjen 2002). Le cellule gliali reagiscono all'azione tossica di elementi estranei, infatti, come descritto all'inizio, presentano diverse caratteristiche che consentono non solo l'ingresso nel citoplasma ma anche l'accumulo e la detossificazione di diversi ioni metallici (Tiffany-Castiglioni e Qian 2001). Questa attività consente di prevenire gravi insulti a carico dei neuroni, ma in questo caso spiegherebbe anche il perchè non siano stati evidenziati

importanti cambiamenti o rilevanti danni strutturali nel tessuto nervoso di zebrafish e *Podarcis*. Lo studio della risposta che si attiva nelle cellule in seguito ad esposizione al cadmio è giustificato dal particolare interesse che desta la contaminazione da parte di questo metallo, la cui distribuzione attuale nei comparti ambientali è particolarmente alterata. Le alterazioni che si verificano nel tessuto degli organismi possono rappresentare un indice specifico, anche se indiretto, di inquinamento ambientale da metalli pesanti.

I dati, infine, incoraggiano a studiare ulteriormente il problema su popolazioni di pesci e rettili non solo in laboratorio, ma anche nell'ambiente naturale per la valutazione dell'impatto ambientale da metalli.

# **BIBLIOGRAFIA**

A

- Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R.. 2001. S100β
  Expression in and effects on microglia. Glia 33:131-142.
- ✓ Adamo S, Carinci P, Stefanini M. 2002. Istologia di V. Monesi. Quinta edizione. Ed Piccinin. pag. 640; 689-695.
- ✓ Adriano D.C. 1986. Trace elements in the terrestrial environment. Berlin, Springer-Verlag: 867.
- ✓ Ahearn GA, Mandal PK, Mandal A. 2004. Mechanisms of heavy metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. J Comp Physiol [B]; 174:439-52.
- ✓ Almazan G, Liu HN, Khorchid A, Sundararajan S, Martinez-Bermudez AK, Chemtob S. 2000. Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. Free Radic Biol Med 29(9):858-869.
- ✓ Alquezar R, Markich SJ, Booth DJ. 2006. Metal accumulation in the smooth toadfish, Tetractenos glaber, in estuaries around Sydney, Australia. Environ. Pollut. 142, 123–131.
- ✓ Alvarez Arturo et al. 2005. Stem cells in adult brain: their identification and Role in neurogenesis: Encyclopedia of molecular cell biology and medicine 2nd edition Volume 13: 411-436.
- ✓ Anderson T, Drokenberg T, Forsen S, Thulin E. 1982. "Characterization of the Ca<sup>2+</sup> binding sites of calmodulin from bovine testisusing43Ca and113 Cd NMR. Eur". J., BIOCHEM., 126: 501.
- ✓ Anderson MJ, Swanson KA, Waxman SG, Eng LF. 1984. Glial fibrillary acidic protein in regenerating teleost spinal cord. J Histochem Cytochem 32: 1099-1106.

- ✓ Antanitus DS, Choi BH, Lapham LW. 1976. The demonstration of glial fibrillary acidic protein in the cerebrum of the human fetus by indirect immunofluorescence. Brain Res 103:613–616.
- ✓ Antonio MT, Corpas I, Leret ML. 1999. Neurochemical changes in newborn rats brain after gestational cadmium and lead exposure. Toxicol. Lett. 104:1-9.
- ✓ Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci, 22: 208-215.
- ✓ Artal-Sanz M, Tavernarakis N. 2005. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. FEBS Letters 579:3287-396.
- ✓ Aschner M, LoPachin RM Jr. 1993. Astrocytes: targets and mediators of chemicalinduced CNS injury. J Toxicol Environ Health 38(3):329-42.
- ✓ Aschner M, Rising L, Vitarella D, Kimelberg HK. 1995. Cadmium chloride (CdC1<sub>2</sub>)-induced metallothionein (MT) expression in neonatal rat primary astrocyte cultures. Brain Research 678:91-98.
- ✓ Aschner M, Conklin DR, Yao CP, Allen JW, Tan KH. 1998. Induction of astrocyte metallothioneins (MTs) by zinc confers resistance against the acute cytotoxic effects of methylmercury on cell swelling, Na<sup>+</sup> uptake, and K<sup>+</sup> release. Brain Res 813(2):254-61.

#### B

- ✓ Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassoun EA, Tran MX, Tang L, Stohs SJ. 1997. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate and cadmium chloride to rats. Free Radic. Biol. Med. 22, 471–478.
- ✓ Balcarek JM, Cowan NJ. 1985. Structure of the mouse glial fibrillary acidic protein gene: implications for the evolution of the intermediate filament multigene family. Nucl. Acids Res. 13, 5527–5543.

- ✓ Barger SW, Van Eldik LJ. 1992a. S100β stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cell. J Biol Chem 267:9689-9694.
- ✓ Barger SW, Wolchok SR, Van Eldik LJ. 1992b. Disulfide-linked SI00P dimers and signal transduction. Biochim. Biophys. Acta 1160: 105-112.
- ✓ Barres BA. 1991. New roles for glia. J Neurosci;11(12):3685-94.
- ✓ Barres BA, Barde Y. 2000. Neuronal and glial cell biology. Curr. Opin Neurobiol 10:642-648.
- ✓ Bar-Sela S, Reingold S, Richter ED. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis in a battery-factory worker exposed to cadmium. Int. J. Occup. Environ. Health 7, 109– 112.
- ✓ Battaglini P, Andreozzi G, Antonucci R, Arcamone N, De Girolamo P, Ferrara L, Gargiulo G. 1993. The effects of cadmium on the gills of the goldfish Carassius auratus L.: metal uptake and histochemical changes. Comp. Biochem. Physiol. 104C, 239–247.
- Baudier J, Delphin C, Grunwald D, Khochbin S, Lawrence JJ. 1992. Characterization of the tumor suppresor protein p53 as a protein kinase C substrate and a Sl00β-binding protein. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 11627-11631.
- ✓ Beaudeux JL, Dequen L, Foglietti MJ. 1999. La protéine S-100: un nouveau marqueur biologique de pathologie cérébrale. Ann Biol Clin (Paris);57:261–72.
- ✓ Bennett MV, Contreras JE, Bukauskaa F, Saez JC. 2003. New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. Trends Neurosci 26:536-542.
- ✓ Bentley PJ. 1991. Accumulation of cadmium by channel catfish (Ictalurus punctatus): influx from environmental solutions. Comp. Biochem. Physiol. 99(3), 527-529.
- ✓ Beyersmann D, Hechtenberg S. 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. Toxicol Appl Pharmacol, 144: 247-61.

- ✓ Bignami A, Ralston HJ. 1969. The cellular reaction to Wallerian degeneration in the central nervous system of the cat. Brain Res.;13(3):444-61.
- ✓ Bloom & Fawcett. 1996. Trattato di Istologia. Traduzione italiana della dodicesima edizione "A Textbook of Histology". Ed McGraw-Hill. pag. 382-384.
- ✓ Bodega G, Sua'rez I, Rubio M, Ferna'ndez B. 1994. Ependyma: phylogenetic evolution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin expression in vertebrate spinal cord. Histochemistry 102:113–122.
- ✓ Bongcam-Rudloff E, Nister M, Betsholtz C, Wang JL, Stenman G, Huebner K, Croce CM, Westermark B. 1991. Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. Cancer Res. 51, 1553–1560.
- ✓ Brasfield SM, Weber LP, Talent LG, Janz DM. 2002. Dose response and time course relationships of vitellogenin induction in male Western fence lizards (Sceloporus occidentalis) exposed to ethinylestradiol. Environ. Toxicol. Chem. 21, 1410–1416.
- ✓ Burger J, Campbell KR, Campbell TS. 2004. Gender and spatial patterns in metal concentrations in brown anoles (Anolis sagrei) in southern Florida, USA. Environ. Toxicol. Chem. 23, 712–718.

#### С

- ✓ Campbell KR, Campbell TS. 2000. Lizard contaminant data for ecological risk assessment. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology; 165: 39-116.
- ✓ Campbell KR, Campbell TS. 2001. The accumulation and effects of environmental contaminants on snakes: a review. Environmental Monitoring and Assessment; 70(3):253-301.

- ✓ Cardone B, Roots BI. 1990. Comparative immunohistochemical study of glial filament proteins (glial fibrillary acidic protein and vimentin) in goldfish, octopus and snail. Glia 3, pp. 180-192.
- ✓ Carmignoto G. 2000. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. Prog Neurobiol. Dec;62(6):561-81.
- ✓ Casalicchio G. 2000. Il sistema suolo. In I microelementi nell'ecosistema terrestre (vol.1) a cura di Casalicchio G. Pitagora Editrice, Bologna: 232-265.
- ✓ Casalino E, Calzaretti G, Sblano C, Landriscina C. 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium Toxicology, 1-2, 37-50.
- ✓ Cattani O, Serra R, Isani G, Raggi G, Cortesi P, Carpene E. 1996. Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass, Dicentrachus labrax, Biochem. Physiol. 113C, 193–199.
- ✓ Cocchia D. 1981. Immunocytochemical localization of S-100 protein in the brain of adult rat. An ultrastructural study. Cell Tissue Res 214:529 –540.
- ✓ Condorelli DF, Nicoletti VG, Barresi V, Conticello SG, Caruso A, Tendi EA, Giuffrida. AM. 1999. Structural features of the rat GFAP gene and identification of a novel alternative transcript. J. Neurosci. Res. 56, 219–228.
- ✓ Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range Glial Signaling. Science 247(4941):470-3.
- ✓ Cousins RJ. 1985. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. Physiol. Rev., 65: 238-309.
- ✓ Cox JL, Harrison SD Jr. 1983. "Correlation of metal toxicity with in vitro calmodulin inhibition". Biochem. Biophys. Res. Commun., 115:106.

D

- ✓ Dahl D. 1982. Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Schwann cells: fact or artifact? J. Histochem. Cytochem. 30: 912-918.
- ✓ Dahl D, Bignami A. 1985. Intermediate filaments in nervous tissue. In: Shay JW, editor. Cell and muscle motility, vol. 6. New York: Plenum Press. p 75–96.
- ✓ Dani JW, Smith SJ. 1995. The triggering of astrocytic calcium waves by NMDAinduced neuronal activation. Ciba Found. Symp. 188:195-205.
- ✓ Darmono D. 1990. Uptake of cadmium and nickel in banana prawn (Penaeus merguiensis de Man). Bull Environ Contam Toxicol. 45(3):320-8.
- ✓ Das KP, Das PC, Dasgupta S, Dey CD. 1993. Serotonergic-cholinergic neurotransmitters function in brain during cadmium exposure in protein restricted rat. Biol Trace Elem Res;36:119-27.
- ✓ Donato R. 1999. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. Biochim Biophys Acta 1450:191–231.
- ✓ Donato R. 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. Int J Biochem Cell Biol 33:637–668.
- ✓ Donnelly TE. 1978. "Effects o f zinc chloride on the hydrolysis of cyclic GMP and cyclic AMP by the activator-dependent cuclic nucleotide phosphodiesterase from bovine heart". BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 522:151
- ✓ Dos Santos P, Gehlen G, Faccioni-Heuser MC, Zancan D, Achaval M. 2002. Distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail Megalobulimus oblongus identified by means of a glial fibrillary acidic protein marker. Acta Zoologica Volume 83 issue 4: 345-351.
- ✓ Dyck RH, Van Eldik LJ, Cynader MS. 1993. Immunohistochemical localization of the S-100b protein in postnatal cat visual cortex: spatial and temporal patterns of expression in cortical and subcortical glia. Dev Brain Res 72: 181–192.

- ✓ Ebner FF, Colonnier M. 1975. Synaptic patterns in the visual cortex of turtle : an electron microscopic study. Journal of Comparative Neurology Edizione Feltrinelli 160: 51-80.
- ✓ Elmquist JK, Swanson JJ, Sakaguchi DS, Ross LR, Jacobson CD. 1994. Development distribution of GFAP and vimentin in the Brazilian opossum brain. Journal of Comparative Neurology 344:283-296.
- ✓ Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-31 years (1969–2000). Neurochem. Res. 25, 1439–1451.
- ✓ Engel AK, M<sup>-</sup>uller CM. 1989. Postnatal development and vimentinimmunoreactive radial glia cells in the primary visual cortex of the cat. J Neurocytol 18:437–450.

#### F

- ✓ Fair PH, Sick LV. 1984. The role of digestion in the black sea bass, Centropristis striata, on the chemical speciation of organically bound cadmium. Comp. Biochem. Physiol. 79(3), 265-270.
- ✓ Farina J, Ribas B, Fernandez-Acenero MJ, Gascon C. 1996. pulmonary toxity of cadmium in rats: a histologic and ultrasound study. Gen Diagn Pathol; 141 (5-6): 365-9.
- Fellin T, Carmignoto G. 2006. Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanism for neuronal synchronization in the hippocampus. J Physiol Paris. Mar-May;99(2-3):98-102. Review.
- ✓ Fellin T, Carmignoto G. 2004. Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. J Physio; 559(Pt 1):3-15.

- ✓ Fern R, Black JA, Ransom BR, Waxman SG. 1996. Cd(<sup>2+</sup>)-induced injury in CNS white matter. J Neurophysiol 76(5):3264-73.
- ✓ Ferrando R.1971. Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 25, B321.
- ✓ Forsen S, Thulin E, Lilja H. 1979. "Cd NMR in the study of calcium binding proteins: troponin" C. FEBS LETT. 104:123.
- ✓ Friberg L, Kjellstrom T, Nordberg GF. 1986. Cadmium. In: Frieberg L, Nordber GF, Vouk VB. Eds., Handbook On The Toxicology Of Metals, Vol. 2, 2nd ed. Elsevier, New York, p.130.
- ✓ Fuchs E, Weber K. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, functions, and disease. Annu. Rev. Biochem. 63, 345–382.
- ✓ Fuchs E, Cleveland DW. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science 279, 514–519.
- ✓ Fulle S, Pietrangelo T, Mariggio MA,Lorenzon P, Racanicchi L, Mozrzymas J, Guarnieri S, d'Annunzio G. 2000. Calcium and fos involvement in brain-derived Ca<sup>2+</sup> -binding protein (S100)-dependent apoptosis in rat phaeochromocytoma cells. Exp Physiol 85:243-253.

# G

- ✓ Gadient RA, Cron KC, Otten U. 1990. Interleukin-1 and tumor necrosis factorsynergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. Neurosci Lett 117: 335-340.
- ✓ Gartner LP, Hiatt JL. 2002. Istologia. Seconda edizione. EdiSES. Pag. 191-196.
- ✓ Goldaniga G. 1989. Storia illustrata di Camillo Golgi. Edizione Pro Loco Corteno Golgi. Brescia.
- ✓ Gottfried C, Valentim L, Salbego C, Karl J, Wofchuk ST, Rodnight R. 1999. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium

ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). <u>Brain Res.</u> 833(2):142-9.

- ✓ Gotz M, Hartfuss, Malatesta P. 2002. Radial glial cells as neuronal precusors: a new prospective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. Brain Res Bull 57, pp. 778-788.
- ✓ Green DR. 1998. Apoptotic pathways: the road to ruin. Cell 94, 695–698.
- ✓ Green D, Kroemer G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? Trends Cell. Biol. 8, 267–271.
- ✓ Grosche J, Matyash V, Möller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H. 1999 Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. Nat Neurosci. 2(2):139-43.
- ✓ Gupta A, Gupta A, Murthy RC, Chandra SV. 1993. Neurochemical changes in developing rat brain after pre and postnatal cadmium exposure. Bull. Environ. Contam.Toxicol. 51: 12-17.
- ✓ Gupta A, Gupta A, Shukla SG. 1995. Development of brain free radical scavenging system and lipid peroxidation under the influence of gestational and lactational cadmium exposure. Hum. Exp. Toxicol. 14:428-433.
- ✓ Gutierrez-Reyes E, Albores A, Ríos C. 1998. Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats ant its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. Toxicology 131:145-154.

# H

- ✓ Habeebu SSM, Liu J, Klaassen CD. 1998. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. Toxicol Appl Pharmacol 149:203-209.
- ✓ Hart RP, Rose CS, Hamer RM. 1989. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. J. Clin. Exp. Neuropsychol. 11, 933–943.

- ✓ Hassoun EA, 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. 3:219-26.
- ✓ Hatfield JS, Skoff RP, Maisel H, Eng L. 1984. Glial fibrillary acidic protein is localized in the lens epithelium. J Cell Biol.98(5):1895-8.
- ✓ Holloway RW, Thor HD. 1988. Social memory deficits in adult male rats exposed to cadmium in infancy. Neurotoxicol.Teratol. 10:193-197.
- ✓ Hopkins WA. 2000. Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2391–2393.
- ✓ Horiguchi H, Oguma E, Sasaki S, Miyamoto K, Ikeda Y, Machida M, Kayama F. 2004. Comprehensive study of the effects of age, iron deficiency, diabetes mellitus, and cadmium burden on dietary cadmium absorption in cadmium-exposed female Japanese farmers. Toxicol. Appl. Pharmacol. 196, 114–123.
- ✓ Horstmann E. 1954. Die farseglia des Selachegehirns. Z. Zellforsch Mikrosk Anat 39: 588-617.
- ✓ Houston MC. 2007. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. Altern Ther Health Med.13(2):S128-33.
- ✓ Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF. 2007. Cadmium-induced cancers in animals and humans. Int J Occup Environ Health.;13(2):202-12.
- ✓ Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donata R, Rauvala H. 2000. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. J Biol Chem 275:40096-40105.

- ✓ Ikeda M, Abe H, Watanabe T. 1986. Cadmium levels in the urine of female farmers in nonpolluted areas in Japan. J Toxicol Environ Health; 18(3): 357-67.
- ✓ Iger Y, Lock RAC, Van der Meij JCA, Wenderlaar Bonga SE. 1994. Effects of water-borne cadmium on the skin of the common carp (Cyprinus carpio). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26, 342–350.
- ✓ Ishido M, Homma-Takeda S, Tohyama C, Suzuki T. 1998. Apoptosis in rat renal proximal tubular cells induced by cadmium. J Toxicol Environ Health A. 55(1):1-12.
- ✓ Ishido M, Homma ST, Leung PS, Tohyama C. 1995. Cadmium-induced DNA fragmentation is inhibitable by zinc in porcine kidney LLC-PK1 cells. Life Sci;56:PL351-6.

# J

- ✓ Jessen KR, Mirsky R. 1980. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. Nature 286: 736-737.
- ✓ Jessen KR. 2004 Glial cells. Int J Biochem Cell Biol. 36(10):1861-7.
- ✓ Jin P, Ringertz NR. 1990. Cadmium induces transcription of proto-oncogenes c-jun and c-myc in rat L6 myoblasts. J Biol Chem. 24, 14061-4.
- ✓ Johnson AD, Sigman MB. 1971. "Early actions of cadmium in the rat and domestic fowl testis. IV. Autoradiographic location of 115cadmium" in J. REPROD. FERTIL, 24:115.

# K

✓ Kabata-Pendias A. 1992. Trace metals in soil in Poland – Occurrence and behaviour. Trace Subst. Environmental Health, 25: 53 – 70.

- ✓ Kagi JH, Kojima Y. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. Experientia Suppl 52:25-61.
- ✓ Kàlmàn M. 1998. Astroglial architecture of the carp (Cyprinus carpio) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP). Anat Embryol 198:409–433.
- ✓ Kàlmàn M, Ari Cs. 2002. Distribution of GFAP immunoreactive structures in the rhombencephalon of the sterlet (Acipenser ruthenus) and its evolutionary implication J Exp Zool 293, pp. 395-406.
- ✓ Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M.1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. Nat. Neurosci. 1. 683-692.
- ✓ Kashem MA, Singh BR. 2002. The effect of fertilizer additions on the solubility and plant availability of Cd, Ni and Zn in soil. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 62: 287-296.
- ✓ Kawai J. et al. 2001. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. Nature 409(6821).pp.685-690.
- ✓ Kettenmann H, Ransom BR. 1995. Neuroglia. Oxford University Press, New York.
- ✓ Kiss T, Osipenko ON. 1994. Toxic effects of heavy metals on ionic channels. Pharmacol. Rev, 3:245-246.
- ✓ Klomp LW, Farhangrazi Z, Dugan L, Gitlin JD. 1996. Ceruloplasmin gene expression in the murine central nervous system. J Clin Invest 98(1):207-15.
- ✓ Knoop V, Groth-Malonek M, Gebert M, Eifler K, Weyand K. 2005. Transport of magnesium and other divalent cations: evolution of the 2-TM-GxN proteins in the MIT superfamily. Mol Genet Genomics. 23:1-12.
- ✓ Kornyei Z, Szlavik V. 2004. Humoral and contact interactions in astroglia/stem cell co–culture in the course of glia–induced neurogenesis: Wiley interscience (www.interscience.wiley.com), Volume 49: 430 444.

- ✓ Kumar R, Agarwal KA, Seth KP. 1996. Oxidative stressmediated neurotoxicity of cadmium. Toxicol. Lett.; 89: 65-69.
- ✓ Kruger L, Maxwell DS. 1966. The fine structure of ependymal processes in the teleost optic tectum. Am J Anat 119:. 479-498.
- ✓ Kruger L, Maxwell DS. 1967. Comparative fine structure of Vertebrate neuroglia: teleosts and reptiles. J Comp Neurol 129: 115-142.

# L

- ✓ Lafuente A, González-Carracedo A, Cabaleiro T, Romero A, Esquifino AI. 2005. Toxic effects of cadmium on GABA and taurine content in different brain areas of adult male rats. J Physiol Biochem 61(3):439-46.
- ✓ Lambert MRK. 2004. Lizards used as bioindicators to monitor pesticide contamination in sub-Saharan Africa: a review. Appl. Herpetol. 2:99–107.
- ✓ Laming PR, Kimelberg H, Robinson S, Salm A, Hawrylak N, Müller C, Roots B. 2000. Neuroglia phylogeny and ontogeny. Neuroscience & Biobehavioral Reviews Volume 24, Issue 3: 295-340.
- ✓ Landar A, Caddell G, Chessher J, Zimmer DB. 1996. Identification of an S100A/S100B target protein: phosphoglucomutase. Cell Calcium 20:279-285.
- ✓ Lang DM, Monz'on-Mayor M, Bandtlow CE, Stuermer CAO. 1998. Retinal axons regeneration in the lizard Gallotia galloti in the presence of CNS myelin and oligodendrocytes. Glia 23:61–74.
- ✓ Lang DM, Romero-Alem'an M, Arbelo-Galv'an JF, Stuermer CAO, Monz'on-Mayor M. 2002. Regeneration of retinal ganglion cell axons in the lizard Gallotia galloti is not linked to neurogenesis. J Neurobiol 52:322–335.
- ✓ Langley OK, Ghandour MS, Gombos G. 1984. Immunohistochemistry of cell markers in the central nervous system. In: Lajtha A, editor. Handbook of Neurochemistry. New York: Plenum Publishing Corporation, p 545–611.

- ✓ Lara JM, Alonso JR, Vecino E, Covenas R, Aijon J. 1989. Neuroglia in the optic tectum of teleosts. J Hirnforsch 30: 465-472.
- ✓ Lazzari M, Franceschini V, Ciani F. 1997. Glial fibrillare acidic protein and vimentin in radial glia of Ambystoma mexicanum and Triturus carnifex: an immunocytochemical study. Journal of Brain Research 38(2):187-194.
- ✓ Lazzari M, Franceschini V. 2001. Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunoreactivity of astyroglial cells in the central nervous system of adult Podarcis sicula (Squamata, Lacertidae). J. Anat 198: 67-75.
- ✓ Leeson TS, Leeson CR. 1974. Istologia . Società Editrice Universo.
- ✓ Lemaire-Gony S, Lemaire P. 1992. Interactive effects of cadmium and benzo(a)pyrene on cellular structure and biotransformation enzymes of the liver of the European eel, Anguilla anguilla. Aquat. Toxicol. 22, 145–160.
- ✓ Levine E. 1989. Organization of astrocytes in visual pathways of the goldfish: an immunohistochemical study. J Comp Neurol 285: 231-245.
- ✓ Levitt P, Rakic P. 1980. Immunoperoxidase localization of glial fibrillare acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. J Comp Neurol 193: 815-840.
- ✓ Liem. 2002. Anatomia comparata dei Vertebrati. Edizione Uses.
- ✓ Lin SC, Bergles DE. 2004. Synaptic signiling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. Nat Neurosci 7: 24-32.
- ✓ Lindenau J, Noack H, Possel H, Asayama K, Wolf G. 2000. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. Glia 29: (1) 25-34.
- Linder G, Grillitsch B. 2000. Ecotoxicology of metals. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. (Eds.), Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, FL, pp. 325–459.

- ✓ Lino M, Goto K, Kakegawa W, Okado H, Sudo M, Ishiuchi S, Miwa A, Takayasu Y, Saito I. 2001. Glia-synapse interaction trough Ca<sup>+2</sup> permeable AMPA receptors in Bergmann glia. Science 292: 926-929.
- ✓ Linser PJ, Perkins M. 1987. Gliogenesis in the embryonic avian optic tectum: neuronal-glial interactions influence astroglial phenotype maturation. Dev Brain Res 32:227-290.
- ✓ Liu J, Kadiiska MB, Corton JC, Qu W, Waalkes MP, Mason RP, Liu Y, Klaassen CD. 2002. Acute cadmium exposure induces stressrelated gene expression in wild-type and metallothionein-I/II null mice. Free Radic. Biol. Med. 32, 525–535.
- ✓ Lohmann RD, Beyersmann D. 1994. Effects of zinc and cadmium on apoptotic DNA fragmentation in isolated bovine liver nuclei. Environ Health Perspect; 102:269-271.
- ✓ LoPachin RM Jr, Aschner M. 1993. Glial-neuronal interactions: relevance to neurotoxic mechanisms. Toxicol Appl Pharmacol. Feb;118(2):141-58.
- ✓ Lopez E, Figueroa S, Oset-Gasque MJ, Gonzalez MP. 2003. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. Br. J. Pharmacol. 138, 901–911.
- ✓ López-García C, Molowny A, Martínez-Guijarro FJ, Blasco-Iba<sup>^</sup>nez JM, Luis de la Iglesia JA, Bernabeu A, Garcı<sup>′</sup>a-Verdugo JM. 1992. Lesion and regeneration in the medial cerebral cortex of lizards. Histol Histopath 7:725–746.
- ✓ Lossi L, Merighi A. 2003. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. Progress in Neurobiology, 69:287-312.
- ✓ Lucisano A. 1994. "Cadmio" in TOSSICOLOGIA VETERINARIA. A cura di C. Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 167-170.
- ✓ Lyons-Alcantara M, Mooney R, Lyng F, Cottell D, Mothersill C. 1998. The effect of cadmium exposure on the cytology and function of primary cultures from rainbow trout. Cell Biochem. Funct. 16:1–13.

Μ

- ✓ MacVicar BA. 1987. Morphological differentiation of cultured astrocytes is blocked by cadmium or cobalt. Brain Res 420(1):175-7.
- ✓ Maggs A, Scholes J. 1990. Reticular astrocytes in the fish optic nerve: macroglia with epithelial characteristics form an axially repeated lacework pattern, to which nodes of Ranvier are apposed. Journal of Neuroscience, vol. 10:1600-1614.
- ✓ Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent activated cell sorting reveals a neuronal lineage. Development 127: 5253-5263.
- ✓ Mann RM, Serra EA, Soares AM. 2006. Assimilation of cadmium in a european lacertid lizard: Is trophic transfer important? Environ Toxicol Chem. 25(12):3199-203.
- ✓ Manso MJ, Becerra M, Becerra M, Anadon R. 1997. Expression of a lowmolecular-weight (10 KDa) calcium binding protein in glial cells of the brain of the trout. Anat Embryol 196:403–416.
- ✓ Marcus RC, Easter SS. 1995. Expression of glial fibrillary acidic protein and its relation to tract formation in embryonic zebrafish (Danio rerio). J Comp. Neurol 359: 365-381.
- ✓ Masters BA, Qualife CJ, Erickson JC, Kelly EJ, Froelick GJ, Zambrowicz BP, Brinster RL, Palmiter RD. 1994. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. J Neurosci 14(10):5844-57.
- ✓ Mattson MP. 2000. Apoptosis in neurodegenerative disorders. Nature Reviews 1:120-129.
- ✓ McCharty KD, de Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. J Cell Biol 85: 890-902.
- McKeon RJ, Silver J. 1995. Functional significance of glial-derived matrix durino development and regeneration. In Neuroglia, H. Kettenmann e BR Ransom, ed. (New York Oxford: Oxford University Press) pp. 398-410.

- ✓ McLellan JS, Flanagan PR, Chamberlain MJ, Valberg LS. 1978. "Measurement of dietary cadmium absorption in humans", in J. Toxicol. Environ. Health, 4:131.
- ✓ Miller RH, Liuzzi FJ. 1986. Regional specialization of the radial glial cells of the adult frog spinal cord. Journal of Neurocytology 15: 187-196.
- ✓ Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Dean CH, Zhang AL, Cass DT. 2000. Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo. Dev. Biol. 227, 545–557.
- ✓ Monzon-Mayor M, Yanes C, James JL, Sturrock RR. 1990a. An ultrastructural study of the development of astrocytes in the midbrain of the lizard. J. Anat. 170, 33-41.
- ✓ Monzon-Mayor M, Yanes C, James JL, Sturrock RR. 1990b. An ultrastructural study of the development of astrocytes in the midbrain of the lizard. J. Anat.170, pp. 43-49.
- ✓ Monz'on-Mayor M, Yanes C, Ghandour MS, de Barry J, Gombos G. 1990c. Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunohistochemistry in the developing and adult midbrain of the lizard Gallotia galloti. J Comp Neurol 295:569 –579.
- ✓ Monz'on-Mayor M, Yanes C, Tholey G, de Barry J, Gombos G. 1990d. Immunohistochemical localization of glutamine synthetase in mesencephalon and telencephalon of the lizard Gallotia galloti during ontogeny. Glia 3:81–97.
- ✓ Monzón-Mayor M, Yanes-Méndez C, De Barry J, Capdevilla-Carbonell C, Renau-Piqueras J, Tholey G, Gombos G. 1998. Heterogeneous immunoreactivity of glial cells in the mesencephalon of a lizard: A double labelling immunohistochemical study. J Morphol 235 (2):109 –119.

N

- Nakajima K, Suzuki K, Otaki N, Kimura M. 1991. Detection of metallothionein in brain. Methods Enzymol 205:387-395.
- Naujoks-Manteuffel C, Meyer DL. 1996. Glial fibrillary acidic protein in the brain of the caecilian Typhlonectes natans (Amphibia, Gymnophiona): an immunocytochemical study. Cell and Tissue Research 283: 51-58.
- ✓ Newman EA. 2001. Calcium signalling in retinal glial cells and its effect n neuronal activity. Prog Brain Res; 132:241-54.
- ✓ Nicholson C, Sykovà. 1998. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. Trends Neurosci 21: 207 – 215.
- ✓ Nielsen AL, Jørgensen AL. 2003. Structural and functional characterization of the zebrafish gene for glial fibrillary acidic protein, GFAP. Gene 310: 123–132.
- ✓ Nogawa K, Kido T. 1993. Biological monitoring of cadmium exposure in itai-itai disease epidemiology. Int Arch Occup Environ Health. 65:S43-6.
- ✓ Nordberg GF, Kjellstrom T, Nordberg M. 1985. "Kinetics and metabolism" In: CADMIUM AND HEALTH, VOL. I, EXPOSURE, DOSE AND METABOLISM, Frieberg L, Elinder CG, Kjellstrom T e Nordber GF. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, p.103.
- ✓ Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. 1979. Fine structural localization of glutamine syntetase in astrocytes of rat brain. Brain research 161(2): 303-10.

# 0

✓ Ogawa T, Kobayashi E, Okubo Y, Suwazono Y, Kido T, Nogawa K. 2004. Relationship among prevalence of patients with Itai-itai disease, prevalence of abnormal urinary findings, and cadmium concentrations in rice of individual hamlets in the Jinzu River basin, Toyama prefecture of Japan. Int J Environ Health Res. 14:243-52.

- ✓ Okuda B, Iwamoto Y, Tachibana H, Sugita M. 1997. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. Clin Neurol Neurosurg; 99:263-5.
- ✓ Onteniente B, Kimura H, Maeda T. 1983. Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. J Comp Neurol 215(4):427–436.

# P

- ✓ Pal R, Nath R, Gill DK. 1993. Influence of ethanol on cadmium accumulation and its impact on lipid peroxidation and membrane bound functional enzymes (Na/ K-ATPase and acetilcholinesterase) in various regions of adult rat brain. Neurochem. Int. 23:451-458.
- ✓ Panebianco F. 1976. Tavola rotonda: residui di metalli e non metalli tossici negli alimenti di origine animale. Atti XXX Convegno nazionale S.I.S. Vet, pp. 116-138.
- ✓ Parent A. 1996. Carpenter's human neuroanatomy. Williams & Wilkins Edizione.
- ✓ Pat & Pat. 1977. Istologia comparata dei Vertebrati. Edizioni Uses.
- ✓ 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(2):303-18.
- ✓ Pernavales JG, Nadarajah B. 2001. Radial glial cells: are they really glia? Neuron 31: 881-884.
- ✓ Peters A, Palay SL, Webster H. 1991. The fine structure of the nervous system. Cap. 5 Oxford Univ. USA, 210-211.
- Pixley SK, De Vellis J. 1984. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. Brain Research 317: 201-209.

- ✓ Porter JT, McCarthy KD. 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. Prog. Neurobiol.; 51:439-455.
- ✓ Privat A, Gimenez-Ribotta A, Ridet JL. 1995. Morphology of Astrocytes. In: Kettenmann H, Ransom BR, editors. Neuroglia. New York,Oxford: Oxford University Press, 1995:3-22.

# R

- ✓ Rabitti G. 1998. Intossicazioni alimentari- potenzialità del EAV. Numero 3.
- ✓ Rakic P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J. Comp Neurol 145: 61-84.
- ✓ Ramón y Cajal 1899: Textura del sistema Nervioso del Hombre y los Vertebrados (1894-1904); Histology of the Nervous System of man and vertebrates (Oxford Univ. Press, NY1994).
- ✓ Ransom B, Behar T, Nedergaard M. 2003. New roles for astrocytes (stars at last). Trends Neurosci 26:520–522.
- ✓ Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA. 1989. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 5178–5182.
- ✓ Reyners H, Gianfelici de Reyners E, Maisin JR, Winneke G, Csicsaky M. 1982. Effects of heavy metals (Cd, Tl, Zn and Pb) on glial cells. Neurobehav Toxicol Teratol 4(6):651-4.
- ✓ Richard G, Federolf G, Habermann E. 1985. "The interaction of aluminum nd other metal ions with calcium-calmodulin-dependent phosphodiesterase". ARCH. TOXICOL., 57:257.
- ✓ Rickmann M, Wolff JR. 1995. S100 immunoreactivity in a subpopulation of oligodendrocytes and Ranvier's nodes of adult rat brain. Neurosci Lett 186:13–16.

- Risso-de Faverney C, Devaux A, Lafaurie M, Girard JP, Bailly B, Rahmani R. 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. Aquat. Toxicol. 53, 65–76.
- ✓ Risso-de Faverney C, Orsini N, de Sousa G, Rahmani R. 2004. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. Aquatic Toxicology 69:247–258.
- Robbins. 1999. Le basi patologiche delle malattie. Volume I. VI Edizione Piccin a cura di Contrar, Kumar, Collins. W.B. Sounders Company Philadelphia-Pensylvania-USA; pp. 492.
- ✓ Rosati P, Colombo R. 1997. I tessuti. Edizione Ermes, Milano; pp. 72-76.
- ✓ Rosati P, Colombo R. 2001. La cellula, Edizione Ermes, Milano pp. 302.
- ✓ Ross SM. 1994. Toxic metals in soil-plant system. John Wiley & Sons, Inc: pp 469.
- ✓ Rubio M, Suárez I, Bodega G, Fernández B. 1992. Glial fibrillare acidic protein and vimentin immunohistochemistry in the posterior rhomboencephalon of the Iberian barb (Barbus comiza).Neurosci Lett 134:203-207.
- ✓ Rustandi RR, Drohat AC, Baldisseri DM, Wilder PT, Weber DJ. The Ca (<sup>2+</sup>)dependent interaction of S100B (beta beta) with a peptide derived from p53. Biochemistry 1998;37:1951–60.
- ✓ Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, Hubbard SL, Becker LE, Fukuyama K, Jung S, Tsugu A, Matsuzawa K. 1997. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. J Neurosurg;87(3):420-30.

S

✓ Satarug S, Nishijo M, Ujjin P, Vanavanitkun Y, Moore MR. 2005. Cadmiuminduced nephropathy in the development of high blood pressure. Toxicol Lett. 157(1):57-68.

- ✓ Sato K, Iwamasa T, Tsuru T, Takeuchi T. 1978. An ultrastructural study of chronic cadmium chloride-induced neuropathy. Acta Neuropathol.;41(3):185-90.
- ✓ Sawada J, Kikuchi Y, Shibutani M, Mitsumori K, Inoue K, Kasahara T. 1994. Induction of metallothionein in astrocytes by cytokines and heavy metals. Biol Signals 3(3):157-68.
- ✓ Schafer BW, Heizmann CW. 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. Trends Biochem Sci; 21:134-40.
- ✓ Schuwerack PM, Lewis JW. 2003. The mode of action of acute and chronic concentrations of waterborne Cd in the digestive gland of the acclimated infested freshwater crab (Potamonautes warreni). Cell Tissue Res 312:249–263.
- ✓ Seeley RR, Stephens TD, Tate P. 2005. Anatomia. Idelson-Gnocchi.
- ✓ Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. 1999. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced Hepatoxicity and renal toxicity protection by antioxidant. Toxicol Appl Pharmacol 154(1):256-63.
- ✓ Sheperd GM. 1994. Neurobiology, 3rd Edition (Oxford University Press).
- ✓ Shimizu S, Narita M, Tsujimoto T. 1999. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. J Cell Biol 135: 1441-1445.
- ✓ Shukla SG, Singhal RL. 1984. The present status of biological effects of toxic metals in the environment: lead, cadmium and manganese. Can. J. Physiol. Pharmacol. 62:1015-1031.
- ✓ Shuster CN, Pringle BH. 1969. "Trace metal accumulation by the American Oyster, Crassostrea virginica". 1968 Proc. Nat. Shellfish. Assoc., 59:91.
- ✓ Silver J, Miller JH. 2004. Regeneration beyond the glial scar. NATURE. 5:146-156.
- ✓ Smith, Curr. Biol., 1994.
- ✓ Song H, Stevens CF, Gage FH. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature 417, pp. 39–44.

#### DOTTORATO DI RICERCA

- ✓ Staessen JA, Roels HA, Emelianov D, Kuznetsova T, Thijs L, Vangronsveld J, Fagard R. Lancet. 1999. Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. Public Health and Environmental Exposure to Cadmium (PheeCad) Study Group.;353(9159):1140-4.
- ✓ Stark M, Wolff JE, Korbmacher A. 1992. Modulation of glial cell differentiation by exposure to lead and cadmium. Neurotoxicol Teratol 14(4):247-52.
- ✓ Stoeppler M. 1991. "Cadmium". In: Merian E. Ed., metals and their compounds in the environment. VCH, New York, p.803.
- ✓ Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic Biol Med.; 2:321-36.
- ✓ Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M, Kaminska T, Sniezko R, Abramczyk D, Filar J, Paduch R, Kandefer-Szerszen M. 2000. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. Toxicology 145(2):159-71.

#### Т

- ✓ Talent LG, Dumont JN, Bantle JA, Janz DM, Talent SG. 2002. Evaluation of Western fence lizards (Sceloporus occidentalis) and Eastern fence lizards (Sceloporus undulatus) as laboratory reptile models for toxicological investigations. Environ. Toxicol. Chem. 21, 899–905.
- ✓ Teichberg VI. 1991. Glial glutamate receptors: likely actors in brain signalling. The FASEB Journal, Vol. 5, 3086-3091.
- ✓ Testut L. 1898. Trattato di anatomia umana.
- ✓ Theocharis SE, Margeli AP, Koutselinis A. 2003. Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer. Int J Biol Markers.; 3: 162-9.

- ✓ Thophon S, Kruatrachue M, Upatham ES, Pokethitiyook P, Jaritkhuan S. 2003. Histopathological alterations of white seabass, lates calcarifer, in acute and subcronic cadmium exposure. Environmental pollution 121: 307-320.
- ✓ Thornberry NA, Lazebnick Y. 1998. Caspases: enemies within. Science 281, 1312– 1316 (Review).
- ✓ Tiffany-Castiglioni E, Sierra EM, Wu JN, Rowles TK. 1989. Lead toxicity in neuroglia. Neurotoxicology 10(3):417-43.
- ✓ Tiffany-Castiglioni E, Legare ME, Schneider LA, Hanneman WH, Zenger E, Hong SJ. 1996. Astroglia and neurotoxicity. In: Aschner M, Kimelberg HK, editors. The role of Glia in Neurotoxicity. Boca Raton: CRC Press pp.175-200.
- ✓ Tiffany-Castiglioni E, Qian Y. 2001. Astroglia as metal depots: molecular mechanisms for metal accumulation, storage and release. Neurotoxicology. 22(5):577-92.
- ✓ Thophon S, Kruatrachue M, Upatham ES,Pokethitiyook P, Sahaphong S, Jaritkhuan S. 2003. Histopathological alterations of white seabass, Lates calcarifer, in acute and subchronic cadmium exposure. Environmental Pollution 121; 307– 320.
- ✓ Triebskorn R, Kohler HR. 1996. The impact of heavy metals on the grey garden slug Deroceras reticulatum (Muller) metal storage, cellular effects and semi quantative evaluation of metal toxicity. Environmental Pollution 93, 327–343.
- ✓ Tsangaris G, Tzortzatou-Stathopoulou F. 1998. Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. Toxicology, Vol. 128, No 2, pp 143-150.

- ✓ Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga N. 1991. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. Neuron 7 337-347.
- ✓ Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. 2001. Control of synapse number by glia. Science 291: 657-660.

#### v

- ✓ Vaughn JE, Pease DC. 1970. Electron microscopic studies of wallerian degeneration in rat optic nerves. II. Astrocytes, oligodendrocytes and adventitial cells. J Comp Neurol.;140(2):207-26. No abstract available.
- ✓ Vaughn JE. 1969. An electron microscopic analysis of gliogenesis in rat optic nerves. Z Zellforsch Mikrosk Anat.;94(3):293-324. No abstract available.
- Vega MM, Marigómez JA, Angulo E. 1989. Quantative alterations in the structure of the digestive cell of Littorina littorea on exposure to cadmium. Mar. Biol. 103, 547–553.
- Venugopal B., Luckey T.D. 1978. "Chemical toxicity of metals and metalloide". Metal Toxicity In Mammals 2 Plenum Press, New York and London, pp. 24-32, 69-86,185-195, 248-253, 275-283.
- ✓ Voigt T. 1989. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. J. comp. Neurol. 289: 74-88.

# Y

✓ Yang CS, Tzou BC, Liu YP, Tsai MJ, Shyue SK, Tzeng SF. 2007. Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium. J Cell Biochem (Epub ahead of print).

- <u>Bibliografia</u>
- ✓ Yen SH, Fields KL. 1981. Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate proteins bind to different cell types of the nervous system.
   J. Cell. Biol.88, pp.115-126.
- ✓ Young JK, Garvey JS, Huang PC. 1991. Glial immunoreactivity for metallothionein in the rat brain. Glia 4(6):602-20.

#### W

- ✓ Waalkes MP. 2003. Cadmium carcinogenesis. Mutat Res. 533:107-20.
- ✓ Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KMK. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. Free Rad Biol Med;36(11):1434-43.
- ✓ Wasowicz M, Pierre J, Reperant J, Ward R, Vesselkin NP, Versaux-Botteri C. 1994. Immunoreactivity to glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the brain and spinal cord of the lamprey (Lampreda fluviatilis). Journal of Brain Research 35: 71-78.
- ✓ Watjen W, Cox M, Biagioli M, Beyersmann D. 2002. Cadmium induced apoptosis in C6 glioma cells: Mediation by Caspase 9-activation. Biometals 15(1):15-25.
- ✓ Webster WS, Valois AA. 1981. The toxic effects of cadmium on the neonatal mouse CNS. J Neurophatol Exp Neurol;40:247-57.
- ✓ Wong KL, Klaassen CD. 1982. Neurotoxic effects ofcadmium in young rats. Toxicol. Appl. Pharmacol 63:330-337.

# Z

✓ Zaroogian GE, Cheer S. 1976. "Cadmium accumulation by the American oyster, Crassostrea virginica". NATURE, 261:408.

- ✓ Zaroogian GE. 1979. "Studies on the depuration of cadmium and copper by the American oyster Crassostrea virginica". Bull. Environ. Contam. Toxicol, 23:117.
- ✓ Zikic RV, Stajn AS, Ognjanovic BI, Pavlovic SZ, Saicic ZS. 1995. "Actives of superoxide dismutase and catalase in Erythrocytes and transaminases in the plasma of carps (Cyprinus Carpio L.) exposed to cadmium". Physiol Res 46:391-396.
- ✓ Zikic RV, Stajn AS, Pavlovic SZ, Ognjanovic BI, Saicic ZS. 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (Carassius auratus gibelio Bloch.) exposed to cadmium. Physiol Res.; 1:105-11.
- ✓ Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. 1995. The S100 protein family: history, function, and expression. Brain Res Bull 37:417–429.
- ✓ Zimmer DB, Van Eldik LJ. 1986. Identification of a molecular target for the calciumodulated protein S100. Fructose-1,6-biphosphate aldolase. The journal of biological chemistry, 261:11424-28.
- ✓ Zou H, Henzel Wj, Liu X, Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome C-dependent activation of caspase-3. Cell 90:450-413.

#### SITOGRAFIA

- 1) www.dsa.unipr.it/trezzo/uni\_parma/capitoli/inquinanti/cadmio.htm
- 2) http://eurosalus.com/rimedi/minerali/cadmio-cd.html
- 3) http://web.romascuola.net/itaer/vaula/chimica/cadmio.htm
- 4) www.ecplanet.com/canale/salute-7/tumori-59/0/0/7635/it/ecplanet.rxdf
- 5) www.erboristeriaedaltro.com/MINERALI%20CADMIO.htm
- 6) www.assincer.it/assincer/igiene-sanitario%20II.pdf -
- 7) www.ing.unitn.it/~colombo/Cadmio/CdAmbOm.htm
- 8) www.webelements.com/cadmium/

- 9) www.izslt.it/
- 10) www.ilsecondorinascimento.it/Pages/TxtZAN1.htm
- 11)www.webalice.it/cristiana.distefano/mineralogramma.htm
- 12) www.mineral-test-sas.com/Oligoelementi.htm
# **TAVOLE**

**Figura 1:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, controllo. Colorazione cresyl violetto. A livello ventricolare, gli ependimociti presentano forma ovoidale e contorni ben definiti, si presentano come piccole cellule organizzate in file regolari e ravvicinate tra loro.

**Figura 2:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, dopo 2 giorni di trattamento. Colorazione cresyl violetto. A livello ventricolare, gli ependimociti mostrano una morfologia alterata con denso citoplasma intensamente colorato. Le cellule non sono compatte ed organizzate come nel controllo ma dislocate tra spazi irregolari presentando, cosi, perdita delle tipiche caratteristiche strutturali.

**Figura 3:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, dopo 16 giorni di trattamento. Colorazione cresyl violetto. A livello dei ventricoli le cellule ependimali appaiono scarsamente colorate e si osserva disorganizzazione tissutale.

**Figura 4:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, controllo. Colorazione emallume-eosina. Nel chiasma ottico il tessuto appare compatto, le cellule distribuite in gruppi o isolate.

**Figura 5:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, controllo. Colorazione tricromia di Mallory. Nel telencefalo il tessuto appare compatto, le cellule distribuite in gruppi o isolate, aventi nucleo piccolo e tondeggiante.

**Figura 6:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, dopo 7 giorni di trattamento. Colorazione emallume-eosina. A livello del chiasma ottico il tessuto appare meno compatto ed omogeneo e a ridosso delle cellule si nota una contrazione del tessuto con la comparsa di spazi vuoti.

**Figura 7:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, dopo 7 giorni di trattamento. Colorazione tricromia di Mallory. A livello del chiasma ottico il tessuto appare meno compatto ed omogeneo e a ridosso delle cellule si nota una contrazione del tessuto con la comparsa di spazi vuoti.



**Figura 8:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, controllo. Colorazione cresyl violetto. Nella sostanza grigia del cervelletto le cellule sono ravvicinate, con forma tonda e citoplasma con granuli scuri; le cellule del Purkinje presentano citoplasma colorato intensamente, nucleo grande con nucleolo ben visibile.

**Figura 9:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, dopo 7 giorni di trattamento. Colorazione cresyl violetto. Nella sostanza grigia del cervelletto le cellule appaiono più chiare e addossate tra loro, anche le cellule del Purkinje presentano lieve riduzione del citoplasma e debole colorazione.

**Figura 10:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, dopo 16 giorni di trattamento. Colorazione cresyl violetto. Nella sostanza grigia del cervelletto le cellule appaiono più chiare e addossate tra loro, anche le cellule del Purkinje presentano lieve riduzione del citoplasma e debole colorazione.

**Figura 11:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, controllo. Colorazione emallumeeosina. Il tessuto appare ben vascolarizzato ed i capillari presentano dimensioni normali.

**Figura 12:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, dopo 16 giorni di trattamento. Colorazione emallume-eosina. Si nota l'incremento del calibro dei vasi tra le cellule della sostanza grigia del cervelletto, unito alla disomogeneità del tessuto.

**Figura 13:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, controllo. Colorazione tricromia di Mallory. Il tessuto appare ben vascolarizzato ed i capillari presentano dimensioni normali.

**Figura 14:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, dopo 7 giorni di trattamento. Colorazione tricromia di Mallory. Si riscontra incremento del calibro dei vasi anche in altre zone come a livello telencefalico.

**Figura 15:** Sezione sagittale, encefalo di *Podarcis sicula*, dopo 16 giorni di trattamento. Colorazione tricromia di Mallory. Si riscontra incremento del calibro dei vasi e aumento della dimensione cellulare.



**Figura 16 a-d:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione GFAP. Nell'encefalo del rettile *Podarcis sicula* il pattern generale dell'immunopositività alla GFAP è rappresentato da lunghe e sottili fibre che partendo dai corpi cellulari, localizzati sulla superficie ventricolare si dirigono verso lo strato meningeo. Nel midollo è presente una ricca rete di fibre intensamente marcate e cellule aventi ampio citoplasma, circondate da corte fibre a decorso trasversale.

**Figura 17 a-b:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione GFAP. Nel midollo, si riconoscono gli astrociti, cellule gliali stellate dotate di processi lunghi e ramificati.

**Figura 18:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione GFAP. A livello ependimale si osservano numerose strutture immunopositive.

**Figura 19:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione GFAP. Nella regione ventricolare del mesencefalo l'ependima mostra una maggiore positività e la glia radiale è chiaramente distinguibile.

**Figura 20 a-b:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione GFAP. Nella sostanza grigia del cervelletto si osserva un'intensa immunopositività ed anche i neuroni di Purkinje mostrano una lieve immunoreattività nel citoplasma.



**Figura 21 a-d:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione GFAP. Nel tetto ottico si osserva la presenza di strutture organizzate nella commessura del tetto, inoltre sono riconoscibili le cellule della glia radiale insieme a sottili strutture GFAP<sup>(+)</sup>.

**Figura 22:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione GFAP. Nel diencefalo ed in particolare nell'ipotalamo sono presenti numerose fibre a differente decorso.

**Figura 23 a-d:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione GFAP. Le diverse regioni della parete telencefalica mostrano un'immunomarcatura di differente intensità; in particolare i corpi cellulari ependimali e i corrispondenti processi radiali presentano un'intensa colorazione, sia nella parte dorsale che ventrale.

**Figura 24:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione GFAP. L'espressione della GFAP è stata rivelata anche a livello del chiasma ottico in cui le fibre mostrano una positività omogenea.



**Figura 25:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Nell'ipotalamo i fasci di fibre sono meno cospicui rispetto a quelli del controllo

**Figura 26:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. L'intensità del segnale immunoreattivo nella sostanza grigia del cervelletto è più debole.

**Figura 27-32:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Non sono state evidenziate notevoli alterazioni nelle altre porzioni encefaliche riguardo l'espressione della glia radiale.



**Figura 33:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Persiste la debole intensità del segnale GFAP<sup>(+)</sup> nel cervelletto.

**Figura 34:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Si osserva riduzione della distribuzione delle fibre nel tetto ottico.

**Figura 35:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Si osserva riduzione della distribuzione nel telencefalo.

**Figura 36:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. La glia radiale è debolmente marcata nel telencefalo.

**Figura 37:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. La glia radiale è debolmente marcata a livello ventricolare.



**Figura 38 a-b:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Si osserva un ulteriore decremento della glia radiale nel midollo.

**Figura 39 a-b:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Si osserva un ulteriore decremento della glia radiale nel tetto.

**Figura 40:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Si osserva un ulteriore decremento della glia radiale nel telencefalo.

**Figura 41:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Simile al controllo appare la positività delle strutture GFAP<sup>(+)</sup> a livello dell'ipotalamo.

**Figura 42:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Simile al controllo appare la positività delle strutture GFAP<sup>(+)</sup> a livello del chiasma ottico.

**Figura 43:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Nel cervelletto l'espressione della GFAP è intensa ma rappresentata da un numero minore di strutture.



**Figura 44:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione S100. Marcatura degli ependimociti tenue o assente.

**Figura 45 a-c:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione S100. Si osservano fasci ben definiti nel midollo.

**Figura 46 a-b:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione S100. I fasci di fibre si estendono oltre il diencefalo giungendo a livello della zona caudale del telencefalo.

**Figura 47:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione S100. Sottili fibre si osservano nel tetto.

**Figura 48:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione S100. Fibre immunopositive si osservano nel cervelletto.

**Figura 49:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione S100. Il chiasma ottico appare omogeneamente positivo.



**Figura 50:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Decremento del segnale  $S100^{(+)}$  e della distribuzione delle fibre e degli elementi marcati nel cervelletto.

**Figura 51:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Le fibre S100<sup>(+)</sup> non giungono al telencefalo ma si fermano al diencefalo, dove appaiono meno organizzate.

**Figura 52 a-b, 54:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Una notevole diminuzione coinvolge anche il telencefalo.

**Figura 53:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Nel tetto ottico l'espressione della S100 è ridotta.



**Figura 55:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Decremento della distribuzione delle fibre  $S100^{(+)}$  e dell'intensità del segnale immunoreattivo, prevalentemente a carico dell'ipotalamo.

**Figura 56:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Decremento della distribuzione delle fibre  $S100^{(+)}$  e dell'intensità del segnale immunoreattivo nel cervelletto.

**Figura 57 a-b:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Decremento della distribuzione delle fibre  $S100^{(+)}$  e dell'intensità del segnale immunoreattivo nel telencefalo.

**Figura 58 a-b:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Decremento della distribuzione delle fibre  $S100^{(+)}$  e dell'intensità del segnale immunoreattivo nel tetto.

**Figura 59 a-b:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Nel midollo le strutture positive sono meno cospicue e la rete di fibre sembra meno fitta.



**Figura 60 a-b:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Decremento con riduzione dell'espressione della proteina S100 nel telencefalo.

**Figura 61 a-b:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Riduzione dell'espressione della proteina S100 nel tetto.

**Figura 62 a-b:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Riduzione dell'espressione della proteina S100 nel midollo.

**Figura 63, 64:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Nel cervelletto si osserva una buona reattività della proteina.



**Figura 65 a-d:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. TUNEL. Si osservano rare cellule apoptotiche, aventi nucleo marcato, disposte a caso, nelle varie regioni encefaliche.

**Figura 65 e-j:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 2 giorni di trattamento. TUNEL. Incremento dell'indice apoptotico. Alcuni nuclei delle cellule marcate presentano buona morfologia, con nucleo tondo e membrana delineata, mentre molte altre presentano una morfologia alterata, tipica dell'apoptosi con bordi irregolari, scomparsa del nucleolo e frammentazione della cromatina.


#### DOTTORATO DI RICERCA BIOLOGIA AVANZATA XXII CICLO.

**Figura 65 k-n:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. TUNEL. Incremento dell'indice apoptotico. Cellule aventi nucleo marcato.

**Figura 65 o-r:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. TUNEL. Incremento dell'indice apoptotico. Numerose cellule aventi nucleo marcato.



**Figura 67 a-c:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. Rivelazione caspasi-3. Rare cellule marcate.

**Figura 67 d-f:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione Caspasi-3. Incremento dell'indice apoptotico. Le cellule apoptotiche appaiono per lo più isolate, con citoplasma compatto, rigonfio e spesso con nucleo ridotto e periferico.



**Figura 67 g-j:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione Caspasi-3. Incremento dell'indice apoptotico.

**Figura 67 k-m:** Sezione sagittale. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione Caspasi-3. Incremento dell'indice apoptotico. Cellule aventi citoplasma marcato.



**Figura 68 a:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. TEM. I nuclei delle cellule localizzate nel mesencefalo presentano cromatina poco densa.

**Figura 68 b:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. TEM. E'visibile nel citoplasma il reticolo endoplasmatico rugoso organizzato in cisterne parallele.

**Figura 69 a-b:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. TEM. Visibili granuli di glicogeno sparsi. Si osservano diversi neurofilamenti.



**Figura 70:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. TEM. I mitocondri presentano creste lamellari ben evidenti e matrice densa. Si osservano anche numerosi processi neurogliali, terminazioni ricche di vescicole.



**Figura 71 a-c:**. Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. TEM. Cervelletto. Le cellule presentano addensamenti di cromatina.



**Figura 72 a-b:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. TEM. Cervelletto. Visibile accumulo maggiore delle particelle di glicogeno (riquadro giallo). I mitocondri presentano delle alterazioni, infatti, alcuni sono molto più scuri, con creste addossate.



**Figura 73 a-b:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. TEM. Cervelletto. I mitocondri presentano delle alterazioni, infatti alcuni sono molto più scuri, con creste addossate.

**Figura 73 c:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. TEM. Cervelletto. Riconoscibile qualche cellula apoptotica avente nucleo con forma irregolare, addensamento cromatinico e presenza di inclusioni citoplasmatiche.



**Figura 74, 76:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. TEM. Si osservano zone con spazi vuoti irregolari e discontinuità di tessuto.

**Figura 75:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. TEM. E' riconoscibile qualche cellula apoptotica avente nucleo con forma irregolare, addensamento cromatinico e presenza di inclusioni citoplasmatiche.



**Figura 76 a:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Colorazione cresyl violetto. Il tessuto appare omogeneo con cellule aventi struttura compatta e contorni ben definiti.

**Figura 76 b:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Colorazione emallume-eosina. Il tessuto appare omogeneo con cellule aventi struttura compatta e contorni ben definiti.

**Figura 77:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 7 giorni di trattamento. Colorazione cresyl violetto. Superficie ependimale irregolare a livello dei ventricoli.

**Figura 78:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 7 giorni di trattamento. Colorazione emallume-eosina. Alterazioni nel tetto ottico, con presenza di cellule dislocate differentemente; mentre più internamente si notano spazi intercellulari di differente ampiezza.

**Figura 79:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 7 giorni di trattamento. Colorazione tricromia di Mallory. Nel midollo si nota una rilevante disorganizzazione tissutale.

**Figura 80:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Colorazione tricromia di Mallory. Nel midollo gli elementi cellulari sono ben distribuiti.

**Figura 81:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento. Colorazione emallume-eosina. Sono evidenti spazi dilatati, probabilmente di natura edematosa, con all'interno del materiale fioccoso; le cellule appaiono molto distanziate tra loro.

**Figura 82:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento. Colorazione emallume-eosina. A livello della superficie ependimale il tessuto appare alterato e disomogeneo.

**Figura 83:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Colorazione emallumeeosina. Tessuto ben conservato e distribuzione delle cellule regolare.



DOTTORATO DI RICERCA BIOLOGIA AVANZATA XXII CICLO

**Figura 84 a-b:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione S100. Nel telencefalo l'immunoreattività alla proteina S100 appare debole ma specifica in cellule sparse, localizzate maggiormente nell'area telencefalica dorsale.

**Figura 85 a-b:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione S100. Fibre immunoreattive nel tetto ottico, che attraversano dorso-ventralmente l'intero tetto, giungendo alla superficie esterna.

**Figura 86 a:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione S100. Il corpus cerebellum mostra immunoreattività in piccoli neuroni localizzati maggiormente nello strato superficiale.

**Figura 86 b:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione S100. Una diffusa immunocolorazione si riconosce nella corteccia del cervelletto, nei corpi e nell'albero dendritico di neuroni che formano i nuclei cerebellari.

**Figura 87 a-c:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione S100. Nello strato cellulare della parete del ventricolo diencefalico si identificano cellule gliali subependimali e taniciti, che presentano lunghi processi che entrano nello strato profondo del diencefalo.

**Figura 88 a-c:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione S100. Nel midollo si osserva una marcata positività di cellule e fibre.



#### DOTTORATO DI RICERCA BIOLOGIA AVANZATA XXII CICLO.
**Figura 89 a-c:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Notevole decremento delle strutture S100<sup>(+)</sup> nel midollo.

**Figura 90 a-c:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 2 giorni di tratatmento. Rivelazione S100. Notevole decremento delle strutture S100<sup>(+)</sup> a livello ventricolare.

**Figura 91:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Il segnale appare meno marcato rispetto al controllo ed è evidente la riduzione delle strutture immunopositive a livello ventricolare.

**Figura 92:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Il segnale appare meno marcato rispetto al controllo ed è evidente la riduzione delle strutture immunopositive nel cervelletto.

**Figura 93:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione S100. Il segnale appare meno marcato rispetto al controllo ed è evidente la riduzione delle strutture immunopositive nel telencefalo.

Figura 94: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento.
Rivelazione S100. Si nota la riduzione del segnale immunoreattivo nel tetto ottico.
Figura 95: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento.
Rivelazione S100. Si nota la riduzione del segnale immunoreattivo nel midollo.
Figura 96: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento.
Rivelazione S100. Si nota la riduzione del segnale immunoreattivo nel midollo.
Figura 96: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento.
Rivelazione S100. Si nota la riduzione del segnale immunoreattivo nel telencefalo.



#### DOTTORATO DI RICERCA BIOLOGIA AVANZATA XXII CICLO.

**Figura 97 a-c:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione GFAP. Molto marcato è il segnale immunoreattivo nel midollo dove sono presenti numerosi fasci di fibre aventi differente lunghezza e decorso.

**Figura 98 a-c:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione GFAP. A livello ventricolare non è evidente una simile immunoreattività ma comunque numerosi elementi GFAP sono presenti.

Figura 99: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione GFAP.

Nel cervelletto la reattività nella sostanza grigia è diffusa e marcato appare il citoplasma dei neuroni di Purkinje.

Figura 100: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione GFAP.

Nel tetto ottico sono localizzate sottili e rare fibre immunopositive.

Figura 101: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione GFAP.

Strutture immunoreattive nel telencefalo.



DOTTORATO DI RICERCA BIOLOGIA AVANZATA XXII CICLO. Figura 102: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Riduzione delle fibre immunoreattive nel tetto ottico

**Figura 103:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Riduzione delle fibre immunoreattive a livello ventricolare.

**Figura 104:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Riduzione delle fibre immunoreattive nel midollo.

**Figura 105:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Riduzione dell'espressione nel cervelletto.

**Figura 106:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Riduzione delle fibre immunoreattive nell'ependima.

**Figura 107:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Riduzione del segnale immunoreattivo nel midollo.

**Figura 108:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Riduzione dell'espressione nel cervelletto.

**Figura 109:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Riduzione delle fibre immunoreattive nell'ependima.

**Figura 110:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione GFAP. Riduzione del segnale immunoreattivo nel telencefalo.



**Figura 111 a-d:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione Caspasi-3. Presenti rare cellule apoptotiche, aventi nucleo leggermente marcato.

**Figura 111 e-l:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 2 giorni di trattamento. Rivelazione Caspasi-3. Le cellule presentano differente forma e citoplasma intensamente marcato.



**Figura 112 a-d:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 7 giorni di trattamento. Rivelazione Caspasi-3. Incremento indice apoptotico. Le cellule presentano differente forma e citoplasma intensamente marcato.

**Figura 112 e-h:** Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione Caspasi-3. Incremento indice apoptotico. Le cellule presentano differente forma e citoplasma intensamente marcato.



**Figura 113 a-b, 114:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. TEM. Il tessuto appare compatto, ben conservato, ricco di filamenti, processi neurogliali e terminazioni nervose. I mitocondri presentano buone caratteristiche.

**Figura 115:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Controllo. TEM. Sparsi granuli di glicogeno sono presenti a livello del mesencefalo.



**Figura 116 a-b:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. TEM. Presenza di spazi dilatati tra le cellule.

**Figura 117 a-b:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. TEM. Nel midollo sono presenti diverse cellule apoptotiche aventi condensazione della cromatina, contorni irregolari ed inclusioni lamellari.

**Figura 117 c:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. TEM. Inclusioni costituite da corpi mielinici scuri formati da membrane concentriche addensate, presenti sovente anche nelle terminazioni.

**Figura 118:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 7 giorni di trattamento. TEM. In alcune zone i mitocondri presentano struttura alterata.



DOTTORATO DI RICERCA BIOLOGIA AVANZATA XXII CICLO.

**Figura 119:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. TEM. I mitocondri si presentano rigonfi con forma irregolare; un leggero incremento dei granuli di glicogeno si osserva in diverse zone.

**Figura 120:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. TEM. I filamenti neurogliali, in alcuni casi, presentano discontinuità.



**Figura 121 a-b:** Encefalo di *Podarcis sicula*. Dopo 16 giorni di trattamento. TEM. Strutture autofagiche e vacuoli si osservano nelle cellule del tessuto nervoso di zebrafish. Alcune di queste strutture presentano un singolo grande vacuolo contenente materiale citoplasmatico.

