

LR/86/2

882117

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

---

DOTTORATO DI RICERCA IN METODOLOGIE DI  
BIOMONITORAGGIO DELLE ALTERAZIONI AMBIENTALI

XV CICLO

**SVILUPPO DI METODI DI VALUTAZIONE DEI MECCANISMI  
E DELLE VARIAZIONI ORMONALI NEI CROSTACEI IN  
SEGUITO A STRESS AMBIENTALI**

Dottoranda:

Simonetta LORENZON <sup>168</sup>

CS

Tutore:

Prof. Enrico A. FERRERO

Università degli Studi di Trieste



Cordinatore:

Prof. Enrico FEOLI

Università degli Studi di Trieste



Anno Accademico 2001-2002

# **INDICE**

I-IV

<b><u>1 – INTRODUZIONE</u></b>	1
<b>1.1 - Aspetti generali della risposta immunitaria nei Crustacea</b>	3
1.1.2 - Caratteristiche e funzioni principali degli emociti	4
1.1.3 - Risposta umorale nei meccanismi di difesa	6
1.1.4 - Variazione del numero di emociti in seguito a stress	6
<b>1.2 - Sistema nervoso centrale dei Crustacea</b>	9
<b>1.3 - Sistema endocrino</b>	10
1.3.1 - cHH (crustacean Hyperglycemic Hormone)	12
1.3.2 - Ruolo del cHH e della risposta glicemica nelle variazioni ambientali	14
<b>1.4 - Ruolo dei neurotrasmettitori nei crostacei</b>	17
1.4.1 - Serotonina (5-HT)	17
1.4.2 - Dopamina (DA)	17
1.4.3 - Enkefalina (Enk)	18
1.4.4 - Ruolo dei neurotrasmettitori nella regolazione del cHH e del glucosio emolinfatico	18
<b>1.5 - Scopo della tesi</b>	20
<b><u>2 - MATERIALI E METODI</u></b>	23
<b>2.1 - Mantenimento animali</b>	23
<b>2.2 - Inclusione di tessuti in paraffina e in resina</b>	23
<b>2.3 – Immunoistochimica</b>	24
2.3.1 - Tessuti inclusi in paraffina	24
2.3.2 - Tessuti inclusi in resina	25
2.3.3 - Acquisizione immagini e misure morfometriche	26
<b>2.4 - Prelievo di emolinfa e conta degli emociti in <i>P. elegans</i></b>	26
<b>2.5 - Test di tossicità e conta di emociti in seguito a esposizione a metalli pesanti in <i>P. elegans</i></b>	27
<b>2.6 - Prelievo di emolinfa e misura della glicemia</b>	27

2.6.1 - Effetto sulla glicemia della proteina ricombinante in <i>P. elegans</i> e <i>A. leptodactylus</i>	28
2.6.2 - Effetti sulla glicemia di <i>P. elegans</i> di concentrazioni diverse di rame e mercurio, LPS e bioamine	29
2.6.3 - Effetti delle bioamine sulla glicemia di <i>S. mantis</i> e <i>A. leptodactylus</i>	29
2.6.4 - Effetti del lipopolisaccaride (LPS) sulla glicemia di <i>A. leptodactylus</i>	30
<b>2.7 - Analisi statistica della conta emocitaria e delle variazioni di glicemia</b>	<b>30</b>
<b>2.8 - Epeduncolazione e preparazione dell'estratto di peduncolo</b>	<b>31</b>
2.8.1 - Preparazione dell'estratto di peduncolo per i saggi biologici <i>in vivo</i>	31
2.8.2 - Preparazione dell'estratto di peduncoli e dell'emolinfa per la quantificazione del cHH e della 5-HT	32
<b>2.9 - Quantificazione del cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di <i>P. elegans</i> mediante ELISA</b>	<b>32</b>
<b>2.10 - Quantificazione della serotonina (5-HT) nell'emolinfa di <i>P. elegans</i> e di <i>A. leptodactylus</i> mediante ELISA</b>	<b>34</b>
<b>2.11 - Elaborazione grafica</b>	<b>34</b>
<b><u>3 - RISULTATI</u></b>	<b>36</b>
<b>3.1 - Tossicità dei metalli pesanti</b>	<b>36</b>
3.1.1 - Andamento nel tempo del conteggio totale di emociti (THC) dopo esposizione alle diverse concentrazioni di metalli pesanti	36
3.1.1.1 - Effetti dell'esposizione al mercurio	37
3.1.1.2 - Effetti dell'esposizione al cadmio	38
3.1.1.3 - Effetti dell'esposizione al piombo	39
3.1.1.4 - Effetti dell'esposizione al cromo	39
3.1.1.5 - Effetti dell'esposizione al rame	40
3.1.1.6 - Effetti dell'esposizione allo zinco	41
3.1.2 - Emocitopenia indotta da metalli pesanti	41
3.1.3 - Numero minimo di emociti compatibile con la sopravvivenza	42
<b>3.2 - Cross-reattività dell'anticorpo anti-NenCHH su sezioni di tessuto</b>	<b>44</b>
<b>3.3 - Attività biologica della proteina ricombinante</b>	<b>45</b>

3.3.1 - Saggio biologico in <i>P. elegans</i>	45
3.3.2 - Saggio biologico in <i>A. leptodactylus</i>	46
<b>3.4 - Quantificazione mediante ELISA delle variazioni dei livelli di cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di <i>P. elegans</i> in seguito a stress e valutazione tramite saggio biologico della relazione con la risposta glicemica</b>	<b>49</b>
3.4.1 - Variazione del cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di <i>P. elegans</i> e andamento glicemico dopo esposizione a rame	50
3.4.2 - Variazione del cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di <i>P. elegans</i> e andamento glicemico dopo esposizione a mercurio	51
3.4.3 - Variazione del cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di <i>P. elegans</i> e andamento glicemico dopo esposizione a LPS	53
3.4.4 - Variazione del cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di <i>P. elegans</i> e andamento glicemico dopo iniezione di bioamine	54
<b>3.5 - Effetto di bioamine e di una enkefalina sulla regolazione del glucosio emolinfatico in <i>Squilla mantis</i> e <i>Astacus leptodactylus</i></b>	<b>57</b>
3.5.1 - Concentrazione del glucosio emolinfatico in animali intatti, epeduncolati e nei gruppi di controllo	57
3.5.2 - Effetto della serotonina (5-HT) sulla concentrazione di glucosio su esemplari intatti e epeduncolati di <i>S. mantis</i> e <i>A. leptodactylus</i>	58
3.5.3 - Effetto della dopamina (DA) sulla concentrazione di glucosio in <i>S. mantis</i> e <i>A. leptodactylus</i> interi ed epeduncolati	58
3.5.4 - Effetto della Leucina-enkefalina (L-enk) sulla concentrazione di glucosio di <i>Squilla mantis</i> e <i>Astacus leptodactylus</i> interi ed epeduncolati	59
3.5.5 - Effetto della ketanserina e del ciprohetadina (CPH), antagonisti della 5HT, in <i>S. mantis</i> e <i>A. leptodactylus</i>	60
3.5.6 - Effetto del domperidone antagonista della DA in <i>Squilla mantis</i> e <i>Astacus leptodactylus</i>	62
3.5.7 - Effetto del naloxone, antagonista della L-enk, in <i>Squilla mantis</i> e <i>Astacus leptodactylus</i>	63
<b>3.6 - Effetto del lipopolisaccaride (LPS) sulla glicemia di <i>A. leptodactylus</i></b>	<b>64</b>
<b>3.7 - Variazioni dei livelli di serotonina (5-HT) in <i>P. elegans</i> e <i>A. leptodactylus</i> in seguito a stress</b>	<b>66</b>
3.7.1 - Effetto del LPS sui livelli emolinfatici di 5-HT di <i>A. leptodactylus</i>	66
3.7.2 - Effetto del rame sui livelli emolinfatici di 5-HT di <i>P. elegans</i>	67
3.7.2 - Effetto del rame sui livelli di 5-HT nel peduncolo di <i>P. elegans</i>	68

<b><u>4 – DISCUSSIONE</u></b>	70
<b>4.1 – Effetto dei metalli pesanti sugli emociti di <i>P. elegans</i></b>	70
<b>4.2 - Cross-reattività dell'anticorpo anti-NencHH e attività biologica della proteina ricombinante</b>	74
<b>4.3 – Verifica delle variazioni dei livelli di cHH, mediante ELISA, nel peduncolo e nell'emolinfa di <i>P. elegans</i> in seguito a stress e verifica della relazione con la risposta glicemica</b>	75
<b>4.4 - Effetto di bioamine e di una enkefalina sulla regolazione del glucosio emolinfatico in <i>Squilla mantis</i> e <i>Astacus leptodactylus</i></b>	78
<b>4.5 - Effetto del lipopolisaccaride (LPS) sulla glicemia di <i>A. leptodactylus</i></b>	83
<b>4.6 - Variazioni dei livelli di serotonina (5-HT) in <i>P. elegans</i> e <i>A. leptodactylus</i> in seguito a stress</b>	83
<b><u>5 – CONCLUSIONI E PROSPETTIVE</u></b>	85
<b><u>7 – RINGRAZIAMENTI</u></b>	87
<b><u>7 – BIBLIOGRAFIA</u></b>	88

## 1 - INTRODUZIONE

L'ecotossicologia è la scienza che, utilizzando metodi e concetti propri della tossicologia, applica i principi dell'ecologia e della chimica ambientale allo studio degli effetti delle sostanze tossiche sugli ecosistemi. Inizialmente l'utilizzo di test biologici era rivolto unicamente alla definizione di quanto già accaduto; attualmente, la prospettiva nella quale si inseriscono i test biologici include l'approccio predittivo, utilizzando le analisi come strumento previsionale per la valutazione del rischio ambientale. Un saggio ecotossicologico è una prova che utilizza un sistema biologico come bersaglio. Essa richiede che un organismo vivente sia posto a contatto per un determinato periodo con una sostanza in esame e che si valuti la risposta mostrata dall'organismo (Maffiotti *et al.* 1997).

Gli organismi vengono definiti bioindicatori quando, in presenza di concentrazioni di inquinanti, subiscono variazioni rilevabili del loro stato naturale sia dal punto di vista numerico, permettendo di individuare un danno in atto a livello di popolazione e comunità, oppure quando sono in grado di accumulare le sostanze tossiche presenti e in questo caso sono definiti bioindicatori di accumulo. Un organismo può quindi essere considerato un buon bioindicatore qualora manifesti reazioni identificabili a differenti concentrazioni di dati inquinanti. La moderna tossicologia ambientale tende ad affiancare al monitoraggio basato su bioindicatori quello basato sui biomarker cioè sulla misurazione di variabili biochimiche e fisiologiche negli individui che fornisce informazione sull'esposizione o sul danno in genere già dai primissimi stadi dell'esposizione (McCarthy & Shugart, 1990).

La tossicità indotta da sostanze esogene in molti casi può risultare in interferenze sia direttamente sui composti (enzimi, composti metabolici), sia con la catena di eventi biochimici coinvolti nel controllo omeostatico di processi fisiologici; questi ultimi spesso coordinati da ormoni. Variazioni ormonali possono verificarsi in seguito ad esposizione ad inquinanti; il monitoraggio dei patterns ormonali in seguito a contaminazione da sostanze tossiche può essere un metodo sistematico di valutazione degli effetti, già a concentrazioni subletali.

Inoltre la Comunità Europea con una comunicazione del Dicembre 1999 (COM 1999, 706 final; “Community strategy for Endocrine Disruptors: a range of substances suspected of interfering with hormone systems of humans and wildlife”) invita a prestare particolare attenzione a tutte quelle sostanze definite “Endocrine Disruptors” la cui caratteristica principale consiste appunto nell’interferire con i sistemi ormonali, alterando la loro funzionalità e di conseguenza modificando tutti i meccanismi da essi controllati.

I crostacei sono stati ripetutamente utilizzati come indicatori standard in saggi ecotossicologici (Gentile *et al.*, 1984). E’ stato dimostrato che parametri ematologici, immunologici ed ormonali possono essere usati per valutare e/o monitorare l’impatto di modificazioni dell’ambiente (temperatura, inquinanti inorganici e organici, carica batterica). (Smith, 1991; Fingerman *et al.*, 1996). Ciascuna di queste risposte, rappresenta un segnale integrato del livello di contaminazione dell’area e di conseguenza costituisce un’indicazione del rischio ecotossicologico a cui una popolazione naturale può essere sottoposta (McCarthy & Shugart, 1990). Inoltre ne rivela la conseguente potenziale azione di accumulatori di xenobiotici o vettori di patogeni che abbiano come bersaglio occasionale l’uomo (Söderhäll & Cerenius, 1992) o altro consumatore marino, essendo i crostacei un importante elemento della catena alimentare.

I crostacei posseggono un ampio spettro di risposte di difesa che mirano a prevenire danni e infezioni, il successo di queste reazioni può essere negativamente influenzato dalla presenza di stressori ambientali che indeboliscono l’animale e lo espongono di conseguenza a possibili malattie. L’esposizione a sostanze esogene porta, ad esempio, a variazioni, sul breve e sul lungo periodo, delle funzioni cardiache e respiratorie, del metabolismo energetico, dei meccanismi di osmoregolazione, dei meccanismi ormonali e immunitari. Anche se l’esposizione all’agente stressogeno è breve gli effetti possono perdurare anche per lunghi periodi con problemi che si manifestano sotto forma di ridotta risposta immunitaria, alterazioni della riproduzione e della crescita e ridotta sopravvivenza (Evans, 1999).

Quindi conoscere e approfondire gli effetti delle alterazioni ambientali sui diversi sistemi di difesa e meccanismi fisiologici dei crostacei può aiutare nel mettere

a punto una serie di parametri atti a determinare in maniera precoce la variazione dello stato di salute degli individui.

### **1.1 - Aspetti generali della risposta immunitaria nei Crustacea**

Nell'ambiente marino e di acqua dolce i crostacei convivono con potenziali agenti patogeni e inquinanti e necessitano quindi di un efficace sistema di difesa contro gli effetti letali o debilitanti derivanti dall'invasione di parassiti o batteri opportunisti e dall'esposizione a sostanze tossiche.

La prima difesa, in particolare contro l'attacco dei parassiti, è rappresentata dal possedere una robusta cuticola; rimane comunque essenziale la presenza di un sistema di difesa immunitaria che permetta di combattere microrganismi patogeni che, nel caso di ferite o durante la muta, siano in grado di penetrare nell'emocele. Il possedere un apparato circolatorio di tipo "aperto" rappresenta una ulteriore fonte di vulnerabilità; esso è costituito generalmente da un cuore dorsale dotato di ostii, da cui si originano un insieme di arterie, arteriole e vasi minori che consentono all'emolinfa di raggiungere ogni regione corporea. Dalle branchie e dalle regioni periferiche l'emolinfa ritorna al cuore attraverso seni comunicanti con gli spazi tissutali, entro i quali si riversano le ramificazioni della rete arteriosa. Il sistema immunitario degli invertebrati non presenta un alto livello di specificità né una memoria immunologica ma, considerando il loro successo evolutivo, esso ha sviluppato meccanismi difensivi estremamente rapidi ed efficaci contro le sostanze estranee. (Smith, 1991). I Crustacea basano la loro difesa immunitaria e la risposta a variazioni delle condizioni fisiologiche su tre tipi di risposta:

- Riposta cellulare mediata dalle cellule (emociti) presenti nell'emolinfa.
- Riposta umorale mediata da fattori molecolari presenti nell'emolinfa che agglutinano precipitano e inattivano le particelle estranee.

- Risposta fisiologica soggetta a modulazione ormonale di fattori rilasciati in relazione a meccanismi di interazione tra il sistema nervoso centrale e il sistema endocrino.

### 1.1.2 - Caratteristiche e funzioni principali degli emociti

Gli emociti circolanti nell'emolinfa si suddividono in tre classi principali sulla base di differenze di tipo morfologico, biochimico e funzionale: cellule ialine, cellule semigranulari e cellule granulari o granulociti (Bauchau, 1981; Smith e Söderhäll, 1983 a, b; Hose *et al.*, 1990; Johansson *et al.*, 2000). Le cellule ialine presentano un grande nucleo centrale circondato da un citoplasma basofilo, sono prive di granuli, aderiscono rapidamente *in vitro* emettendo pseudopodi e attuano la fagocitosi (Bauchau, 1981; Gupta, 1986). Le cellule semigranulari sono cellule di tipo intermedio tra le ialine e le granulari, presentano un nucleo sferico o bilobato posto in posizione centrale, presentano granuli, emettono pseudopodi o filipodi, degranulano facilmente *in vitro*. I granuli contengono tra l'altro i componenti del sistema della profenolossidasi (proPO), una cascata enzimatica responsabile della sintesi della melanina che è coinvolta nel meccanismo di risposta immunitaria (Smith e Söderhäll, 1983 b). Infine le cellule granulari, presentano un nucleo piccolo ed eccentrico, contengono granuli grossi e altamente rifrangenti che vengono rapidamente scaricati quando la cellula è esposta a sostanze non-self. (Söderhäll & Smith, 1983). Gli emociti giocano quindi un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria dei crostacei attuando funzioni quali per esempio: trasporto e immagazzinamento di sostanze, sintesi di pigmenti, coagulazione, deposizione della cuticola. Intervengono nella fagocitosi, che rappresenta la prima linea di difesa contro agenti inerti o patogeni che possano aver superato la barriera della cuticola, partecipano infine alla formazione di noduli e capsule, cioè l'aggregazione di emociti intorno al materiale estraneo a cui segue la deposizione di melanina e l'eliminazione di batteri (Bauchau & Plaquet, 1973; Bauchau, 1981; Smith, 1991; Chisholm & Smith, 1992; Smith & Chisholm, 1992). Il numero di emociti circolanti è influenzato da una serie di fattori esterni e può variare anche in maniera drastica. È quindi

necessario che nuovi emociti vengano prodotti in maniera compensatoria da parte degli organi emopoietici. Gli organi emopoietici, in molti crostacei, sono situati sul dorso e dorso-lateralmente sopra lo stomaco, circondati da un sottile strato di tessuto connettivo; il tessuto emopoietico generalmente è organizzato in lobuli densamente compattati che contengono cellule staminali, emociti in maturazione e cellule mature (Ghiretti-Magaldi *et al.*, 1977, Martin *et al.*, 1993, Chaga *et al.*, 1995). Nei crostacei il meccanismo di duplicazione degli emociti nel caso di massiccia richiesta di cellule in circolo non è ancora ben definito. Oltre alla sintesi da parte degli organi emopoietici recentemente è stata proposta l'esistenza di cellule proliferative in circolo anche se, ad oggi, sono poche le informazioni inerenti al tipo di cellule in grado di attuare la proliferazione e alla velocità di risposta. Sequeira *et al.* (1996) mediante analisi citofluorimetrica hanno dimostrato in *Penaeus japonicus in vivo* la presenza di cellule in proliferazione, anche se il loro numero risulta molto basso (al di sotto dell'1%). Un aumento notevole di cellule in proliferazione però è stato riscontrato nell'emolinfa in seguito a stimolazione mediante lipopolisaccaride. Nel granchio *Liocarcinus depurator* è stato recentemente dimostrato (Hammond & Smith, 2002) che un piccola popolazione di cellule *in vitro* è in grado di effettuare sintesi di DNA e che il loro numero aumenta notevolmente nei campioni di emolinfa di animali trattati con lipopolisaccaride. Quindi questo tipo di proliferazione andrebbe ad aggiungersi, in caso di infezione o contaminazione, alla produzione degli emociti dagli organi emopoietici.

Il numero di emociti circolanti influisce sullo stato di salute generale dei crostacei e può quindi essere candidato a indicatore (biomarker) della alterazione dell'ambiente di vita sia naturale che in condizioni di allevamento. Inoltre in invertebrati marini in ambienti contaminati si sono verificati decrementi nella risposta immunitaria (Gopalan & Young, 1975; Young & Pierce, 1975; Cooper & Parrinello, 1996) e la necessità di ridurre gli effetti letali e debilitanti degli organismi patogeni ha stimolato un nuovo interesse per i meccanismi di difesa dei Crustacea (Smith, 1991). Il conteggio totale degli emociti circolanti (THC) e il conteggio emocitario differenziato (DHC) variano tra specie diverse (Lorenzon *et al.*, 1999 tabella 3, pp 46-47) e sono influenzati da una serie di fattori intrinseci ed estrinseci.

### 1.1.3 - Risposta umorale nei meccanismi di difesa

Oltre alla risposta di tipo cellulare, a livello immunitario, si verifica anche una risposta di tipo umorale che coinvolge una serie di fattori molecolari presenti nell'emolinfa quali sostanze in grado di attuare l'agglutinazione, la precipitazione e l'inattivazione di particelle non-self, e che presentano anche capacità battericide e litiche. Sono considerati fattori umorali anche alcuni fattori fungotossici, antivirali e citotossici (Smith & Chisholm, 1992; Chisholm & Smith 1995).

Il sistema di attivazione della profenolossidasi (proPO), localizzato sia nelle vescicole citoplasmatiche delle cellule granulari e semigranulari che nella frazione solubile dell'emolinfa, gioca un ruolo centrale nel riconoscimento dei fattori esogeni e nella conseguente attivazione degli emociti nei meccanismi di difesa. Altra componente dei meccanismi di difesa umorale è rappresentata dai meccanismi e sostanze (fattori coagulogeni) che regolano la coagulazione dell'emolinfa (Bauchau 1981, Ratcliffe *et al.*, 1982; Durliat, 1985). Esistono inoltre fattori plasmatici, quali agglutinine e lectine, che sono in grado di incrementare la risposta immunitaria facilitando il riconoscimento del non-self in quanto causano la precipitazione e l'agglutinazione delle particelle estranee presenti nell'emolinfa favorendo l'azione fagocitotica degli emociti (Amirante, 1986; Smith, 1991; Smith & Chisolm 1992)

### 1.1.4 - Variazione del numero di emociti in seguito a stress

Tra i fattori emato-immunologici valutati nei crostacei sottoposti a condizioni di stress il conteggio totale degli emociti (THC) è quello che ne risulta maggiormente influenzato. La temperatura è uno dei più importanti fattori chimico-fisici in grado di influenzare il numero di emociti circolanti nell'emolinfa dei crostacei. Un lento e graduale innalzamento della temperatura da 10 a 20 °C per 5 giorni causa un aumento del THC in *Carcinus maenas*; al contrario una rapida variazione da 10 a 20 °C non causa alcuna effetto significativo nel numero di cellule circolanti (Truscott & White, 1990). Una maggiore densità di emociti è stata riscontrata invece nel granchio *Emerita asiatica* dopo una rapida e temporanea variazione della temperatura

(Ravindranath, 1977). Nel granchio *Uca pugilator* acclimatato a bassa temperatura (10° C) sono state trovate un numero inferiore di cellule circolanti, un minor livello di proteine dell'emolinfa e un tempo di coagulazione più elevato rispetto ad individui acclimatati ad alte temperature (30° C) (Dean & Vernberg, 1966). Più recentemente (Sánchez *et al.*, 2001) anche in *Litopenaeus setiferus* l'acclimatazione a temperature diverse induce una variazione nel THC e nel DHC. La salinità è un'altro fattore chimico-fisico di cui recentemente è stata dimostrata la capacità di alterare il THC: infatti nel gambero *Farfantepenaeus paulensis* l'adattamento per 2 settimane a bassa salinità induce un abbassamento del numero di emociti circolanti (Perazzolo *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda fattori estranei, l'iniezione di batteri nel granchio *C. maenas* induce *in vivo* una marcata emocitopenia e un gran quantitativo di batteri sono rapidamente eliminati dalla circolazione emolinfatica (circa il 75% in 5 minuti) (Smith & Ratcliffe, 1980 b). Un simile livello di eliminazione di materiale estraneo iniettato e di riduzione nel numero di cellule è stato riscontrato anche in *Homarus americanus* (Cornick & Stewart, 1968) e nel gambero di acqua dolce *Parachaerax bicarinatus* (McKay & Jenkin, 1970). In *C. maenas* il numero di emociti ritorna ai valori iniziali dopo 24 h suggerendo che si sia attivata l'emopoiesi e/o una mobilitazione dal pool sessile (Smith & Ratcliffe, 1980 b). Eventi analoghi sono stati dimostrati in *Pacifastacus leniusculus* infettato con il fungo *Aphanomyces astaci* (Persson *et al.*, 1987; Soderhäll *et al.*, 1988).

Nel gamberetto *Crangon crangon* il THC viene significativamente ridotto da un'esposizione sul breve periodo a concentrazioni sub-letali di bifenili policlorurati (PCB), in particolare animali esposti all'isomero PCB 15 in concentrazioni subletali (tra 0.05 µg e 500µg L<sup>-1</sup>) mostrano un alterato volume emolinfatico e un ridotto numero di emociti circolanti, mentre l'isomero PCB 77 causa degli effetti meno drastici (Smith & Johnston, 1992).

I batteri gram negativi presentano sulla membrana esterna il lipopolisaccaride (LPS) che rappresenta la componente di maggiore importanza sotto il profilo microbiologico, immunologico e medico in quanto rappresenta il maggior antigene di superficie comune a tali batteri. Il LPS è generalmente formato da una catena oligosaccaridica esterna ripetuta, che caratterizza i diversi ceppi batterici, e un

segmento oligosaccaridico collegato a una frazione lipidica (lipide A) inserito nella membrana esterna (Rietschel *et al.*, 1992). Il lipopolisaccaride è in grado di indurre reazioni ormonali, metaboliche e immunitarie (mediate da citochine) nell'arco di poche ore (Cannon, 1992). L'esposizione degli emociti al LPS induce *in vivo*, sia direttamente che mediante emoagglutinine circolanti specifiche (Maheswari *et al.*, 1997), la degranolazione dei granulociti (Johansson & Söderhäll, 1985), la liberazione di fattori di coagulazione (Armstrong, 1985) e lectine (Söderhäll & Cerenius, 1992) e l'attivazione della cascata della ProPO che agisce come meccanismo di protezione (Söderhäll & Hall, 1984).

In diverse specie di crostacei, tra cui *P. elegans* e *S. mantis*, l' LPS *in vivo* induce, in maniera dose dipendente, un rapido (generalmente intorno a 3 h dopo l'iniezione) e massiccio decremento del numero degli emociti circolanti; il numero di cellule negli animali che sopravvivono ritorna sui valori iniziali entro 24 h e in alcuni casi si assiste anche ad un innalzamento del numero di emociti (Lorenzon *et al.*, 1999). Il decremento del THC in *P. elegans* è risultato essere dipendente anche dal ceppo batterico di provenienza del LPS (Lorenzon *et al.*, 2002)

In questa ricerca a completamento degli studi già eseguiti sulla variazione di emociti in seguito ad iniezione di LPS in *P. elegans* e in altre specie di crostacei, si è voluto verificare l'effetto dei metalli pesanti sul THC. I metalli pesanti rappresentano un tipo di contaminante ampiamente diffuso, sia per cause naturali che antropogeniche, di cui da tempo si conosce la pericolosità per la sopravvivenza di molti organismi acquatici inclusi i Crustacea (Ahsanullah *et al.*, 1981, Migliore & de Nicola Giudici, 1990). Al momento ci sono però risultati conflittuali sugli effetti dei metalli sul numero di emociti circolanti. Ad esempio l'esposizione per 30 giorni del granchio *Paratelphusa hydrodromus* a concentrazioni subletali di cadmio e piombo causa un decremento dose-relato del numero di emociti circolanti (Victor, 1993; 1994). Al contrario Truscott e White (1990) non hanno rilevato alcuna variazione significativa nel numero di emociti in *C. maenas* dopo esposizione, sempre per 30 giorni, a Hg, Cd o Cu. Queste discrepanze possono dipendere quindi sia dal periodo di esposizione, dal tipo e concentrazione di metallo testato che dalla specie oggetto di studio. Evans *et al.* (1999) non hanno riscontrato, ad esempio, alcuna variazione nel THC di *Cherax tenuimanus* esposto per 24h a 0.1 e 0.5 mg L<sup>-1</sup> di rame disciolto ma

hanno però osservato un progressivo decremento del numero di cellule nell'emolinfa in seguito all'esposizione a 0.2 e 0.8 mg L<sup>-1</sup> di rame per due settimane.

## 1.2 - Sistema nervoso centrale dei Crustacea

Le risposte a variazioni ambientali a modulazione ormonale e la risposta immunitaria si basano su fattori ormonali rilasciati in risposta a meccanismi di comunicazione tra il sistema nervoso centrale e il sistema endocrino.

Il sistema nervoso centrale (SNC) dei Crustacea presenta un'organizzazione strutturale simile in tutto il *Phylum Arthropoda*. Il sistema nervoso centrale dei crostacei decapodi è costituito da coppie di gangli segmentali, uniti gli uni agli altri da commissure e alle coppie adiacenti da connettivi longitudinali, che formano la corda nervosa ventrale. Da ciascun ganglio si originano nervi che raggiungono la periferia. Nei crostacei decapodi macruri questi gangli sono separati, mentre nei brachiuri c'è una fusione dei gangli toracici e dei gangli addominali. Nei gangli i corpi cellulari sono raggruppati alla periferia, mentre il neuropilo forma la parte centrale. I gruppi cellulari sono costituiti soprattutto da motoneuroni e da interneuroni. (Govind, 1992).

Generalmente il cervello, o ganglio sopraesofageo, è la regione più anteriore del SNC, giace tra la base dei due peduncoli oculari, dorsalmente rispetto all'esofago e comprende tre regioni distinte: il protocerebro, il deutocerebro (formato dai gangli anteriori) e tritocerebro (gangli posteriori). Dal protocerebro i nervi ottici innervano i peduncoli oculari; i nervi antennulari del deutocerebro seguono il percorso fino alle antennule mentre i nervi più piccoli innervano la muscolatura del peduncolo oculare. Dal tritocerebro dipartono i nervi antennali; da esso si formano anche dei connettivi circumcentrici attorno all'esofago i quali collegano il cervello con il cordone nervoso. Lungo questo tessuto si trovano i gangli commisurali, piccoli e appaiati e i loro neuroni che sono coinvolti in funzioni neuroormonali e nel controllo del ganglio stomatogastrico. Il ganglio ottico contenuto nei peduncoli oculari è composto da una serie di strutture: la *lamina ganglionaris*, la *medulla externa*, la *medulla interna* e la *medulla terminalis* ed adiacente ad essa il corpo emielissoide. Gli assoni che

connettono la lamina alla *medulla externa* e questa alla *medulla interna* formano un chiasma. La ghiandola del seno (SG) e l'organo X (XO) sono le principali strutture neuroormonali associate al ganglio ottico (Govind, 1992) (Fig.1).

Il cordone nervoso si trova in posizione ventrale rispetto ai gangli commissurali, ed è costituito dal ganglio subesofageo, da una catena gangliare toracica (5 gangli) e una addominale (6 gangli). Il ganglio subesofageo, posto al di sotto della bocca, contiene i neuroni che innervano la bocca e le branchie. Da ogni ganglio toracico e addominale si diramano i nervi diretti verso la parete del corpo, la muscolatura e le branchie (Aramant & Elofsson, 1976; Sandeman, 1982; Beltz, 1995).

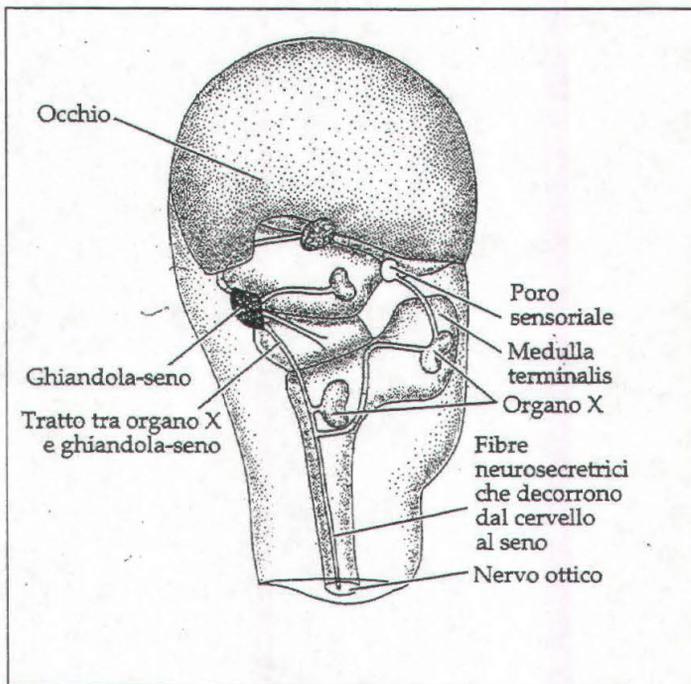


Figura 1. Organizzazione generale del tessuto nervoso e neuroendocrino all'interno del peduncolo oculare. (da Brusca & Brusca, 2000).

### **1.3 - Sistema endocrino**

Il sistema neuroendocrino dei crostacei consiste di tipiche ghiandole endocrine, di strutture aventi origine neurale, cellule neurosecretrici e organi neuroemali

(Fingerman, 1987). Le più importanti ghiandole neuroendocrine dei crostacei decapodi sono la ghiandola del seno, gli organi postcommissurali e gli organi pericardici. Si tratta di organi neuroemali; un organo neuroemale è costituito da terminali assonici di cellule neuroendocrine, in stretta associazione con il sistema vascolare, in cui i neuroormoni sono immagazzinati e rilasciati.

Contrariamente ai vertebrati, nei crostacei decapodi i neuroormoni sono molto più numerosi degli ormoni di origine non nervosa. Gli organi postcommissurali sembrano derivare da cellule cerebrali, più precisamente dal tritocerebro, e producono neuroormoni ad attività cromatoforotropa, cioè regolano la dispersione o la concentrazione dei pigmenti dei cromatofori cutanei, responsabili dei cambiamenti di colore. Gli organi pericardici si trovano nella cavità pericardica e contribuiscono alla regolazione del battito cardiaco (Fingerman, 1992).

La componente più importante del sistema neuroendocrino nei Decapoda, posta nei gangli ottici dei peduncoli oculari, consiste in un complesso formato dall'associazione Ghiandola del Seno – Organo X (SGXO), cui è deputata la sintesi e il rilascio di diversi neuropeptidi fra cui quelli della famiglia cHH/MIH/GIH/MOIH (Fingerman *et al.*, 1996; Garcia & Aréciga 1998, Bocking *et al.*, 2001).

Il cHH (crustacean Hyperglycemic Hormone) riveste un ruolo significativo nella regolazione del glucosio emolinfatico, nei processi di muta come in quest'ultimo caso il MIH (Molt Inhibiting Hormone). Il GIH (Gonad Inhibiting Hormone) e il MOIH (Mandibular Organ Inhibiting Hormone) sono invece coinvolti nei meccanismi di regolazione della riproduzione (Fingerman, 1987; De Klejin & van Herp, 1998). Il complesso SGXO è responsabile del controllo e della modulazione di numerosi processi fisiologici nei Decapoda quali appunto: la regolazione del glucosio emolinfatico, la muta, la crescita e la riproduzione, l'osmoregolazione e la migrazione dei pigmenti; regola inoltre l'attività neuronale e la cardioeccitazione. Risulta quindi essere analogo al complesso ipotalamo-neuroipofisi presente nei vertebrati (Fingerman, 1997).

Strutturalmente il complesso SGXO è costituito dall'organo ganglionare della medulla terminale (XO) rappresentato da un gruppo di cellule neuroendocrine sintetizzanti ormoni e un organo neuroemale: la ghiandola del seno (SG). La ghiandola del seno, inizialmente descritta, nei crostacei maggiori, da Hanstrom nel

1933 è sede di accumulo e di rilascio di un'ampia varietà di ormoni. Nel peduncolo oculare di un tipico decapode, la SG si trova nella regione di incontro tra la *medulla intermedia* e la *medulla externa* ed è confinante con un ampio seno venoso da cui è separata da una lamina connettivale (Fingerman, 1992).

I terminali assonici che costituiscono la SG provengono da diverse zone: l'organo X della *medulla terminalis* dà il maggior contributo, ma altre fibre derivano dai gangli ottici, dal cervello e dai gangli toracici (Knowles & Carlise, 1956). L'organo X è il sito principale di sintesi dei neuroormoni, tra i quali anche cHH e GIH (van Herp & Kallen, 1991; De Klejin *et al.*, 1992). Le indagini sulla SG eseguite al microscopio elettronico e studi immunocistochimici con l'utilizzo di antisieri specifici hanno permesso di identificare i tipi di terminali assonici presenti nella SG e i corpi cellulari secernenti i diversi ormoni (Fingerman, 1992; Rotllant *et al.*, 1993; Giulianini *et al.*, 1998).

### 1.3.1 - cHH (crustacean Hyperglycemic Hormone)

Il cHH, l'ormone iperglicemizzante dei crostacei, descritto per la prima volta da Abramowitz *et al.* (1944), è considerato un fattore diabetogeno in quanto implicato nella regolazione della glicemia, con attività di incremento dei livelli di glucosio nell'emolinfa (Fingerman, 1997)

Il cHH è un peptide polimorfico di peso molecolare, variabile da specie a specie, compreso tra i 5.7 e 8.7 KDa (Keller *et al.*, 1985). Il cHH è un ormone pleiotropico, regola il meccanismo del glucosio ma agisce anche inibendo la produzione di ecdisteroidi, del metilfarnesoato e dell'amilasi; partecipa alla regolazione lipidica, alla sintesi delle proteine ovariche e alla regolazione idrominerali (review: Bocking *et al.*, 2001; Willcockson *et al.*, 2002). La sequenza del peptide mostra caratteri altamente conservati; nelle sequenze fino ad oggi individuate nelle diverse specie, che consistono di 72-78 residui amminoacidici, si identifica sempre una struttura invariata costituita da sei cisteine (che formano tre ponti disolfidrici), due arginine, un acido aspartico e una fenilalanina sempre nella stessa posizione (Bocking *et al.*, 2001).

In *Homarus americanus* mediante HPLC di estratti della GS sono state rilevate 4 isoforme del cHH comprese in due gruppi cHH-A e cHH-B (Tensen *et al.*, 1987, 1991). Ogni gruppo è costituito da due isoforme aventi la stessa sequenza amminoacidica, la stessa massa molecolare ma diversa struttura conformazionale. Studi eseguiti su *Homarus americanus*, hanno messo in evidenza i livelli di espressione dell'mRNA presente nell'organo X ed i relativi peptidi emolinfatici rilasciati dalla GS durante il ciclo riproduttivo. Da questi dati si ricava che il cHH-A e il cHH-B sono entrambi coinvolti nell'inizio della fase di vitellogenesi, mentre solo il cHH-B stimola la maturazione degli oociti in seguito alla inseminazione (De Kleijn & van Herp, 1998). Ad oggi la coesistenza di diverse isoforme del cHH è stata dimostrata nella ghiandola del seno di diverse specie: *Procambarus clarkii*, *Procambarus bouvieri*, *Astacus leptodactylus* e *Orconectes limosus* e questa caratteristica è probabilmente responsabile delle molteplici funzionalità del cHH (Ollivaux & Soye, 2000).

Oltre al ruolo nella regolazione del glucosio e nella riproduzione il cHH risulta coinvolto anche in una serie di altri meccanismi. Santos *et al.* (1997) hanno dimostrato, ad esempio, il ruolo del cHH nel controllo del metabolismo dei lipidi in *Chasmagnathus granulata*, in *C. maenas* e in *O. limosus*, dove l'ablazione del peduncolo oculare determina un decremento del contenuto totale dei lipidi nell'emolinfa, effetto che è invertito dall'iniezione di cHH. Inoltre nel gamberone *Penaeus semisulcatus* il cHH inibisce *in vitro* la sintesi proteica dal tessuto ovarico (Khayat *et al.*, 1998). Recentemente è stato dimostrato il ruolo del cHH anche nel controllo del trasporto ionico a livello branchiale e nella regolazione idro-minerale (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000; Morris, 2001).

Oltre che nel complesso SGXO il cHH è sintetizzato, in quantità inferiore, anche in altri siti del sistema nervoso. Il cHH è espresso negli organi pericardici di *C. maenas* (Keller *et al.*, 1985), nel cordone nervoso ventrale di *H. americanus* (De Kleijn *et al.*, 1992 a; Chang *et al.*, 1999), nelle radici secondarie dei gangli toracici e nel ganglio sopraesofageo di *H. americanus* (Chang *et al.*, 1999). Non si conosce ancora quale sia la funzione del cHH prodotto al di fuori dei peduncoli oculari. In base a quantificazioni di cHH nell'emolinfa, la quantità di cHH prodotta al di fuori

dei peduncoli oculari non dovrebbe contribuire in modo significativo alla regolazione della glicemia a livello dell'organismo intero (Chang *et al.*, 1998).

Nei crostacei la funzione principale dell'emolinfa è di distribuire in tutto il corpo ossigeno, nutrienti, ormoni e metaboliti e le concentrazioni di quest'ultimi dipendono dallo stato fisiologico dell'animale. La concentrazione di glucosio nell'emolinfa, è correlata ai cambiamenti dei processi anabolici e catabolici e più specificatamente dell'equilibrio dinamico che si instaura tra la via glicogenica/glicogenolitica e la via glicolitica. Il "fattore peduncolo" e quindi il cHH risulta fondamentale nella regolazione in quanto media l'utilizzo del glucosio nelle diverse vie metaboliche (Santos & Keller, 1993a). Sono stati eseguiti degli studi sulla modalità di azione del cHH nei suoi tessuti bersaglio (muscolo addominale ed epatopancreas) in modo da valutare il ruolo fisiologico che esso assume nella regolazione metabolica (Santos & Keller, 1993; Sedlemeier, 1997, 1998; Smullen *et al.*, 1996).

### 1.3.2 - Ruolo del cHH e della risposta glicemica nelle variazioni ambientali

Nei crostacei l'omeostasi del glucosio è regolata dal cHH sintetizzato nel peduncolo oculare dall'Organo X della *medulla terminalis* e accumulato e rilasciato dalla Ghiandola del Seno. Sia la variazione del glucosio emolinfatico che il coinvolgimento del cHH sono riportati quali risposte alle variazioni ambientali e agli stress fisiologici.

Esposizione all'aria induce un marcato ma transitorio aumento di glucosio nell'emolinfa del granchio intertidale *Chasmagnathus granulata* (Santos & Colares, 1986) e nel granchio di acqua dolce *Eriocheir sinensis* (Zou *et al.*, 1996); anche nell'anfipode *Niphargus virei* e nell'isopode *Asellus aquaticus* in condizioni di ipossia si manifesta iperglicemia (Hervant *et al.*, 1986). Inoltre nel gamberetto *Crangon crangon* e nel granchio *C. maenas* l'ipossia e l'esposizione a rame e zinco causano un aumento di glucosio (Johnson, 1987). Nel granchio *Cancer pagurus* sottoposto a stress da emersione si sviluppa una rapida iperglicemia negli animali interi ma non in quelli privi del peduncolo oculare (Webster, 1996). L'iperglicemia è

stata riportata come effetto anche nel gambero di acqua dolce *Macrobrachium rosenbergii* in seguito a un abbassamento drastico della temperatura (Kuo & Yang, 1999).

Anche l'esposizione a contaminanti induce variazione del glucosio emolinfatico, i pesticidi organici per esempio inducono iperglicemia in diverse specie di crostacei (Fingerman *et al.*, 1981; Reddy *et al.*, 1983; Reddy *et al.*, 1996). Cu, Hg e Cd inducono variazioni di glicemia in *Macrobrachium kistenensis* e nel granchio *Barythelphusa canicularis* (Nagabhushanam & Kulkarni, 1981; Machele *et al.*, 1989). Il livello di glucosio nell'emolinfa aumenta nel granchio *Scylla serrata* esposto a concentrazioni subletali (2.5 ppm) di cadmio cloruro (Reddy & Bagyalakshmi, 1994). Inoltre il CdCl<sub>2</sub> induce iperglicemia in *P. clarkii*, ma non nel caso che gli animali siano privi del peduncolo oculare, suggerendo in tale modo il coinvolgimento del cHH nel mediare questo tipo di risposta (Reddy *et al.*, 1993).

Nostri studi più recenti (Lorenzon *et al.*, 2000) condotti su *Palaemon elegans* hanno dimostrato l'efficacia di diversi metalli pesanti (la cui scala di tossicità risulta: Hg > Cd > Cu > Zn > Pb) nell'indurre variazioni di glucosio emolinfatico. Hg, Cd e Pb inducono una marcata iperglicemia già dalle prime ore (3 h) dopo l'esposizione ma questo solo nel range delle concentrazioni subletali mentre a concentrazioni più elevate non si riscontrano aumenti significativi del glucosio nell'arco delle 24 h. Al contrario negli animali esposti a diverse concentrazioni di Zn e Cu l'iperglicemia si sviluppa anche a concentrazioni elevate oltre la soglia del LC<sub>50</sub>. Questa differenza può essere probabilmente correlata al ruolo fisiologico di Cu (componente dell'emocianina) e Zn (fondamentale per il funzionamento dei meccanismi regolati da enzimi) rispetto agli altri metalli. Gli animali epeduncolati, seppur più sensibili ai metalli rispetto agli animali interi, non mostrano significative variazioni di glicemia alle diverse concentrazioni. Una ulteriore dimostrazione del coinvolgimento del cHH nel meccanismo di risposta iperglicemica è stata ottenuta mediante l'iniezione in animali privi del peduncolo oculare di estratto di peduncoli proveniente da animali non trattati o da animali esposti a diverse concentrazioni dei vari metalli. Gli animali iniettati con estratto di peduncolo dei gruppi di controllo, di animali trattati con alte concentrazioni di Cd, Hg e Pb o basse concentrazioni di Zn e Cu sviluppano iperglicemia nell'arco di 2 h. In contrasto, l'estratto di peduncolo prodotto da animali

che avevano sviluppato una reazione iperglicemica, dopo esposizione a basse concentrazioni di Cu, Hg o Pb, o alte concentrazioni di Zn e Cu, risultava depleto del cHH in quanto non si assisteva a iperglicemia dopo iniezione in animali epeduncolati (Lorenzon *et al.*, 2000).

Un simile effetto sulle modificazioni del glucosio emolinfatico si riscontra in *P. elegans* e in altre specie di crostacei dopo iniezione di lipopolisaccaride (Lorenzon *et al.*, 1997; 2002). L'effetto iperglicemico indotto da LPS risulta dose-relato e ancora una volta mediato dal cHH presente nel peduncolo oculare; inoltre testando LPS provenienti da ceppi batterici diversi, l'efficacia nell'indurre variazioni nel livello di glucosio risulta legata alla dose ma anche al tipo di LPS testato (Lorenzon *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda il cHH, la quantificazione e le variazioni a livello emolinfatico e peduncolare in seguito a stress sono state rese possibili dalle tecniche immunologiche quali RIA ed ELISA ma le informazioni disponibili sono ancora poche e a volte discordanti. Nelle prime valutazioni il livello base di cHH nell'emolinfa di *Carcinus maenas* è risultato di  $3 \times 10^{-11}$  M ma questo valore cambiava in maniera drastica negli animali stressati salendo a circa  $1 \times 10^{-9}$  M (Klein, 1990). Anche in *Orconectes limosus* un incremento del cHH (all'incirca fino a valori di  $120 \text{ pmol L}^{-1}$ ) in seguito ad ipossia e shock termico è stato dimostrato mediante RIA (Keller & Orth, 1990). In seguito Keller *et al.* (1994) hanno determinato la quantità di cHH presente nella ghiandola del seno del granchio *Cardisoma carnifex* ( $1.8-2 \text{ } \mu\text{g}$  per ghiandola) e il flusso basale di rilascio dell'ormone ( $20-60 \text{ pg min}^{-1}$ ). In *Cancer pagurus* il livello base di cHH nell'emolinfa è di circa  $1 \text{ pmol L}^{-1}$  e raggiunge il valore massimo di  $30 \text{ pmol L}^{-1}$  dopo 4 h di emersione; inoltre è stato valutato che l'emivita del cHH circolante è all'incirca di 5-10 min. (Webster, 1996). Più recentemente Chang *et al.*, (1998) hanno valutato mediante ELISA le variazioni di cHH nell'emolinfa di *Homarus americanus* a livelli base ( $4 \text{ fmol mL}^{-1}$ ) e in seguito a stress da emersione (massimo livello di cHH  $168 \text{ fmol mL}^{-1}$  dopo 4 h) e variazioni di temperatura (circa  $60 \text{ fmol mL}^{-1}$ ). Anche durante le fasi di muta sono state rilevate variazioni del livello di cHH nell'emolinfa in *C. maenas* dove i livelli di cHH nella fase di intermuta sono pari a  $1-5 \text{ fmol } 100\mu\text{L}^{-1}$ , nella fase di tarda premuta i valori crescono fino a  $25 \text{ fmol } 100\mu\text{L}^{-1}$ , per aumentare in

maniera drastica durante l'ecdisi ( $150-200 \text{ fmol } 100\mu\text{L}^{-1}$ ) (Chung *et al.*, 1999). Infine variazioni nel livello di cHH sono state determinate anche in *Nephrops norvegicus* in seguito a infezione da parte di un parassita (Stentiford *et al.*, 2001).

## **1.4 - Ruolo dei neurotrasmettitori nei crostacei**

### **1.4.1 - Serotonina (5-HT)**

La serotonina (5-idrossitriptamina) è sicuramente la bioamina più intensivamente studiata nei crostacei. I primi studi condotti da Elofsson *et al.* (1966) hanno dimostrato la presenza di neuroni serotonergici nel protocerebro, nella *medulla externa e interna* di *Astacus astacus*. Più recentemente con tecniche di immunocitochimica sono stati localizzati neuroni 5-HT immunoreattivi nei gangli del peduncolo oculare e nel sistema nervoso di diverse specie di crostacei; inoltre è stata dimostrata la presenza di 5-HT nell'emolinfa (Elofsson *et al.*, 1982; Livingston *et al.*, 1980; Laxmyr, 1984; Kulkarni & Fingerman, 1992; Fingerman *et al.*, 1994), suggerendo un suo possibile ruolo come neurormone (Rodrigues-Soza *et al.*, 1997). La 5-HT è coinvolta nel controllo e rilascio di molti ormoni tra i quali il cHH, il RPDH (red pigment dispersing hormone) ormone che regola la dispersione del colore e l' MIH (Molt Inhibiting Hormone) (Humanante & Fingerman, 1982; Mattson & Spaziani, 1985; Rao & Fingerman 1975). La serotonina è molto importante anche per il suo ruolo nei meccanismi che regolano il comportamento sociale, i livelli di aggressività nei combattimenti e la postura (Harris & Kravitz 1984; Huber *et al.*, 1997; Listerman *et al.*, 2000).

### **1.4.2 - Dopamina (DA)**

Elofsson *et al.* (1966) mediante tecniche di istofluorescenza ha identificato anche la presenza di neuroni dopaminergici nella *medulla externa e interna* del peduncolo oculare e nel cervello di *Astacus astacus*. Successivamente la presenza di

neuroni contenenti DA è stata evidenziata, mediante tecniche di immunofluorescenza e HPLC, anche nel sistema nervoso centrale di molte specie di crostacei (Elofsson *et al.*, 1968; Elofsson & Klemm, 1972; Elekes *et al.*, 1988; Barthe *et al.*, 1989). La dopamina è coinvolta nei meccanismi di controllo ormonale della riproduzione, della muta, del comportamento e nell'osmoregolazione (Fingerman *et al.*, 1994; Fingerman, 1995; Mo *et al.*, 2002) e in molti casi agisce in maniera antagonista rispetto alla 5-HT (Fingerman, 1997 a). Negli organismi iper-regolatori inoltre l'organo pericardico rilascia 5-HT e DA che risultano coinvolte nell'osmoregolazione (Morris, 2001).

#### 1.4.3 - Enkefalina (Enk)

Jaros e Keller (1983) hanno dimostrato mediante immunofluorescenza la presenza di L-enk nella Ghiandola del Seno, nei gangli del peduncolo e nel cervello di *C. maenas* e *O. limosus*. In seguito la presenza di queste sostanze è stata rilevata in diverse parti del sistema nervoso, nel cervello e nel peduncolo oculare di specie diverse di crostacei (Fingerman *et al.*, 1985; Lüschen *et al.* 1991; Rothe *et al.*, 1991).

Sono molte le attività fisiologiche assegnate alla enkefalina tra le quali il coinvolgimento nella regolazione di vari ormoni, nell'attività locomotoria (Martinez *et al.*, 1988; Saronjini *et al.*, 1995; Rothe *et al.*, 1991), e nei meccanismi di riproduzione in quanto rallenta la maturazione ovarica (Saronjini *et al.*, 1995).

#### 1.4.4 - Ruolo dei neurotrasmettitori nella regolazione del cHH e del glucosio emolinfatico

5-HT, DA e L-enk giocano un ruolo fondamentale nel meccanismo di regolazione del cHH e della conseguente variazione del glucosio nell'emolinfa sia in condizioni fisiologiche sia in situazioni di stress.

Saronjini *et al.* (1995) hanno dimostrato in *Procambarus clarkii* che la dopamina (DA) e la Leucina-enkefalina (L-enk) inibiscono il rilascio del cHH dalla

SG determinando un calo del livello di glucosio emolinfatico e inoltre *in vitro* sopprimono il rilascio di cHH dai tessuti neuroendocrini del peduncolo. L'iniezione delle due sostanze in animali privi di peduncolo è risultata inefficace. Lo spiperone, inibitore dei recettori per la DA, blocca l'azione ipoglicemizzante della DA e non risulta invece in grado di influenzare la capacità ipoglicemica della L-enk.

Al contrario il naloxone (inibitore della L-enk) è in grado di bloccare l'azione sia della L-enk che della DA permettendo il rilascio di cHH. La DA e la L-enk apparentemente inducono l'iperglicemia inibendo il rilascio del cHH e questi risultati suggeriscono che nella catena che induce il rilascio del cHH e che termina con le cellule che secernono l'ormone, un neurone dopaminergico preceda un neurone encefalinergico.

Lüschen *et al.*, (1993) in *Carcinus maenas* hanno dimostrato che la 5-HT e l'octopamina (OA) hanno un effetto dose-relato nell'indurre incremento della glicemia. La serotonina è risultata la più efficace nel produrre iperglicemia e anche elevate dosi di OA causano un notevole aumento del glucosio emolinfatico mentre la DA è risultata solo un blando stimolatore. La 5-HT e la OA causano iperglicemia anche negli animali privi del peduncolo oculare mentre la DA causa iperglicemia solo negli individui interi ma non negli epeduncolati indicando un suo ruolo indiretto nei meccanismi di regolazione.

Rothe *et al.*, (1991) hanno trovato che in *C. maenas* e *Uca pugilator* il rilascio del cHH è inibito dalla L-enk sintetica, effetto che risulta antagonizzato dal naloxone. In esperimenti sia *in vivo* che *in vitro* la L-enk ha dimostrato una azione diretta sulla mobilitazione del cHH, presumibilmente dalla SG visto che non è risultato alcun effetto sulla mobilitazione del glicogeno negli animali epeduncolati.

Più recentemente in *Palaemon elegans* Lorenzon *et al.* (1999) hanno dimostrato che *in vivo* la 5-HT ha un marcato effetto dose-relato nell'elevare il glucosio emolinfatico; questa massiccia iperglicemia risulta bloccata sia dalla ketanserina che dal CPH (inibitori dei recettori per la 5-HT). Iniezioni di DA in animali intatti producono una riduzione del glucosio al di sotto dei valori iniziali ma questo effetto è significativamente inibito dal domperidone. La L-enk causa invece una marcata iperglicemia efficacemente inibita dall'antagonista naloxone. Negli animali

epeduncolati non è stato rilevato alcun effetto significativo per nessuna delle bioamine né per i loro inibitori.

Il ruolo della 5-HT nel mediare il rilascio della cHH è stato ulteriormente confermato in *Chasmagnathus granulata*, *Orconectes limosus* (Santos *et al.*, 2001) e in *Procambarus clarkii* (Lee *et al.*, 2001). La Metionina-enkefalina (M-enk) induce iperglicemia in alcune specie di crostacei infatti Reddy e Kishori (2001) hanno recentemente dimostrato che nel granchio *Scylla serrata* la M-enk *in vivo* induce una rapida iperglicemia dose-relata negli animali interi ma non in quelli privi di peduncolo oculare. Risultati analoghi sono stati ottenuti da Kishori *et al.*, (2001) in *Penaeus indicus* e *Metapenaeus monoceris*, e da Reddy e Basha (2001) nel granchio di acqua dolce *Oziotelphusa senex senex*.

### **1.5 - Scopo della tesi**

Lo scopo di questo progetto di ricerca è stato quello di utilizzare *Palaemon elegans* (Decapoda Caridea) come specie modello, per confermare i dati precedentemente ottenuti presso il nostro laboratorio, e riscontrare nuovi possibili bersagli funzionali delle variazioni ambientali. In particolare si è voluto verificare la risposta del cHH (crustacean Hyperglycemic Hormone) e i suoi meccanismi di regolazione (neurotrasmettitori) e ampliare le informazioni già esistenti sui modelli di risposta verificandole su altre specie di crostacei.

La ricerca si è così articolata:

- Il numero di emociti circolanti nell'emolinfa dei crostacei può essere considerato come il riflesso dello stato di salute e di resistenza (difesa) dell'animale. Gli emociti hanno anche un importante ruolo nella "comunicazione", come sito di accumulo di sostanze che possono venir rilasciate durante il meccanismo di risposta allo stress e per un loro possibile coinvolgimento nei meccanismi di regolazione ormonale. Quindi a completamento dei lavori già svolti su *Palaemon elegans* (Lorenzon *et al.*,

1998; 2002) in cui si è valutato l'effetto sul THC della contaminazione da LPS, in questa tesi si è voluto verificare l'impatto dell'esposizione a metalli pesanti sul numero di emociti in relazione sia al tipo di metallo, che alla concentrazione che ai tempi di esposizione; si è voluto inoltre verificare l'esistenza di un livello soglia minimo di emociti compatibile con la vita dell'organismo.

- Mediante tecniche di immunisto chimica e immunocito chimica si è voluta poi valutare la cross-reattività in *P. elegans*, *Squilla mantis* e *Astacus leptodactylus* dell'anticorpo purificato anti-NencHH (prodotto dal peptide ricombinante di *Nephrops norvegicus*) nei confronti del cHH sia per valutare i siti di accumulo e rilascio sia per utilizzarlo nella quantificazione mediante ELISA dell'ormone presente nell'emolinfa e nei peduncoli di *P. elegans*. Inoltre sia in *P. elegans* che in *A. leptodactylus* si è voluta valutare la cross-reattività e la funzionalità biologica della proteina ricombinante, da cui è stato prodotto l'anticorpo, mediante saggi biologici di misura della glicemia dopo iniezione della proteina.
- Mediante la messa a punto di un protocollo di utilizzo dell'anticorpo anti-NencHH in ELISA si è mirato a determinare e quantificare le variazioni di cHH nel peduncolo oculare e nell'emolinfa di *P. elegans*, affiancando saggi biologici di misura della glicemia. Inizialmente la determinazione è stata eseguita in condizioni naturali per stabilire i livelli di base e di variazione fisiologica del cHH. Successivamente si è voluta valutare la presenza di variazioni contenuto di cHH sia nel peduncolo che nell'emolinfa in seguito all'esposizione a stressori di diversa natura e in particolare metalli pesanti, LPS e bioamine. Questa serie di esperimenti mira quindi a completare le informazioni già esistenti sulla risposta glicemica in seguito a stress in *P. elegans*.
- Lo scopo di questa parte del progetto, vista l'importanza delle bioamine e delle encefaline nei meccanismi di regolazione del cHH, e quindi nella

risposta glicemica, ma viste anche le diverse azioni di ogni singola sostanza nelle diverse specie e la mancanza di dati completi sulle bioamine, è stato quello di integrare i dati già ottenuti in *P. elegans* (Lorenzon *et al.*, 1999), valutando gli effetti delle diverse sostanze su *Squilla mantis* e *Astacus leptodactylus* specie rappresentative di taxa lontani dal punto di vista filogenetico e caratterizzate da habitat molto diversi.

- Infine si è voluto quantificare mediante ELISA la presenza di 5-HT nell'emolinfa di *P. elegans* e *A. leptodactylus* e valutarne le eventuali variazioni in seguito ad esposizione a sostanze estranee.

## **2 - MATERIALI E METODI**

### **2.1 - Mantenimento animali**

*Palaemon elegans* (Rathke) (Decapoda, Caridea 4-6 cm di lunghezza) e *Squilla mantis* (L.) (Stomatopoda; 14-16 cm di lunghezza) utilizzati nelle fasi sperimentali provenivano dalla pesca commerciale effettuata nel Golfo di Trieste; mentre il gambero di fiume *Astacus leptodactylus* (Esch.) (Decapoda, Astacura 8-10 cm di lunghezza) proveniva dalla Turchia tramite un importatore locale.

Gli animali sono stati stabulati in vasche di vetro da 120 L dotate di aerazione e sistema di filtraggio a circuito chiuso con acqua di mare artificiale (Prodac ®) con salinità 36 ‰ (per *S. mantis* e *P. elegans*) o in acqua dolce (per *A. leptodactylus*), temperatura 16-18° C e fotoperiodo L:D naturale (300 lux di intensità). Sono stati alimentati *ad libitum* ogni due giorni con pezzi di pesce e molluschi o con pezzi di carne e fegato nel caso di *A. leptodactylus*. 48 h prima delle serie sperimentali gli animali venivano marcati per il riconoscimento individuale (*S. mantis* e *A. leptodactylus* con una numerazione indelebile sul carapace e *P. elegans* isolati in piccole gabbie (500 mL) di plastica numerate poste poi in vasche più grandi) e mantenuti a digiuno fino alla fine dell'esperimento.

### **2.2 - Inclusione di tessuti in paraffina e in resina**

I peduncoli oculari sono stati prelevati da animali anestetizzati per circa 10 min in ghiaccio e i peduncoli sono stati asportati in corrispondenza della membrana basale articolare. I peduncoli oculari di *Squilla mantis* e *Astacus leptodactylus* sono stati fissati in liquido Bouin (15 parti di acido picrico, 5 parti di formalina 1 parte di acido acetico) per 24 h a temperatura ambiente (RT), in seguito i campioni sono stati lavati in acqua corrente per 30 minuti e poi disidratati mediante immersione in serie ascendente di etanolo: 5-12 h in alcool 50°, 3 passaggi da 30 min. in alcool 70°, 3

passaggi da 30 min. in alcool 95°, 3 passaggi da 30 min. in alcool 100°. Successivamente i campioni sono stati chiarificati con 3 passaggi da 30 min. in toluene cui è seguito un passaggio di infiltrazione con paraffina al 50% in toluene a 40°C; in seguito sono stati eseguiti 2 passaggi di 1 h a 60°C in paraffina fusa al 100% e un passaggio finale di 12 h.

I peduncoli oculari di *Palaemon elegans* sono stati prelevati come descritto precedentemente e fissati per 12-24 h in glutaraldeide 2% in tampone sodio cacodilato 0.1 M a pH 7.6 contenente saccarosio 0.4M. I campioni sono stati poi lavati per 3 volte (10 min.) nello stesso tampone del fissativo. Il tessuto è stato poi disidratato mediante una serie ascendente di alcoli: alcool 50° 2 passaggi da 10 minuti, 3 passaggi da 15 min in alcool 70°, 3 passaggi da 30 min. in alcool 95°, 3 passaggi da 30 min in alcool 100°. Successivamente i campioni sono stati infiltrati con resina metacrilica LR-White e polimerizzati a 50°C per 24-48 h.

I tessuti inclusi in paraffina sono stati tagliati in sezioni seriate di 7 µm di spessore con microtomo rotativo Leitz Minot, le sezioni sono state adese su vetrini albuminati o, per la colorazione immunohistochimica su vetrini Superfrost Plus (Bio-Optica). I tessuti inclusi in resina sono stati tagliati in sezioni semifini di 1 µm con un ultramicrotomo Pabisch TOP ultra 150 e raccolte su vetrini Superfrost Plus.

## **2.3 - Immunoistochimica**

### **2.3.1- Tessuti inclusi in paraffina**

Per la colorazione immunohistochimica è stato usato il kit di amplificazione TSA della NEN.

Le sezioni sono state sparaffinate mediante 2 passaggi in xilolo da 10 min, e idratate in una serie discendente di alcoli con un passaggio finale di lavaggio in acqua distillata. I vetrini sono stati immersi in urea 6 M e scaldati in forno a microonde per 1 minuto a 800 W, successivamente lavati in acqua distillata; per bloccare le perossidasi endogene i vetrini sono stati trattati per 15 min. con una soluzione all'1% di perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in tampone fosfato salino (PBS)

pH 7.4. I siti aspecifici sono stati bloccati con una soluzione di 10% di Normal Goat serum (NGS) in tampone 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% NEN TSA Blocking reagent (TNB) incubando per 60 min. in camera umida RT.

Le sezioni sono state poi incubate overnight a 4°C con l'anticorpo primario (anti-*NencHH*; Giulianini et al., 2002) 1:20000 in TNB + 5% di fetal calf serum (FCS) + 1% NGS, come controlli paralleli sono stati utilizzati siero preimmune di coniglio (NRS, normal rabbit serum) e l'anticorpo anti-GST. Dopo una serie di lavaggi (per circa 20 min.) in tampone 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.02% Tween 20 (TNT), è stata eseguita l'incubazione per 1 h con l'anticorpo secondario goat anti-rabbit IgG (NEN) coniugato con la perossidasi di rafano (HRP, Horseradish Peroxidase) in concentrazione 1:200 in tampone TNB. Si è poi proceduto all'incubazione per 10 min. in tiramide biotinilata e in streptavidina coniugata HRP (SA-HRP) diluita 1:100 in TNB per 30 min. a temperatura ambiente.

Dopo una serie di lavaggi in TNT e uno in tampone 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (TB) i vetrini sono stati sviluppati mediante incubazione per 20 min al buio e a 4°C in una soluzione 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 contenente 0.05% diaminobenzidina (DAB) e 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le sezioni sono state poi disidratate in una serie ascendente di alcoli, chiarificate in xilolo per 10 min. e montate con resina Eukitt (Bio-Optica).

### 2.3.2 - Tessuti inclusi in resina.

I vetrini sono stati immersi in urea 6 M e scaldati al microonde per 1 minuto a 800 W, successivamente lavati in acqua distillata; i siti aspecifici sono stati bloccati con una soluzione di 10% NGS in tampone 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 1% BSA e 0.1% Tween 20 (TBB), per 30 min.

Le sezioni sono state poi incubate overnight a 4°C con l'anticorpo primario (anti-*NencHH*) 1:400 in TBB. Come controlli paralleli sono stati utilizzati siero preimmune di coniglio (NRS, normal rabbit serum) e l'anticorpo anti-GST. Dopo aver lavato per 20 min. in tampone 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3, 0.15 M NaCl (TBS) le sezioni sono state incubate per 60 min. con l'anticorpo secondario goat anti-rabbit IgG coniugato con oro colloidale di 5 nm di diametro (British Biocell) diluito 1:200

in TBB. Le sezioni sono state poi lavate in acqua milliQ e sviluppate con il Kit di sviluppo Silver-enhancing (British Biocell) per 20 min. al buio e poi montate con resina Biomount (BBI).

### 2.3.3 - Acquisizione immagini e misure morfometriche

Tutti i vetrini sono stati osservati con microscopio Olympus BX50. Le aree selezionate sono state digitalizzate e salvate come TIFF (Tagged Images Format File). Tutte le misure, le analisi statistiche e la fotocomposizione sono state eseguite con il software di analisi di immagini Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics). La misura automatica dei granuli è stata eseguita utilizzando la funzione della misura media dei diametri (Image ProPlus software).

### 2.4 - Prelievo di emolinfa e conta degli emociti in *P. elegans*

Ad ogni prelievo 50  $\mu$ L di emolinfa sono stati prelevati dal seno pericardico di ogni animale mediante una siringa sterile da 1 mL con ago 25g; la siringa era pre-riempita con 50  $\mu$ L di anticoagulante marino sterile (0.45 M NaCl, 0.1 M Glucosio, 30 mM Trisodiocitrato, 10 mM EDTA e 26mM Acido citrico) per prevenire la coagulazione e mantenere l'integrità degli emociti.

Il numero di emociti per millilitro è stato quantificato usando un emocitometro di Bürker tenendo conto della diluizione dell'emolinfa dovuta all'anticoagulante. La conta degli emociti è stata effettuata nei 3 minuti successivi al prelievo, prima che potessero verificarsi fenomeni di lisi delle cellule, utilizzando un microscopio a contrasto di fase Zeiss Standard RA Light Microscope.

## **2.5 - Test di tossicità e conta di emociti in seguito a esposizione a metalli pesanti in *P. elegans***

Tutte le concentrazioni dei metalli pesanti utilizzati in questa serie di esperimenti sono state scelte nel range subletale (Lorenzon *et al.*, 2000) partendo da circa 1/10 del LC<sub>50</sub> a 24 h con degli incrementi di circa 1/3 di unità logaritmica.

Gruppi di 6 gamberetti sono stati posti in acqua di mare artificiale (Prodac ®) contenente Hg<sup>++</sup> (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 o 5.0 mg L<sup>-1</sup>), Cd<sup>++</sup> (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 o 10 mg L<sup>-1</sup>), Pb<sup>2+</sup> (10, 20, 50, 100, 200 o 500 mg L<sup>-1</sup>), Cr<sup>6+</sup> (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20 o 50 mg L<sup>-1</sup>), Cu<sup>2+</sup> (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 o 2.0 mg L<sup>-1</sup>) o Zn<sup>2+</sup> (1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 o 50.0 mg L<sup>-1</sup>) per 96 h.

Gli animali del gruppo di controllo sono stati mantenuti per lo stesso periodo in acqua di mare non contaminata. Ad intervalli di 0, 1, 2, 3, 5, 8, 24, 48, 72 e 96 h agli animali di ogni singolo gruppo sperimentale venivano eseguito un prelievo di emolinfa (come precedentemente descritto) per il conteggio del numero totale di emociti circolanti (THC = total haemocyte count).

## **2.6 - Prelievo di emolinfa e misura della glicemia**

Sono stati utilizzati per gli esperimenti solo animali di entrambi i sessi che si presentavano in buona salute, con il carapace rigido (cioè non in fase di muta o post-muta); l'emolinfa è stata prelevata dal seno pericardico mediante una siringa sterile da 1 mL con ago 25g. Ad ogni animale sono stati prelevati 50 µL di emolinfa e il prelievo iniziale (tempo zero) è stato eseguito sempre alla stessa ora cioè tra le 9 e le 10 am per ridurre ogni possibile interferenza dovuta alle variazioni circadiane del livello di glucosio (Kallen *et al.*, 1990). Il contenuto di glucosio è stato quantificato mediante l'uso del riflettometro One touch ® II Meter (Lifescan) e kit commerciale di strisce reattive (precisione delle strisce ± 3% CV nel range di misura testato); visto che il tempo di determinazione è molto rapido non è stato necessario l'utilizzo di anticoagulante. Successivamente in ogni set di esperimenti, a seconda della esigenze sperimentali, sono stati eseguiti prelievi a tempi diversi.

Nei risultati le variazioni di glicemia sono espresse come media del: (valore sperimentale al tempo considerato/ valore rilevato a 0 h) -1 in seguito quindi definite come incrementi (o decrementi se al di sotto dello 0).

### 2.6.1 - Effetto sulla glicemia della proteina ricombinante in *P. elegans* e *A. leptodactylus*

Per verificare l'effetto sulla glicemia del peptide ricombinante GST-*Nenc*HH (prodotto dalla dottoressa Romina Metullio nell'ambito del suo progetto di Dottorato di Ricerca in Neuroscienze) espresso in fusione con la proteina batterica GST, 50  $\mu$ L di soluzione contenente il peptide ai diversi dosaggi di  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-7}$  M sono stati iniettati in gruppi di 10 *P. elegans* epeduncolati (come a seguito descritto), poi sono stati effettuati prelievi di 50  $\mu$ L di emolinfa ai tempi 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h e 24 h e si è proceduto alla misura della glicemia come precedentemente descritto. Nei gruppi di controllo gli animali epeduncolati sono stati iniettati rispettivamente con: 50  $\mu$ L di estratto di peduncolo (preparato come in seguito descritto) di *N. norvegicus* pari a 0,1 peduncolo equivalente (PE), 50  $\mu$ L di estratto di peduncolo di *P. elegans* (preparato come in seguito descritto) pari a 1 PE, 50  $\mu$ L soluzione di PBS 0.1% SDS (soluzione con cui i neurormoni sono stati eluiti dalla resina Glutathione Sepharose 4B al fine di valutare un possibile effetto di variazione di glicemia indotto dalla presenza di SDS se pur in forma molto diluita) ed infine 50  $\mu$ L di soluzione salina.

Per verificare l'effetto sulla glicemia del peptide ricombinante 6xHis-*Nenc*HH (prodotto dalla dottoressa Romina Metullio nell'ambito del suo progetto di Dottorato di Ricerca in Neuroscienze) espressi in fusione con un esapeptide (6xHis), costituito da sei residui di istidina, sono state iniettate in gruppi di 5 *A. leptodactylus* epeduncolati 50  $\mu$ L delle due concentrazioni  $10^{-10}$  M (corrispondente all'iniezione di 0.01  $\mu$ g di peptide in ogni esemplare) e  $10^{-8}$  M (corrispondente all'iniezione di 1  $\mu$ g di peptide in ogni esemplare). Come controlli sono stati utilizzati un gruppo di animali iniettati con  $10^{-8}$  M di GST-*Nenc*HH; uno iniettato con PBS (utilizzato per eluire il peptide) ed infine un gruppo iniettato con 50  $\mu$ L di estratto di peduncolo di *A. leptodactylus* (preparato come in seguito descritto) pari a 2 PE.

### 2.6.2 - Effetti sulla glicemia di *P. elegans* di concentrazioni diverse di rame e mercurio, LPS e bioamine

Gruppi di 10 animali sono stati posti in acqua di mare artificiale contenente  $\text{Hg}^{++}$  (0.1, 0.5 o 5.0 mg L<sup>-1</sup>),  $\text{Cu}^{++}$  (0.1 o 5 mg L<sup>-1</sup>), gli animali del gruppo di controllo sono stati mantenuti per lo stesso periodo in acqua di mare non contaminata. Ad intervalli di 0 h, 0.5 h, 1 h, 2h e 3 h e 24h agli animali di ogni singolo gruppo sperimentale è stato eseguito un prelievo di 50 µL emolinfa e si è proceduto alla misura della glicemia come precedentemente descritto.

Nel caso del lipopolisaccaride gruppi di 10 animali sono stati iniettati con LPS di *E. coli* 0111:B4 al dosaggio di 0.1 e 2 mg g<sup>-1</sup> peso vivo la glicemia è stata determinata, come già descritto ai tempi 0 h, 0.5 h, 1 h, 2h, 3 h, 5h e 24 h; il gruppo di controllo è stato iniettato con soluzione salina fisiologica e testato ai medesimi tempi.

Infine gruppi di 10 animali sono stati iniettati con serotonina (5-HT) o dopamina idrocloruro (DA), in concentrazione 10<sup>-8</sup> mol g<sup>-1</sup> peso vivo (soluzione salina per il gruppo di controllo). Ad intervalli di 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h e 24 h agli animali di ogni singolo gruppo sperimentale è stato eseguito un prelievo di 50 µL emolinfa e si è proceduto alla misura della glicemia come precedentemente descritto.

### 2.6.3 - Effetti delle bioamine sulla glicemia di *S. mantis* e *A. leptodactylus*

Per la misura della glicemia ad ogni animale sono stati prelevati 50 µL di emolinfa al tempo 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 8h, 24 h e 48 h dopo l'iniezione di bioamine o/e dei loro antagonisti o di salina nel gruppo di controllo. Serotonina (5-HT), dopamina (DA), Leucina-enkefalina (L-enk), naloxone, ketanserina, ciproheptadina (CPH) e domperidone sono state ottenute dalla Sigma Chemical Company.

Le bioamine e i loro antagonisti sono stati testati alla concentrazione di 10<sup>-8</sup> mol g<sup>-1</sup> peso vivo (tranne nei casi diversamente specificati), dose intermedia nell'intervallo dei dosaggi normalmente utilizzati. Ogni concentrazione è stata iniettata in gruppi di 5 individui per *S. mantis* e di 6 animali per *A. leptodactylus*; la

dose è stata somministrata in 200  $\mu\text{L}$  di soluzione salina fisiologica nel seno pericardico. Controlli, iniettati con sola soluzione salina o con solo il prelievo eseguito ai tempi sopra menzionati sono stati eseguiti al fine di verificare l'effetto della salina o dello stress da prelievo ripetuto e maneggiamento. Per *S. mantis* la soluzione salina sterile per crostacei marini secondo Smith & Ratcliffe (1978) è stata preparata con acqua milliQ, sostanze chimiche pure ed autoclavata per 25 minuti; per *A. leptodactylus* la soluzione fisiologica secondo van Harreveld (1936) è stata preparata come già descritto.

#### 2.6.4 Effetti del lipopolisaccaride (LPS) sulla glicemia di *A. leptodactylus*

Per la misura della glicemia ad ogni animale (interi o epeduncolati) sono stati prelevati 50  $\mu\text{L}$  di emolinfa al tempo 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 8h, 24 h, 48 h, 72h e 96h dopo l'iniezione nel seno pericardico di 100  $\mu\text{L}$  di LPS in soluzione fisiologica proveniente da *Escherichia coli* ceppo 0111:B4 e da *Serratia marcescens*. L'LPS di *E.coli* 0111:B4 è stato iniettato in gruppi di 6 animali ai dosaggi decrescenti di 0.1, 0,01, 0.001 e 0.0001  $\text{mg g}^{-1}$  peso vivo mentre per *S. marcescens* i dosaggi sono stati 0.01, 0.001 e 0.0001  $\text{mg g}^{-1}$  peso vivo. Controlli, iniettati con sola soluzione fisiologica o con solo il prelievo eseguito ai tempi sopra menzionati, sono stati eseguiti al fine di verificare l'effetto della salina o dello stress da prelievo ripetuto e maneggiamento; la soluzione fisiologica secondo van Harreveld (1936) è stata preparata come già descritto.

#### 2.7 - Analisi statistica della conta emocitaria e delle variazioni di glicemia

Tutte le statistiche sono state eseguite mediante SPSS 10 ® per Windows e i dati in seguito riportati sono dati come media  $\pm$  deviazione standard. Il numero totale di emociti (THC) ( $\text{emociti mL}^{-1}$ ) ottenuto per ogni singolo animale per ogni trattamento, concentrazione di metallo e tempo di esposizione è stato comparato con il suo valore al tempo 0. Le differenze tra i numeri assoluti di emociti tra ogni

trattamento e il suo rispettivo controllo è stato analizzato mediante test di Student a due code. Gli effetti dei trattamenti sperimentali sui livelli di glucosio emolinfatico sia rispetto ai valori iniziali che rispetto al controllo sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA), Anova-RM e test di Student. Sono stati considerati significativi valori di probabilità inferiori a 0.05.

## **2.8 - Epedunculazione e preparazione dell'estratto di peduncolo**

Tutti gli animali sono stati privati dei peduncoli oculari 48 h prima dell'inizio delle fasi sperimentali; sono stati anestetizzati per 1 min in ghiaccio e i peduncoli oculari sono stati asportati, dopo aver compresso in corrispondenza della membrana basale articolare con una pinzetta per circa 1min, per evitare una perdita eccessiva di emolinfa; gli animali sono stati rimessi nelle vasche consentendo loro di riprendersi. La mortalità registrata dopo l'epedunculazione è stata minima, non superiore al 10%. I batch di peduncoli prelevati sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al loro successivo uso.

### **2.8.1 - Preparazione dell'estratto di peduncolo per i saggi biologici *in vivo***

Per la preparazione dell'estratto di peduncolo da iniettare per i saggi biologici batch di 20 peduncoli di *P. elegans* e di *A. leptodactylus* sono stati omogenati a freddo in 1 mL di PBS (pH 7.4) (500  $\mu\text{L}$  per *A. leptodactylus*) e centrifugati per 1 h a 14000 g e  $4^{\circ}\text{C}$ . L'estratto di peduncolo di *Nephrops norvegicus* è stato preparato mediante omogeneizzazione di 4 peduncoli a freddo in 2 mL di PBS e successiva centrifugazione per 1 h a 14000 g e  $4^{\circ}\text{C}$ . Nel caso dei peduncoli di *A. leptodactylus* e *N. norvegicus* l'estratto è stato ulteriormente purificato mediante centrifugazione in Microcon 30 KDa (Millipore) per un 1 h a 14000 g e  $4^{\circ}\text{C}$ ; il supernatante così ottenuto è stato prelevato suddiviso in aliquote da 200  $\mu\text{L}$  e mantenuto a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.8.2 - Preparazione dell'estratto di peduncoli e dell'emolinfa per la quantificazione del cHH e della 5-HT

Gruppi di 10 *Palaemon elegans* sono stati sottoposti a diversi trattamenti sperimentali: esposizione a diverse concentrazioni di metalli pesanti: Hg<sup>++</sup> (5, 0,5 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>), Cu<sup>++</sup> (5 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>) e iniezione di bioamine: 5-HT (10<sup>-8</sup> mol g<sup>-1</sup> peso vivo), DA (10<sup>-6</sup> mol g<sup>-1</sup> peso vivo). Come gruppi di controllo sono stati usati animali non esposti a contaminanti nel caso dei metalli e animali iniettati con soluzione salina fisiologica per le bioamine.

Il prelievo dei peduncoli oculari è stato eseguito come precedentemente descritto e i peduncoli sono stati prelevati ai diversi gruppi sperimentali al tempo 0 e poi allo scadere dei tempi di esposizione di 30 min, 1 h, 2 h e 3 h. L'estratto di peduncolo è stato preparato come sopra descritto in 2 mL di PBS a pH 8.0 (si ottiene così 1 peduncolo equivalente in 100 µL di estratto).

Per la preparazione dell'emolinfa gruppi di 10 *P. elegans* sono stati trattati come precedentemente descritto agli animali è stato effettuato un prelievo di emolinfa al tempo 0 e scadere dei tempi sperimentali di 30 min, 1 h, 2 h e 3 h e 5 h, l'emolinfa è stata immediatamente centrifugata per 1 min. a 10000 g al fine di far precipitare gli emociti e il supernatante è stato raccolto in un unico batch dei 10 animali, suddiviso poi in aliquote da 200 µL e mantenuto a -20° C.

Nel caso di *A. leptodactylus* gruppi 3 animali sono stati iniettati con due concentrazioni (0.1 e 0.001 mg g<sup>-1</sup> peso vivo) di LPS di *E. coli* 0111:B4 più il gruppo di controllo iniettato con soluzione fisiologica; i prelievi sono stati effettuati, come descritto precedentemente, ai tempi 0 h, 30', 1 h, 3 h e 8 h l'emolinfa centrifugata e conservati come nel caso precedente di *P. elegans*.

### 2.9 - Quantificazione del cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di *P. elegans* mediante ELISA

Per la quantificazione del cHH è stata effettuata mediante ELISA con immobilizzazione dell'antigene su supporto solido.

Come standard per la quantificazione del cHH è stata usata la proteina ricombinante 6xHisNencHH (MW=11 KDa) in quantità note partendo da 1 µg in 100 µL di PBS. I valori di densità ottica ottenuti nei diversi esperimenti e mediati hanno permesso di ottenere una regressione lineare  $Y = 1.49514 + 0.37828 X$  ( $P < 0.0001$ ), i valori sperimentali in seguito ottenuti sono stati inseriti nella retta di regressione al fine di ottenere le quantità assolute di cHH.

L'estratto di peduncolo in concentrazione pari a 1 peduncolo equivalente (PE) o l'emolinfa pura ottenuti da ogni trattamento sperimentale o dai controlli sono stati diluiti in PBS (pH 8.0) a diluizioni decrescenti di 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 e 0,001. Nei pozzetti di una micropiastra (Coster) sono stati posti 100 µL di campione (emolinfa o estratto di peduncolo) puro e ad ogni diluizione e lasciati ad adsorbire overnight a 4°C in camera umida. Sono stati poi eseguiti 4 lavaggi in 250 µL di PBS-T (PBS + 0,1 % Tween20, pH 7.4) per 5 min. in agitazione (400-500 rpm); il liquido residuo è stato eliminato mediante aspirazione e poi per inversione del piatto su carta assorbente.

Ad ogni pozzetto sono stati poi aggiunti 100 µL di tampone saturante: 3 % BSA (Bovine serum albumine) + 5 % di FCS (Fetal calf serum) in PBS pH 7,4 e incubati per 2 h a temperatura ambiente (RT) in camera umida. Dopo una ulteriore serie di 4 lavaggi in PBS-T (come sopra descritto) ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µL di anticorpo anti-NencHH coniugato con biotina in diluizione 1:1000 e incubato sempre in camera umida per 3 h a 36°C. Successivamente dopo aver eseguito i lavaggi in PBS-T, 100 µL di Streptavidina-HRP 1:5000 in PBS sono stati aggiunti ad ogni pozzetto e lasciati per 1 h a RT.

Il piatto è stato poi di nuovo lavato per 4 volte con PBS-T e sono stati aggiunti 100 µL di 2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonic acid) in tampone acido (Sigma, liquid substrate ready for use) e sviluppato al buio per 1 h a RT. L'assorbanza è stata letta mediante lettore elisa (Anthos 2020 version 1.1) per piastre a 96 pozzetti a 405nm.

## **2.10 - Quantificazione della serotonina (5-HT) nell'emolinfa di *P. elegans* e di *A. leptodactylus* mediante ELISA**

La quantificazione dei livelli di serotonina presenti nell'emolinfa è stata eseguita con l'impiego di un kit commerciale ELISA (ICN). Il kit fornisce il materiale per la determinazione quantitativa della 5-HT derivatizzata. La derivatizzazione è una parte fondamentale del processo che mediante agenti acilanti trasforma la 5-HT in N-acilserotonina.

Il test ELISA è di tipo competitivo: la serotonina acilata e la serotonina legata in fase solida alla micropiastra competono per un quantitativo noto di siti di legame dell'antisiero; quando il sistema è in equilibrio gli antigeni liberi e i complessi antigene-antisiero liberi sono rimossi mediante lavaggio; l'anticorpo legato alla 5-HT in fase solida viene rilevato mediante un sistema anti-rabbit-HRP. Il substrato che sviluppa una reazione colorimetrica in relazione alla perossidasi viene letto a 450 nm. La quantità di anticorpo legata alla 5-HT in fase solida è inversamente proporzionale alla concentrazione di serotonina nel campione.

Su una micropiastra appositata per la derivatizzazione sono stati posti negli appositi pozzetti 10  $\mu\text{L}$  degli standard a concentrazione nota di 5-HT (0  $\text{ng mL}^{-1}$ , 15  $\text{ng mL}^{-1}$ , 50  $\text{ng mL}^{-1}$ , 150  $\text{ng mL}^{-1}$ , 500  $\text{ng mL}^{-1}$  e 2500  $\text{ng mL}^{-1}$ ), 10  $\mu\text{L}$  dei controlli 1 e 2 e 10  $\mu\text{L}$  dei diversi campioni di emolinfa o peduncolo preparati come descritto nel paragrafo 2.8.2. Ad ogni pozzetto sono stati poi aggiunti 250  $\mu\text{L}$  del tampone di acilazione e 25  $\mu\text{L}$  del reagente di acilazione; dopo una incubazione di 15 min a RT in agitazione (400-500 rpm) da ogni pozzetto sono stati prelevati 10  $\mu\text{L}$  di soluzione per il test ELISA e posti nei rispettivi pozzetti della micropiastra adsorbita con 5HT. Ad ogni pozzetto sono stati quindi aggiunti 50  $\mu\text{L}$  di antisiero e incubato per 1 h a RT in agitazione (400-500 rpm). Successivamente il contenuto dei pozzetti è stato eliminato e sono stati eseguiti 3 lavaggi con 250  $\mu\text{L}$  di tampone di lavaggio, il liquido residuo è stato eliminato mediante inversione del piatto su carta assorbente. A questo punto ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di anti-rabbit-IgG coniugato con per ossidasi e incubato in agitazione per 30 min. a RT. Dopo una serie di lavaggi ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di substrato e incubato a RT in agitazione (400-500 rpm) per 20-30 min. La reazione è stata bloccata mediante

l'aggiunta di 100  $\mu$ L di soluzione di stop. La densità ottica è stata letta mediante lettore elisa (Anthos 2020 version 1.1) a 450 nm. Per ogni campione sperimentale sono state eseguite 4 repliche indipendenti. I valori assoluti di 5-HT sono stati ottenuti mediante estrapolazione dalla retta di regressione ottenuta, per ogni set di esperimenti, dai valori di densità ottica degli standard a concentrazione nota.

### **2.11 - Elaborazione grafica**

Nei grafici riportati in seguito nei risultati, le scale temporali dei tempi di esecuzione degli esperimenti, generalmente sull'asse x, non sono riportati in maniera proporzionale per una migliore compattezza e leggibilità del grafico.

### **3. - RISULTATI**

#### **3.1 - Tossicità dei metalli pesanti**

Un test di tossicità standard LC<sub>50</sub> a 96 h preliminare è stato eseguito per i sei ioni metallici su *P.elegans* (Lorenzon *et al.*, 2000). La tossicità dei metalli cresce nel tempo con conseguente calo del valore del LC<sub>50</sub>. Nel test di tossicità statica acuta sulle 96 h Hg<sup>++</sup> (LC<sub>50</sub> = 0.67 mg L<sup>-1</sup>) è risultato il metallo più tossico seguito da Cd<sup>++</sup> (1.46 mg L<sup>-1</sup>), Cu<sup>++</sup> (3.27 mg L<sup>-1</sup>), Cr<sup>6+</sup> (14.86 mg L<sup>-1</sup>), Zn<sup>++</sup> (26.3 mg L<sup>-1</sup>) e Pb<sup>++</sup> (167 mg L<sup>-1</sup>). La Figura 2 mostra il numero percentuale di gamberi morti (n = 97) che si sono riscontrati in ogni intervallo di tempo cumulando gli effetti di tutte le concentrazioni di ogni metallo testato. La mortalità più elevata è stata riscontrata nelle prime 8 h con l'esposizione a Pb<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup> e Hg<sup>++</sup>, in seguito il numero di morti decresce nelle successive 72 h. Nel caso dell'esposizione a Cu<sup>++</sup> o Cd<sup>++</sup> si verifica ancora una elevata mortalità nelle prime 8 h ma la percentuale di animali morti rimane elevata fino a 72 h. Per quanto riguarda il Cr<sup>6+</sup> questo metallo esercita il suo massimo effetto a 48 h. Nel gruppo di controllo non si è verificata alcuna mortalità per tutta la durata dell'esperimento. Per quanto riguarda l'effetto del prelievo di emolinfa effettuato per la conta degli emociti esso induce un lieve decremento del valore del LC<sub>50</sub> di circa il 30%.

##### **3.1.1 - Andamento nel tempo del conteggio totale di emociti (THC) dopo esposizione alle diverse concentrazioni di metalli pesanti**

Questa serie di esperimenti è stata eseguita per verificare gli effetti dell'esposizione a diversi ioni metallici sul numero di emociti circolanti nell'emolinfa. In tabella 1 sono riportati i valori assoluti iniziali di emociti circolanti al tempo 0 per ogni gruppo di animali utilizzati in ogni singolo esperimento.

Gli animali di controllo (non esposti ad alcun contaminante) mostrano un decremento massimo del numero emociti circolanti totali (THC) pari al  $16.5 \pm 6.1$  % (valore assoluto di emociti circolanti =  $17.57 \pm 5.55 \times 10^6$  emociti mL<sup>-1</sup>) a 3 h in

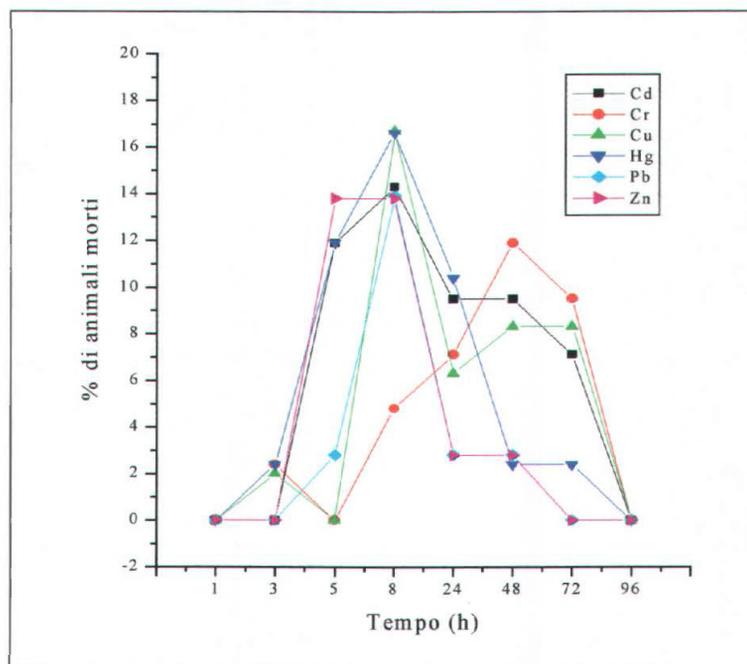


Figura 2. Mortalità percentuale cumulativa nelle 96 h per ogni metallo. I dati si riferiscono alle morti intercorse nell'intervallo di tempo precedente alla rilevazione (1 h = 0 h-1 h).

seguito dopo 8 h il numero di emociti circolanti ritorna sui livelli iniziali (tempo 0 =  $20.57 \pm 8.33 \times 10^6$  emociti  $\text{mL}^{-1}$ ) fino alla fine dell'esperimento.

Tabella 1. Numero iniziale (tempo 0) di emociti circolanti per ogni gruppo sperimentale di animali. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard ( $\times 10^6$  emociti  $\text{mL}^{-1}$ ; n = 6).

	Hg <sup>++</sup>	Cd <sup>++</sup>	Pb <sup>++</sup>	Cr <sup>6+</sup>	Cu <sup>++</sup>	Zn <sup>++</sup>
500 mg L <sup>-1</sup>			30.13 $\pm$ 7.44			
200 mg L <sup>-1</sup>			17.40 $\pm$ 2.98			
100 mg L <sup>-1</sup>			26.35 $\pm$ 3.65			
50 mg L <sup>-1</sup>			37.40 $\pm$ 1.29	21.93 $\pm$ 6.68		23.45 $\pm$ 4.54
20 mg L <sup>-1</sup>			26.56 $\pm$ 1.62	21.75 $\pm$ 6.8	23.41 $\pm$ 6.35	22.42 $\pm$ 5.34
10 mg L <sup>-1</sup>		20.52 $\pm$ 5.52	34.36 $\pm$ 1.19	20.15 $\pm$ 5.03	21.81 $\pm$ 4.18	22.27 $\pm$ 6.87
5 mg L <sup>-1</sup>	26.90 $\pm$ 5.33	15.56 $\pm$ 1.39		20.63 $\pm$ 4.40	21.28 $\pm$ 6.87	23.58 $\pm$ 4.55
2 mg L <sup>-1</sup>	19.15 $\pm$ 3.52	20.23 $\pm$ 7.26		20.93 $\pm$ 5.96	19.57 $\pm$ 3.15	23.77 $\pm$ 5.27
1 mg L <sup>-1</sup>	26.95 $\pm$ 5.58	21.85 $\pm$ 6.63		18.06 $\pm$ 4.73	22.36 $\pm$ 5.99	22.43 $\pm$ 3.06
0.5 mg L <sup>-1</sup>	25.86 $\pm$ 6.24	16.27 $\pm$ 2.39		20.43 $\pm$ 8.19	20.35 $\pm$ 8.74	
0.2 mg L <sup>-1</sup>	24.83 $\pm$ 5.52	21.55 $\pm$ 4.98			21.07 $\pm$ 6.59	
0.1 mg L <sup>-1</sup>	20.31 $\pm$ 7.55	20.63 $\pm$ 8.32			20.85 $\pm$ 4.75	
0.05 mg L <sup>-1</sup>	19.97 $\pm$ 8.01					

### 3.1.1.1 - Effetti dell'esposizione al mercurio

L'esposizione di *P. elegans* (n=6 per ogni gruppo sperimentale) a concentrazioni crescenti di Hg<sup>++</sup> (da 0.05 a 5 mg L<sup>-1</sup>) causa inizialmente una progressiva e significativa riduzione del THC (Student t-test P<0.05) ma in seguito si assiste ad un generale ritorno degli emociti ai valori iniziali (Fig. 3). In base alla concentrazione considerata, il livello minimo di emociti circolanti, espresso come media percentuale rispetto al valore iniziale, ha mostrato valori compresi tra il 49.01  $\pm$  11.51 e il 60.43  $\pm$  15.88 % tra 3 e 8 h (Fig. 3). Alle concentrazioni maggiori di 5, 2,

1 e 0.5 mg mL<sup>-1</sup> il calo di emociti risulta significativamente diverso dal gruppo di controllo per tutta la durata dell'esperimento (P<0.05); le due concentrazioni maggiori risultano letali per tutti gli animali testati entro le 24 h. A 1 e 0.5 mg mL<sup>-1</sup> di mercurio il minimo di emociti circolanti, raggiunto a 8 h, è rispettivamente di 49.01 ± 11.51 e 56.25 ± 3.81 %. Da 24 a 96 h il numero degli emociti negli animali dei gruppi sperimentali risale gradualmente tornando vicino al valore iniziale (tempo zero) anche se a 96 h il numero di cellule risulta inferiore di circa un 10% rispetto ai valori del gruppo di controllo.

La concentrazione intermedia di 0.2 mg mL<sup>-1</sup> induce un calo di emociti che risulta significativamente diverso dal controllo (P<0.05) da 5 h fino alla fine dell'esperimento con un numero minimo di emociti riscontrato ancora a 8 h e pari a 59.22 ± 5.43 %. Alle due concentrazioni più basse testate cioè 0.1 e 0.05 mg L<sup>-1</sup> non si sono riscontrate variazioni significative del THC per tutta la durata dell'esperimento (P>0.05 vs. controllo) (Fig. 3).

### 3.1.1.2 - Effetti dell'esposizione al cadmio

L'esposizione di *P. elegans* a concentrazioni crescenti di Cd<sup>++</sup> (da 0.1 a 10 mg L<sup>-1</sup>) causa un decremento del THC nelle prime 5 h, ma dalle 24 h il numero di cellule ricomincia a salire per ritornare sui valori iniziali (Fig. 4); le due concentrazioni maggiori di 10 e 5 mg mL<sup>-1</sup> risultano letali per tutti gli animali testati entro 72 h.

I valori di THC decrescono gradualmente e in maniera significativa (P<0.05 vs. controllo non trattato) dalla prima ora dopo l'esposizione e il minimo di emociti circolanti è stato rilevato per tutte le concentrazioni testate (esclusa la concentrazione inferiore di 0.1 mg mL<sup>-1</sup>) a 5 h con un decremento del THC di circa il 25-40% in dipendenza dalla concentrazione testata. Tutti questi valori risultano significativamente diversi (P<0.05) da quelli del gruppo di controllo che, allo stesso tempo, mostra un calo massimo del THC di circa il 14% (Fig. 4). Da 5 a 96 h il numero di emociti gradualmente ricomincia a crescere pur rimanendo a 96 h significativamente (P<0.05) più basso (circa dell'8%) rispetto al valore del controllo. Gli animali esposti alla concentrazione di cadmio più bassa (0.1 mg L<sup>-1</sup>) invece

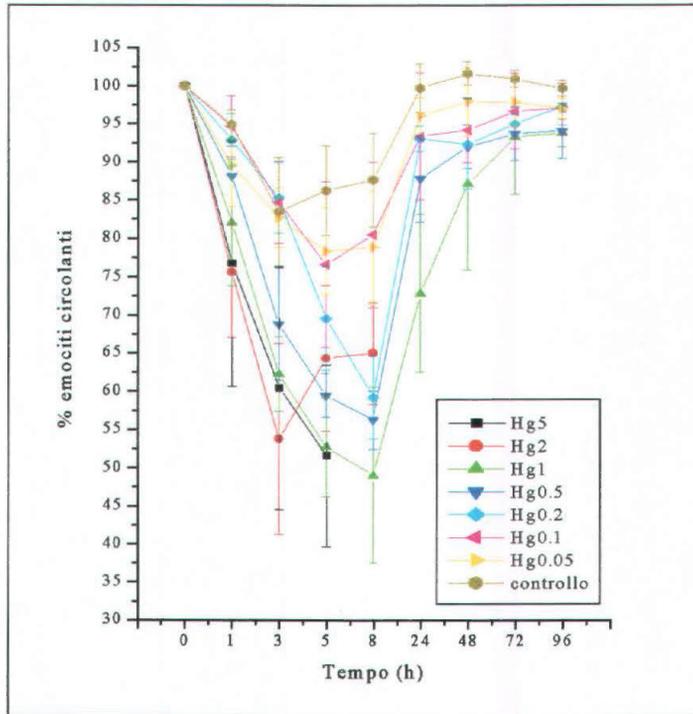


Figura 3. Variazione percentuale del numero di emociti rispetto al valore iniziale in *P. elegans* esposto ad Hg o negli animali del gruppo di controllo non esposti ad alcun contaminante. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=6).

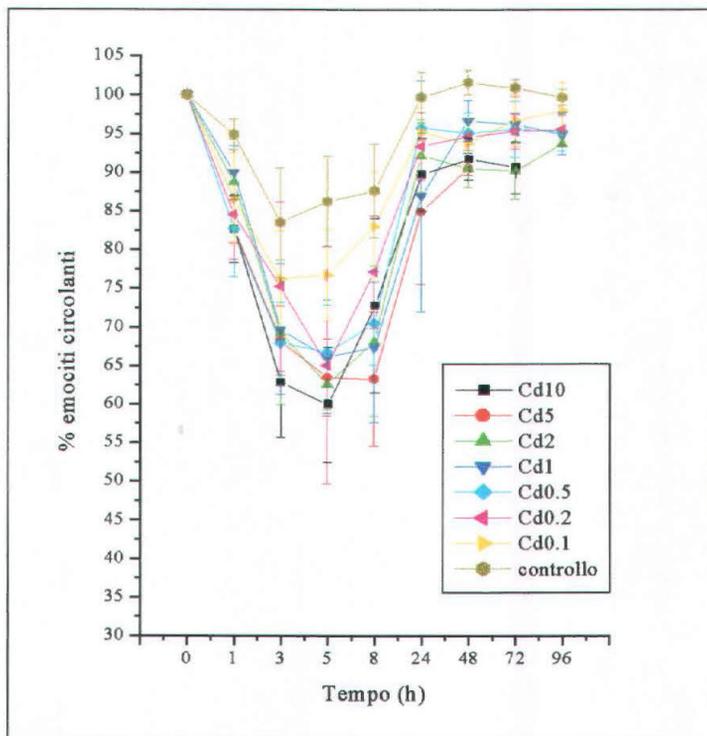


Figura 4. Variazione percentuale del numero di emociti rispetto al valore iniziale in *P. elegans* esposto a Cd o negli animali del gruppo di controllo non esposti ad alcun contaminante. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=6).

recuperano completamente il numero di emociti entro la fine del periodo sperimentale.

#### 3.1.1.3 - Effetti dell'esposizione al piombo

Negli animali esposti al  $Pb^{++}$  (in concentrazioni da 10 a 500  $mg L^{-1}$ ) il massimo decremento del numero di emociti circolanti è stato raggiunto tra 5 e 8 h, con una percentuale di perdita di emociti che cade nell'intervallo tra  $29.1 \pm 3.9$  e  $63.7 \pm 6.3$  % in base alla concentrazione testata (Fig. 5).

Alle tre concentrazioni più elevate 500, 200 e 100  $mg L^{-1}$  il decremento massimo di emociti circolanti si manifesta a 8 h, con una percentuale di calo che si pone tra il 45 e il 64% e risulta significativamente diversa dal gruppo di controllo ( $P < 0.05$ ) che alla stessa ora presenta un calo massimo di circa il 15%; entro le 96 h il decremento si riduce ma resta comunque di circa un 10% inferiore al valore di THC rilevato al tempo zero.

L'esposizione alle tre concentrazioni più basse (50, 20 e 10  $mg L^{-1}$ ) determina il raggiungimento del numero minimo di cellule nell'emolinfa ancora entro 8 h e si assesta mediamente intorno al 40%, valore significativamente diverso dal controllo ( $P < 0.05$ ); dalle successive 24 h fino alla fine dell'esperimento il numero di cellule risale gradualmente fino a raggiungere i valori iniziali al tempo zero (Fig. 5).

#### 3.1.1.4 - Effetti dell'esposizione al cromo

In figura 6 è descritto l'andamento temporale degli emociti di *P. elegans* ( $n=6$  per ogni concentrazione) esposto a  $Cr^{6+}$  (da 0.5 a 50  $mg L^{-1}$ ). Si nota una perdita di emociti circolanti tra 3 e 5 h dopo l'esposizione e in seguito la conta emocitaria risale ai valori iniziali.

Alle due concentrazioni più basse di cromo 1 e 0.5  $mg L^{-1}$  non si sono verificate variazioni significative nel THC ( $P > 0.05$  vs. controllo) per tutta la durata dell'esperimento, con un calo massimo di cellule circolanti, rilevato entro 5 h dopo

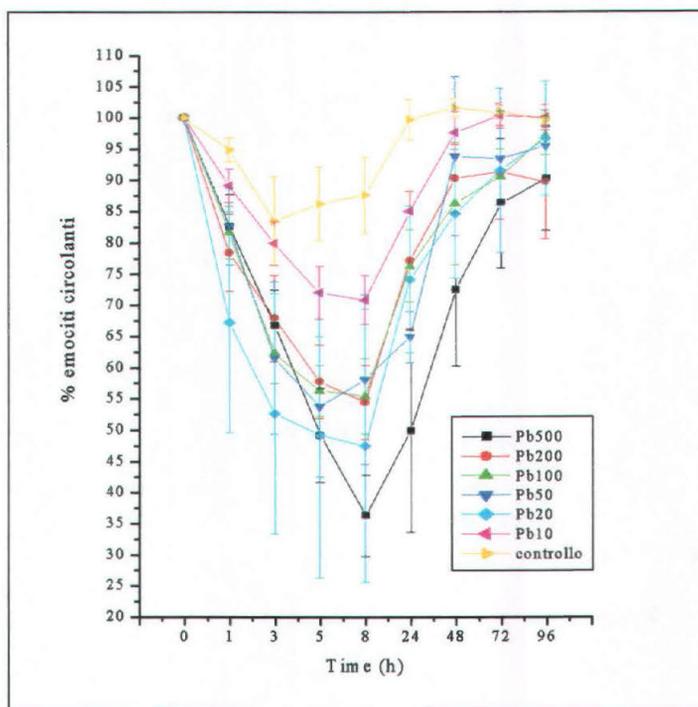


Figura 5. Variazione percentuale del numero di emociti rispetto al valore iniziale in *P. elegans* esposto ad Pb o negli animali del gruppo di controllo non esposti ad alcun contaminante. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=6).

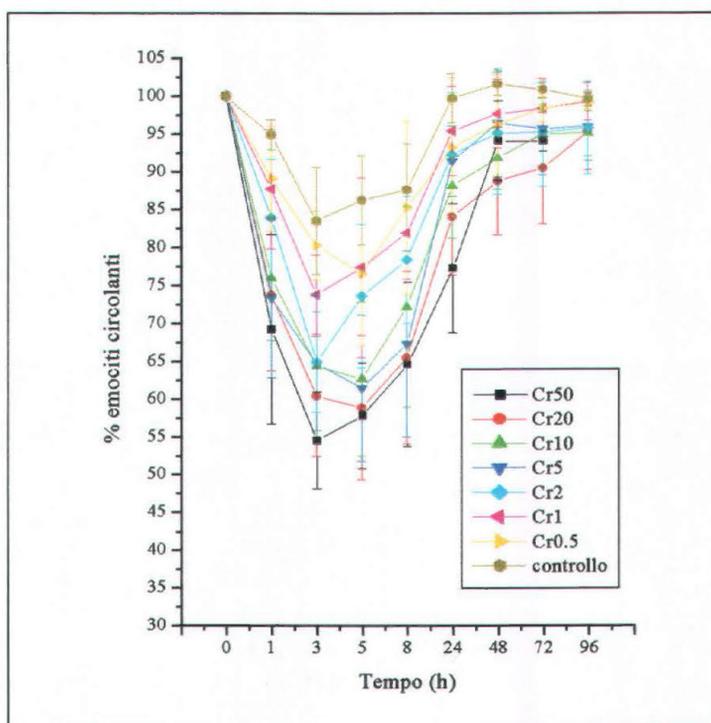


Figura 6. Variazione percentuale del numero di emociti rispetto al valore iniziale in *P. elegans* esposto a Cr o negli animali del gruppo di controllo non esposti ad alcun contaminante. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=6).

l'esposizione, di circa il 20 %. Alle concentrazioni superiori la percentuale minima di emociti, ottenuta sempre tra 3 e 5 h dopo l'esposizione, si pone in un range che varia tra il  $54.52 \pm 6.42$  e il  $64.90 \pm 6.66$  % in maniera dipendente dalla concentrazione; il picco massimo di decremento infatti si è verificato negli animali esposti alla concentrazione più elevata di  $50 \text{ mg L}^{-1}$  che risulta letale per tutti gli animali testati nell'arco delle 72 h. A tutte le rimanenti concentrazioni dopo 24 h (Fig. 6) si assiste ad un recupero del numero di emociti circolanti ma il numero di emociti nell'emolinfa a 96 h si mantiene comunque lievemente al di sotto del valore iniziale (circa 6% in meno).

### 3.1.1.5 - Effetti dell'esposizione al rame

L'esposizione di *P. elegans* a concentrazioni crescenti da  $0.1$  a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  di  $\text{Cu}^{++}$  induce una progressiva e significativa ( $P < 0.05$ ) riduzione del THC entro 5 h dall'esposizione (Fig. 7).

La concentrazione più elevata  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  causa la perdita maggiore di emociti circolanti con un minimo di cellule nell'emolinfa di  $54.93 \pm 6.59$  % a 5 h significativamente diverso ( $P = 0.001$ ) dal valore del controllo alla medesima ora dove il numero di cellule presenti è  $86.24 \pm 5.87$  %, a questa concentrazione però nessun animale sopravvive oltre le 72 h. Gli animali esposti a  $10$  e  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  di rame mostrano un decremento massimo del THC di circa il 40% tra 3 e 5 h dopo l'esposizione; dalle successive 8 h il numero di emociti risale, ma risulta significativamente più basso ( $P < 0.05$ ) rispetto al tempo zero per tutta la durata dell'esperimento con un decremento che a 96 h si pone intorno al 8%.

Alle rimanenti concentrazioni (Fig. 7) il decremento degli emociti nell'emolinfa avviene in maniera proporzionale alla concentrazione e varia tra 25-40% ( $P < 0.05$  vs. controllo) in genere tra 3 e 5 h; nelle successive 24 h si assiste al graduale recupero del numero di emociti circolanti e a 96 h non si rilevano variazioni significative sia in rapporto ai rispettivi valori iniziali ( $P > 0.05$ ) sia verso il gruppo di controllo ( $P > 0.05$ ).

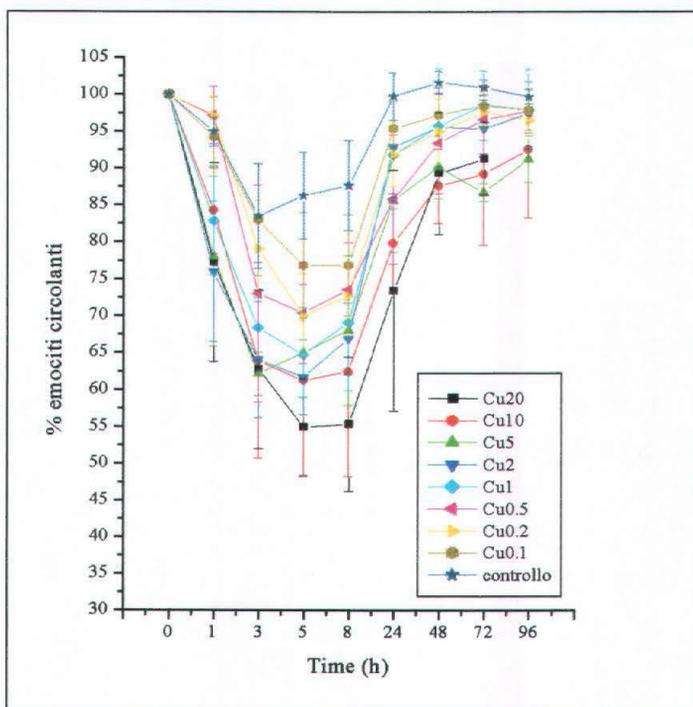


Figura 7. Variazione percentuale del numero di emociti rispetto al valore iniziale in *P. elegans* esposto a Cu o negli animali del gruppo di controllo non esposti ad alcun contaminante. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=6).

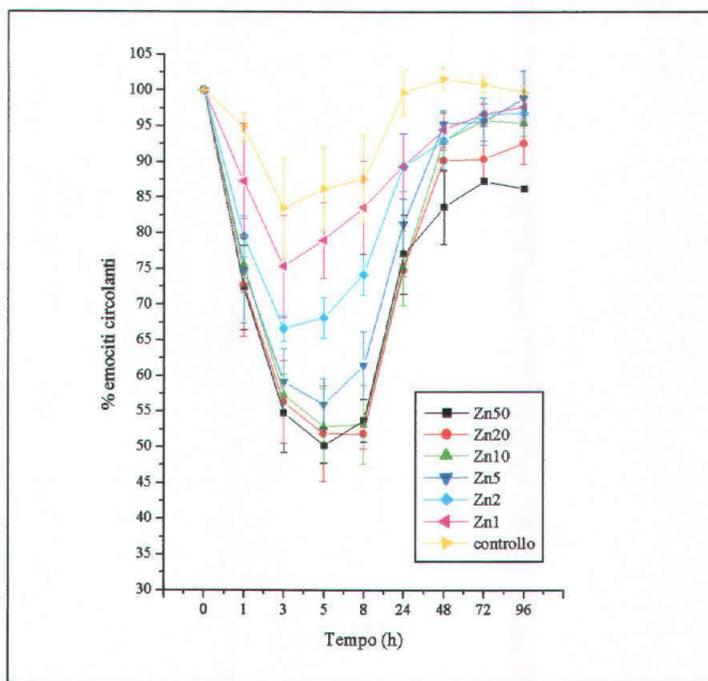


Figura 8. Variazione percentuale del numero di emociti rispetto al valore iniziale in *P. elegans* esposto a Zn o negli animali del gruppo di controllo non esposti ad alcun contaminante. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=6).

### 3.1.1.6 - Effetti dell'esposizione allo zinco

La figura 8 mostra il THC per animali esposti a concentrazioni crescenti di  $Zn^{++}$  da 1 a 50  $mg L^{-1}$ . Gli animali esposti alle concentrazioni comprese tra 5 e 50  $mg L^{-1}$  il numero di emociti circolanti si riduce in maniera significativa ( $P < 0.05$ ) rispetto al controllo, con un THC minimo che varia tra  $50.22 \pm 2.43 \%$  e  $55.98 \pm 3.60 \%$  a 5 h. Entro le 96 h si assiste ad un recupero del numero di cellule circolanti anche se alle tre concentrazioni più elevate esso rimane significativamente al di sotto del valore iniziale ( $P < 0.05$ ) di circa un 10% (Fig. 8).

Alla concentrazione di 2  $mg L^{-1}$  si rileva, negli animali esposti, un andamento analogo del THC con un decremento massimo che in questo caso è risultato del 35% a 3 h significativamente diverso ( $P < 0.05$ ) dal gruppo di controllo dove il calo alla medesima ora è di circa il 16%. Non si sono rilevate variazioni significative del numero di emociti nell'emolinfa ( $P > 0.05$  vs. controllo) in nessuna fase dell'esperimento per gli animali esposti alla concentrazione più bassa di  $Zn^{++}$  testata (1  $mg L^{-1}$ ).

### **3.1.2 - Emocitopenia indotta da metalli pesanti**

Il livello minimo medio di emociti circolanti raggiunto in *P. elegans* dopo essere stato esposto ai diversi metalli pesanti, indipendentemente dalla concentrazione e dal tempo è stato comparato con i valori degli animali del gruppo di controllo non esposto ad alcun contaminante.

Dall'analisi dei dati il metallo più efficace nel determinare la riduzione del numero di cellule nell'emolinfa è risultato essere il  $Pb^{++}$  infatti la percentuale di emociti che restano in circolo nell'emolinfa è del  $52.55 \pm 13.48 \%$  ( $n=36$ ;  $P < 0.05$  rispetto al controllo). In successione lo zinco risulta essere il metallo più efficace nell'indurre riduzione di cellule infatti si rileva un livello di emociti che rimangono in circolo pari al  $57.93 \pm 10.27 \%$  ( $n=36$ ;  $P < 0.05$ ).

Per gli altri metalli, la percentuale di cellule circolanti nell'emolinfa dopo l'esposizione è di  $61.09 \pm 12.37$  % (n=42) per il  $\text{Hg}^{++}$ ;  $63.31 \pm 10.30$  % (n=42) per il  $\text{Cr}^{6+}$ ;  $63.59 \pm 9.83$  % (n=48) per il  $\text{Cu}^{++}$  e  $65.30 \pm 8.87$  % (n=42) per il  $\text{Cd}^{++}$ .

Nel gruppo di controllo il numero di emociti subisce una lieve diminuzione e il numero minimo di cellule circolanti che si rileva è  $83.50 \pm 5.91$  %. Il decremento percentuale in cellule circolanti indotto da ogni singolo metallo è significativamente diverso dal controllo ( $P < 0.05$ ).

### **3.1.3 - Numero minimo di emociti compatibile con la sopravvivenza**

Il livello minimo di emociti raggiunto negli animali morti durante la fase sperimentale e nei sopravvissuti sono stati analizzati sia in maniera cumulativa, cioè indipendentemente dal tipo di metallo testato, dalla dose o dal tempo, sia rispetto ad ogni singolo metallo.

In questo modo la media del numero minimo di THC raggiunta negli animali sopravvissuti (soglia di sopravvivenza) e il THC al di sotto del quale gli animali non sono in grado di sopravvivere (soglia di mortalità) sono state stabilite sia raggruppando assieme tutti i dati (Fig. 9) che analizzando ogni singolo metallo (Fig. 10).

Considerando i dati tutti assieme la soglia di mortalità per *P. elegans* risulta  $56.65 \pm 8.81$  % (n=95) del numero iniziale di emociti circolanti, mentre la soglia di sopravvivenza è  $63.69 \pm 12.40$  % (n=151); confrontando i due dati risulta che la media di THC per la soglia di mortalità è significativamente più bassa che quella per la soglia di sopravvivenza ( $P < 0.05$ ). Il grafico in figura 9 mostra la distribuzione in classi percentuali di emociti circolanti del numero minimo rilevato sia per gli animali sopravvissuti che per i morti.

La figura 10 mostra le due diverse soglie considerate per ogni singolo metallo; dall'analisi dei dati risulta che *P. elegans* trattati con  $\text{Pb}^{++}$  e  $\text{Zn}^{++}$  sopravvivono con un numero minore di emociti circolanti mentre gli animali esposti agli altri metalli non sopravvivono nonostante mantengano un più elevato numero di cellule circolanti.

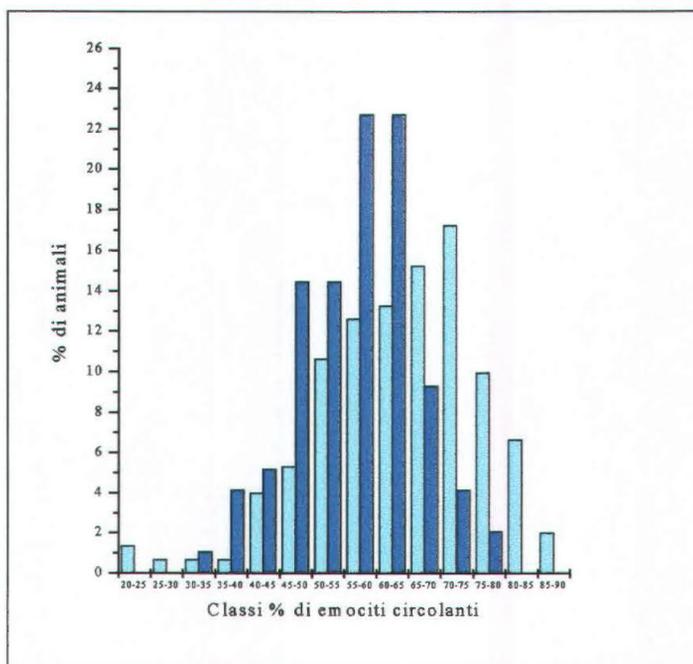


Figura 9. Classi percentuali di THC calcolate rispetto al valore iniziale (100%) di ogni singolo animale dopo esposizione ai metalli. In blu THC all'ultimo prelievo prima della morte (n=95). In azzurro percentuale minima di emociti osservata negli animali sopravvissuti (n=151)

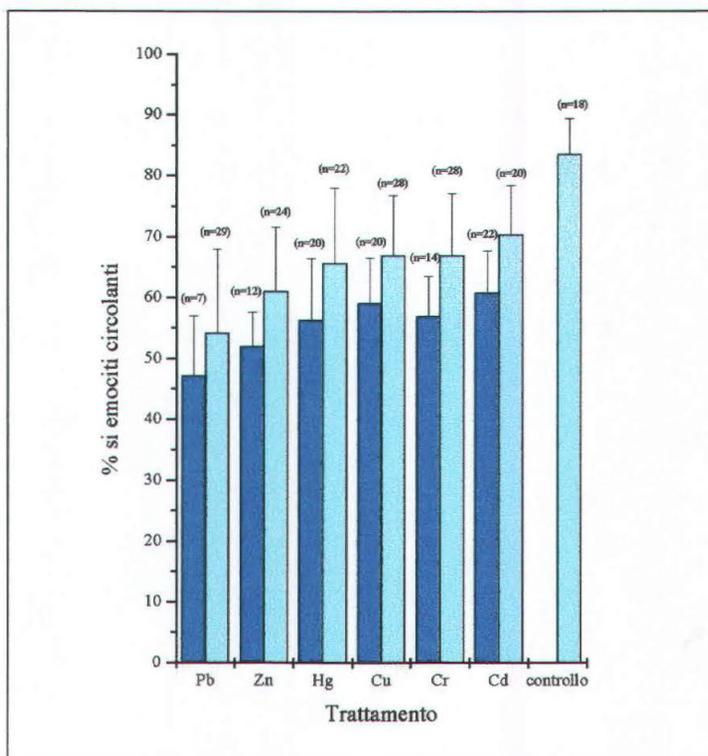


Figura 10. % di THC calcolata rispetto al valore iniziale di ogni animale per ogni metallo testato. In blu THC all'ultimo prelievo prima della morte. In azzurro minimo THC negli animali sopravvissuti

I risultati ottenuti dimostrano che in *Palaemon elegans* il numero di emociti circolanti è significativamente ridotto dall'esposizione sul breve periodo ai metalli pesanti. Nel presente lavoro, il numero medio di emociti in *P. elegans* esposti a diversi tipi e concentrazioni di metalli pesanti è stato comparato con il numero di cellule dell'emolinfa negli animali del gruppo di controllo (cioè animali mantenuti in condizioni ottimali e non sottoposti ad alcuno stress) che è stato usato come livello base. Tutti i metalli testati, anche se con una efficacia diversa, inducono una riduzione significativa nella conta emocitaria e il piombo è risultato essere il metallo più efficace seguito nell'ordine da Zn, Hg, Cr, Cu e Cd.

In aggiunta nella presente ricerca, è stato possibile valutare sia il livello minimo di emociti circolanti tollerato da *P. elegans* e compatibile con la sopravvivenza che la soglia oltre la quale l'organismo non è in grado di sopravvivere, calcolando la percentuale di riduzione del numero di emociti circolanti in relazione all'esposizione ai metalli. Il decremento massimo tollerato e compatibile con la sopravvivenza è risultato di circa il 36 % delle cellule inizialmente circolanti (cioè prima dell'esposizione) mentre la soglia di mortalità risulta dalla perdita di circa il 43% degli emociti iniziali.

La perdita di emociti determina negli animali un deficit dal punto di vista immunologico e risultano quindi più esposti a contaminazioni di tipo microbico. Quindi anche se il recupero del THC nel lungo periodo indica che una esposizione cronica ai metalli non rende gli animali direttamente più sensibili alle malattie, il calo di emociti indotto dall'esposizione a improvvise contaminazioni da metalli tossici (come ad esempio nel caso di versamenti accidentali) può produrre una finestra critica dal punto di vista immunologico rendendo gli animali suscettibili all'invasione di microrganismi e parassiti opportunisti o patogeni.

Infine risulta molto importante rilevare che in *P. elegans*, per quanto riguarda il calo di emociti, il NOEL (No Observed Effect Level cioè la concentrazione di una sostanza che non induce alcun effetto osservabile sul parametro oggetto di studio) si pone tra 1 (Hg, Cr, Zn) e 2 (Cd, Cu, Pb) unità  $\log_{10}$  al di sotto del valore di  $LC_{50}$ . Quindi la misura del calo di emociti nella valutazione di tossicità dei metalli in *P. elegans* risulta da 10 a 100 volte più sensibile che il test standard di tossicità  $LC_{50}$  a 96 h (Lorenzon *et al.*, 2000) e questo fa sì che si possa candidare la conta degli emociti ad utile indicatore dello stato di salute.

### 3.2 - Cross-reattività dell'anticorpo anti-*Nenc*HH su sezioni di tessuto

Per validare la cross-reattività dell'anticorpo purificato anti-*Nenc*HH prodotto contro il cHH ricombinante di *Nephrops norvegicus* è stato eseguito uno studio di tipo istochimico su sezioni di tessuto di peduncolo delle tre diverse specie in seguito utilizzate in altri esperimenti: *Astacus leptodactylus*, *Squilla mantis* e *Palaemon elegans* (Giulianini *et al.*, 2002).

In *A. leptodactylus* (Fig. 11 a) la ghiandola del seno (SG) presenta, in sezioni longitudinali del peduncolo (in paraffina) una forma triangolare lunga circa 620  $\mu\text{m}$  di lunghezza e 314  $\mu\text{m}$  di larghezza con un'area di circa 58230  $\mu\text{m}^2$ ; l'analisi immunologica con l'anticorpo anti-*Nenc*HH (1:20000) mostra un'estesa zona immunopositiva di circa 33720  $\mu\text{m}^2$  che corrisponde a circa il 58% dell'area totale (Fig.11 b).

Nello stomatopode *S. mantis* in sezioni longitudinali del peduncolo (in paraffina) la SG presenta una forma a coppa con al centro un seno emolinfatico (Fig. 11 c) con un area totale pari a 125.760  $\mu\text{m}^2$ ; la reazione immunoistochimica con l'anticorpo anti-*Nenc*HH (1:20000) rivela terminali assonici dispersi e intensamente marcati e terminazioni meno intensamente colorate. L'area immunopositiva è di circa 35690  $\mu\text{m}^2$  pari a circa il 28% della SG (Fig. 11 d).

Infine per *P. elegans* è stata utilizzata l'inclusione in resina a causa dell'estrema delicatezza del tessuto della ghiandola del seno. In sezioni longitudinali del peduncolo oculare, colorate con blu di toluidina (Fig. 11 e) si può osservare una SG di forma triangolare di circa 200  $\mu\text{m}$  di lunghezza e 90  $\mu\text{m}$  di larghezza con un area pari a 7120  $\mu\text{m}^2$  con terminali assonici intensamente eosinofili. L'analisi immunologica con l'anticorpo anti-*Nenc*HH (1:400) mostra i terminali assonici immunopositivi in cluster situati principalmente nella parte mediale della SG di fronte alla medulla interna. Essi determinano un'area immunopositiva pari a 1.970  $\mu\text{m}^2$  che corrisponde ad una porzione del 28% della superficie totale della ghiandola (Fig. 11 f).

Questi risultati, insieme a quelli esposti in Giulianini *et al.* (2002), dimostrano che l' anticorpo anti-*Nenc*HH localizza in maniera specifica l'ormone cHH anche nel

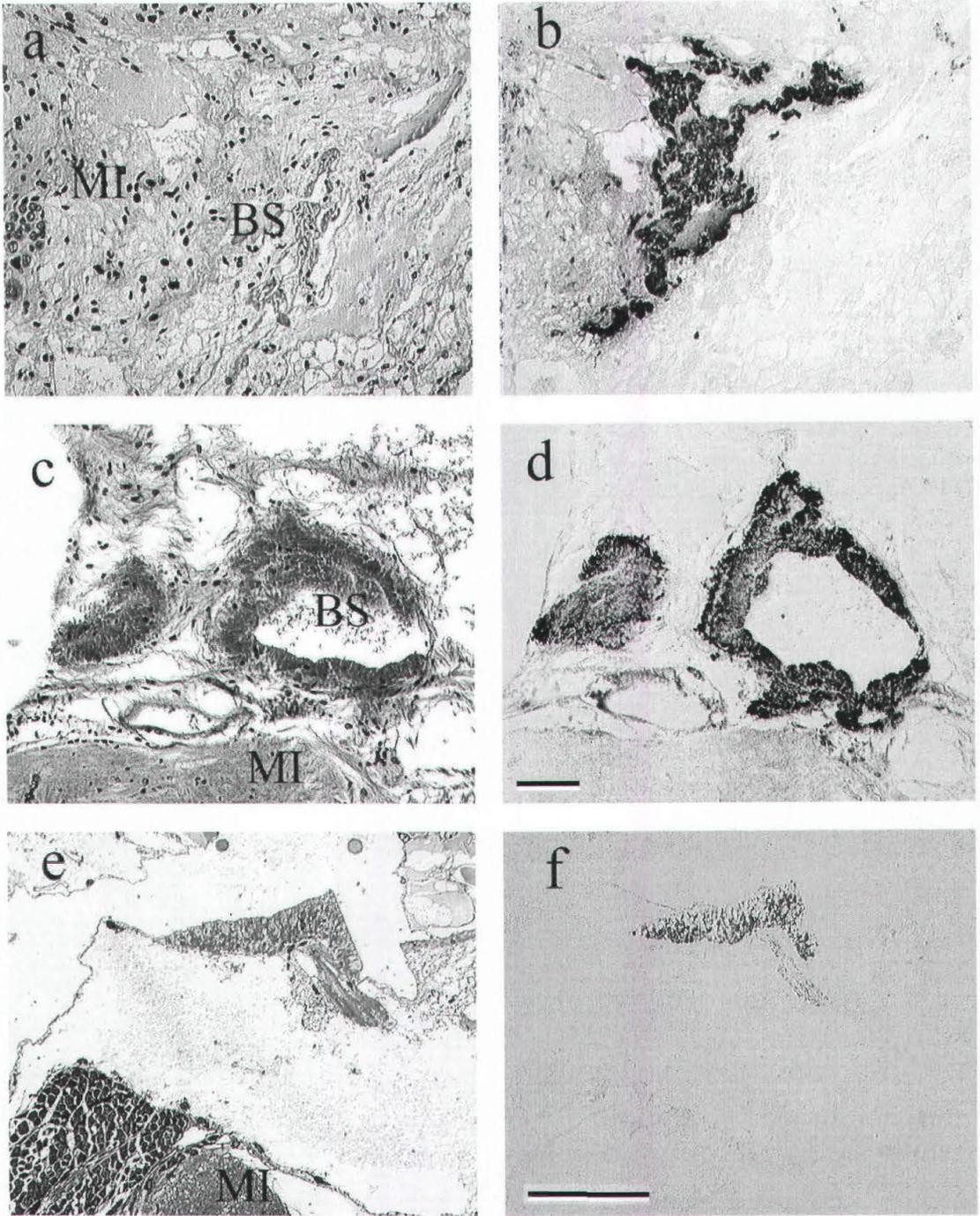


Figura 11. Sezioni longitudinali in paraffina della ghiandola del seno di (a) *A. leptodactylus*, (c) *S. mantis* (BS seni venosi; MI medulla interna). b, d, f terminali assonici della SG immunoreattivi all'anticorpo anti-NencHH. e-f Sezioni trasversali semifini in resina della ghiandola del seno di *P. elegans*. Barre 100  $\mu$ m

caso di specie che appartengono a gruppi sistematici molto diversi dal punto di vista filogenetico. L'anticorpo può quindi essere utilizzato come valida immunosonda per saggi immunochimici.

### **3.3 - Attività biologica della proteina ricombinante**

#### **3.3.1 - Saggio biologico in *P. elegans***

Il saggio biologico è stato eseguito per verificare l'efficacia nell'indurre attività iperglicemica del peptide ricombinante GST-*Nenc*HH (prodotto da *N. norvegicus*) in *P. elegans* in particolare si sono utilizzati animali epeduncolati cioè privati chirurgicamente del peduncolo oculare al fine di escludere fonti endogene di cHH.

Il grafico in figura 12 mostra l'andamento glicemico a tempi successivi nei diversi gruppi sperimentali a cui sono state iniettate tre diverse concentrazioni  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$  M di GST-*Nenc*HH. Il peptide induce un significativo incremento di glicemia ( $P < 0.05$  rispetto alla salina di controllo) a tutte le tre concentrazioni testate, ma non si verifica una relazione dose dipendente in quanto gli effetti iperglicemici indotti, non sono significativamente diversi tra di loro ( $P > 0.05$  per tutta la durata dell'esperimento). Alla concentrazione maggiore dai primi 30 minuti e fino a 4 h si verifica un incremento significativo ( $P = 0.001$  vs. salina) con un aumento che varia tra  $0.23 \pm 0.23$  ( $11.00 \pm 1.94$  mg dL<sup>-1</sup>) e  $0.90 \pm 0.40$  sd ( $16.90 \pm 2.69$  mg dL<sup>-1</sup>).

Negli animali del gruppo di controllo a cui è stata iniettata soluzione salina fisiologica si rileva una lieve ipoglicemia con un calo massimo del glucosio emolinfatico a 2 h pari a  $-0.17 \pm 0.17$  ( $6.50 \pm 1.35$  mg dL<sup>-1</sup>) non significativo ( $P = 0.07$ ) rispetto al valore iniziale ( $8.10 \pm 0.18$  mg dL<sup>-1</sup>). Come controllo positivo è stato iniettato l'equivalente di un decimo del contenuto del peduncolo di *N. norvegicus* (0.1 PE) e di un intero peduncolo di *P. elegans* (Fig. 13).

L'iniezione di 0.1 PE di *N. norvegicus* determina un picco massimo di glicemia dopo 1 h dall'iniezione con un significativo incremento ( $P = 0.001$  rispetto allo stesso tempo del gruppo iniettato con salina) pari a  $0.79 \pm 0.24$  ( $14.14 \pm 4.14$  mg dL<sup>-1</sup>) rispetto al tempo zero ( $8.29 \pm 3.73$  mg dL<sup>-1</sup>), dopo 4 h il glucosio emolinfatico

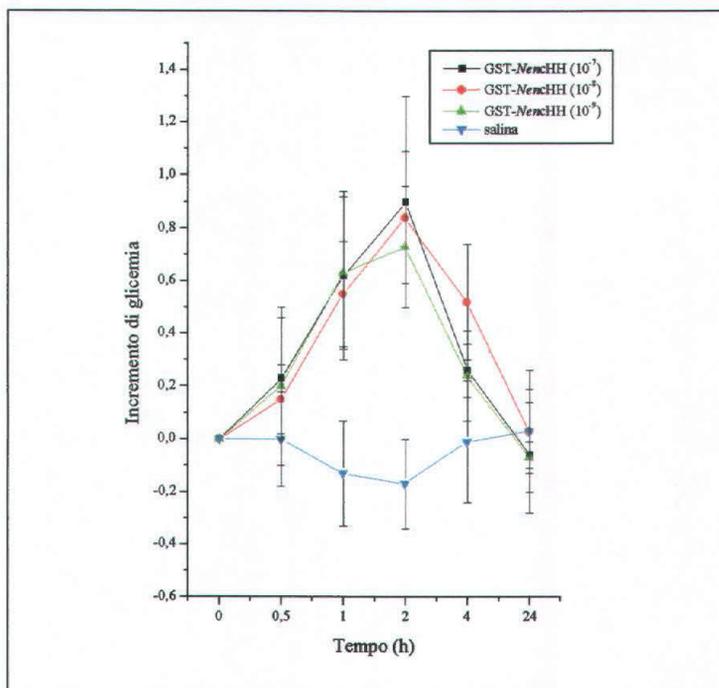


Figura 12. Andamenti glicemici temporali in *P. elegans* iniettato con concentrazioni diverse del peptide GST-NenCHH e nel gruppo di controllo iniettato con soluzione salina. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=10).

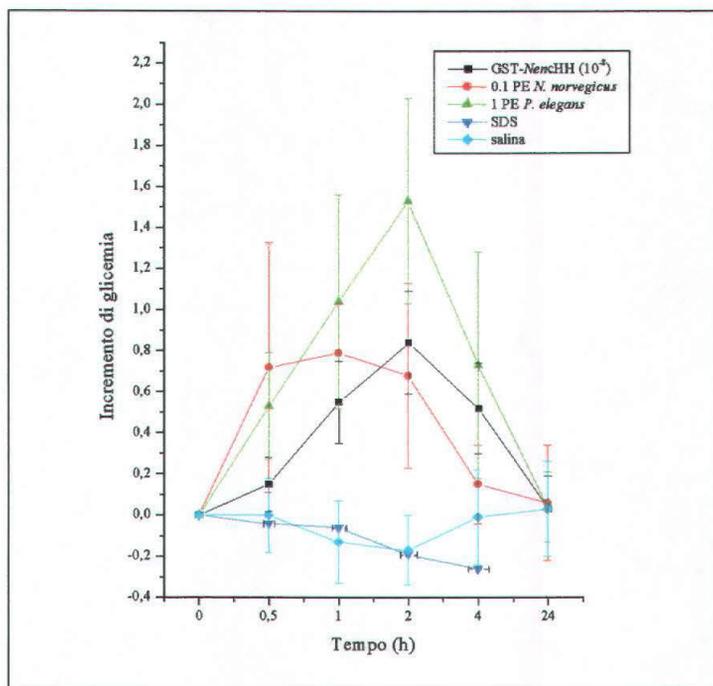


Figura 13. Andamenti glicemici temporali in *P. elegans* iniettato con GST-NenCHH, estratto di peduncolo di *N. norvegicus* (0.1 PE), estratto di peduncolo di *P. elegans* (1 PE), e nei gruppi di controllo iniettati con SDS e con soluzione salina. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=10).

ritorna sui valori iniziali. Nel caso invece dell'iniezione di 1 PE di *P. elegans* (Fig. 13) l'incremento di glicemia risulta più marcato con un picco massimo di  $1.53 \pm 0.50$  sd ( $22.00 \pm 3.40$  mg dL<sup>-1</sup>) a 2 h dopo l'iniezione, valore che risulta significativamente diverso ( $P=0.001$ ) da quello del gruppo iniettato con salina ma anche rispetto all'incremento di glicemia ottenuto con l'iniezione del peptide ricombinate ( $P=0.005$  allo stesso tempo). L'iniezione di PBS + 0,1% SDS non ha prodotto un aumento significativo ( $P>0.05$  vs. soluzione salina) della glicemia per tutta la durata dell'esperimento (Fig. 13).

### 3.3.2 - Saggio biologico in *A. leptodactylus*

Il secondo gruppo di saggi biologici è stato eseguito per verificare l'attività iperglicemica in *A. leptodactylus* epeduncolati del peptide ricombinante 6xHis-NencHH sempre prodotto da *N. norvegicus*.

Il grafico in figura 14 mostra l'andamento glicemico a tempi successivi nei diversi gruppi sperimentali di *A. leptodactylus* epeduncolati a cui è stato iniettato 6xHis-NencHH alle due diverse concentrazioni finali di:  $10^{-10}$  M (corrispondente all'iniezione di 0.01 µg di peptide in ogni animale) e  $10^{-8}$  M (1 µg di peptide). La concentrazione  $10^{-10}$  M ha determinato un incremento di glicemia massimo pari a  $0.30 \pm 0.23$  sd ( $8.60 \pm 2.61$  mg dL<sup>-1</sup>), dopo 30 minuti dall'iniezione del peptide, significativamente diverso ( $P=0.007$ ) rispetto al controllo iniettato con PBS al medesimo tempo. Dopo 1 h il livello di glucosio emolinfatico tende, ai prelievi successivi, a tornare sui valori iniziali ( $6.80 \pm 2.39$  mg dL<sup>-1</sup>) e non risulta significativamente diverso ( $P>0.05$ ) dal gruppo di controllo iniettato con PBS. Alla concentrazione più elevata ( $10^{-8}$  M) un significativo ( $P<0.05$  vs. controllo) incremento di glucosio si sviluppa da 30 minuti fino a 4 h dopo l'iniezione e varia tra  $0.51 \pm 0.51$  e  $1.13 \pm 0.72$  sd. Un aumento della glicemia analogo è stato ottenuto con l'iniezione del peptide GST-NencHH ad una concentrazione pari a  $10^{-8}$  M (Fig. 14) che mostra un incremento massimo di  $0.95 \pm 0.6$  sd significativamente diverso ( $P<0.05$ ) dal controllo ma non ( $P=0.684$ ) dal gruppo trattato con 6xHis-NencHH. Negli animali del gruppo di controllo iniettati con solo PBS si assiste ad un lieve

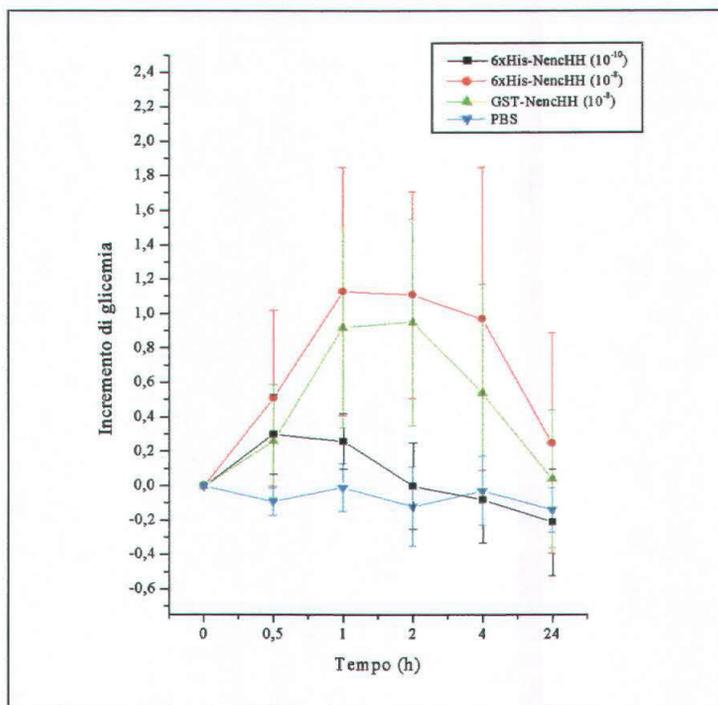


Figura 14. Andamento temporale della glicemia in *A leptodactylus* iniettato con il peptide 6xHis-NencHH, GST-NencHH e con PBS nel gruppo di controllo. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 5).

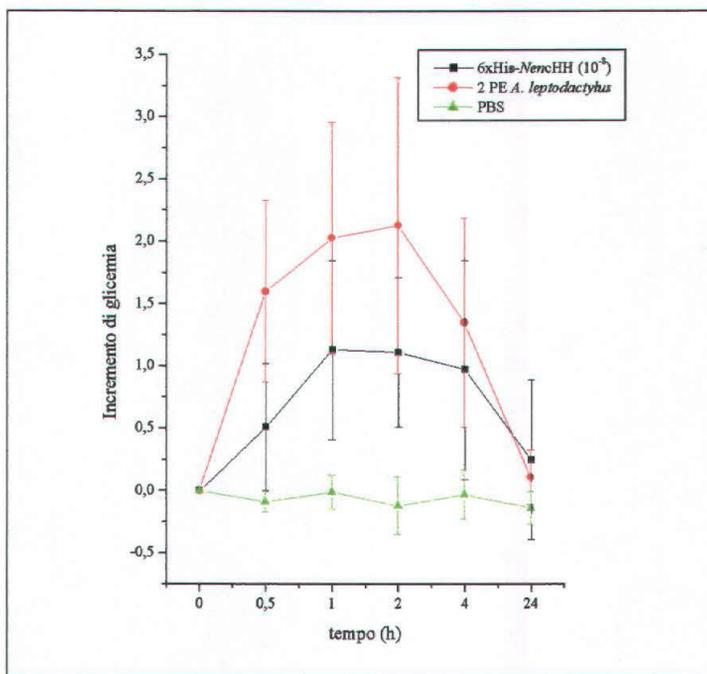


Figura 15. Andamento temporale della glicemia in *A leptodactylus* iniettato con 6xHis-NencHH, estratto di peduncolo (2 PE) e con PBS nel gruppo di controllo. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 5).

decremento del glucosio emolinfatico che non risulta comunque significativamente diverso ( $P > 0.05$ ) rispetto al valore glicemico iniziale di  $6.60 \pm 1.14 \text{ mg dL}^{-1}$  per tutta la durata dell'esperimento.

L'iniezione  $50 \mu\text{L}$  di estratto di peduncolo, pari a 2 PE di *A. leptodactylus* (Fig. 15), induce un incremento di glicemia da 30 minuti a 4 h dopo l'iniezione superiore rispetto ai peptidi sintetici, con valori che variano tra  $1.35 \pm 0.84$  e  $2.13 \pm 1.19$  sd. Questi valori risultano significativamente diversi ( $P < 0.05$ ) sia rispetto al gruppo di controllo iniettato con PBS che dal gruppo sperimentale iniettato con 6xHis-NencHH alla concentrazione più alta.

In *A. leptodactylus* è stato condotto un ulteriore esperimento per verificare se l'anticorpo anti-NencHH fosse in grado di inibire *in vivo* l'effetto iperglicemizzante indotto dal peptide sintetico.

A questo scopo  $50 \mu\text{L}$  di anti-NencHH ( $10^{-7}$  M) sono stati iniettati in ogni animale epeduncolato ( $n=5$ ) dopo il prelievo al tempo 0; dopo 30 minuti sono stati poi iniettati  $50 \mu\text{L}$  di soluzione  $10^{-8}$  M di 6xHis-NencHH e si è poi proceduto ai prelievi per la verifica della variazione glicemica. La figura 16 mostra l'andamento temporale della glicemia. Si nota come l'azione iperglicemica indotta dal solo peptide venga inibita dall'azione dell'anticorpo, infatti il picco massimo di glicemia pari a  $0.16 \pm 0.17$  sd, ottenuto negli animali iniettati sia con l'anticorpo che con il peptide, a 1 h non risulta significativamente diverso ( $P=0.123$ ) dal valore rilevato allo stesso tempo nel gruppo di controllo. I valori risultano invece significativamente diversi ( $P < 0.05$ ) da 1 h in poi rispetto a quelli ottenuti negli animali iniettati con il solo peptide.

I risultati derivati con questa serie di esperimenti hanno dimostrato la funzionalità dal punto di vista biologico dei due peptidi di sintesi GST-NencHH e 6xHis-NencHH nelle due specie oggetto di studio *P. elegans* e *A. leptodactylus*. Il GST-NencHH iniettato in *P. elegans* a diverse concentrazioni è in grado di indurre iperglicemia ma il suo effetto non è risultato dose relato in quanto gli effetti di aumento del glucosio emolinfatico indotti dalle tre concentrazioni scalari da noi testate non risultano significativamente diversi tra di loro. L'efficacia nell'indurre iperglicemia risulta comunque inferiore a quella determinata dall'iniezione

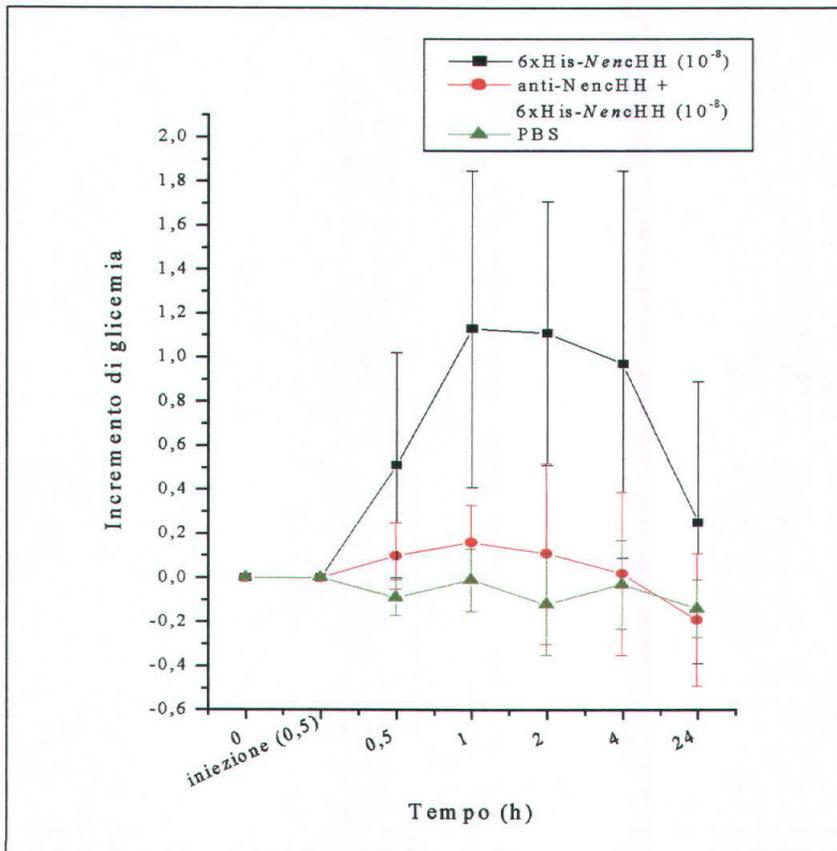


Figura 16. Andamenti glicemici temporali in *A. leptodactylus* iniettato con l'anticorpo anti-NencHH e successivamente con il peptide 6xHisNencHH, con il solo peptide e con PBS nel gruppo di controllo. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 5).

dell'estratto di peduncolo (1 PE) di *P. elegans* ciò potrebbe dipendere o da un diverso quantitativo iniettato o da una perdita di efficacia del peptide sintetico dovuta a una alterazione strutturale.

Il peptide 6xHis-NencHH iniettato in *A. leptodactylus* mostra invece una risposta dose relata nell'indurre iperglicemia; infatti le variazioni glicemiche indotte dai due dosaggi testati  $10^{-10}$  e  $10^{-8}$  M risultano significativamente diverse tra di loro ( $P < 0.05$ ) per tutto l'esperimento. L'iniezione del peptide GST-NencHH in concentrazione  $10^{-8}$  M induce un effetto comparabile a quello del medesimo dosaggio di 6xHis-NencHH in quanto l'incremento glicemico indotto non risulta significativamente diverso ( $P > 0.05$ ). Anche nel caso di 6xHis-NencHH la sua capacità di indurre aumento del glucosio emolinfatico risulta inferiore a quella che si verifica nel caso dell'iniezione dell'estratto di peduncolo di *A. leptodactylus*.

Infine i risultati ottenuti dimostrano l'efficacia *in vivo* dell'anticorpo anti-NencHH nell'inibire l'azione iperglicemica del peptide sintetico.

### 3.4 - Quantificazione mediante ELISA delle variazioni dei livelli di cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di *P. elegans* in seguito a stress e valutazione tramite saggio biologico della relazione con la risposta glicemica

Con questa serie di esperimenti si è voluto quantificare mediante ELISA il contenuto di cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di *P. elegans*, inizialmente in condizioni normali, fisiologiche, poi, in seguito a stress di diversa natura (metalli pesanti, LPS e iniezione di bioamine); si è voluto inoltre verificare la relazione tra modificazioni dei livelli di cHH con la variazione di glucosio emolinfatico.

La media del livello di glucosio presente nell'emolinfa di *P. elegans* non trattati è  $10.06 \pm 2.22$  sd mg dL<sup>-1</sup> (n=90) (Fig.17). Nel gruppo di controllo, a cui sono stati effettuati solo prelievi di emolinfa ai diversi tempi, non si verifica alcuna variazione significativa ( $P > 0.05$ ) rispetto al valore iniziale al tempo 0 ( $10.70 \pm 3.06$  mg dL<sup>-1</sup>). Gli animali iniettati con soluzione salina fisiologica mostrano invece un piccolo incremento del valore glicemico, a 2 h, di  $0.37 \pm 0.22$  ( $12.90 \pm 2.32$  mg dL<sup>-1</sup>) che risulta significativamente diverso ( $P = 0.014$ ) dal valore iniziale  $9.70 \pm 2.91$  mg dL<sup>-1</sup>. I due gruppi di controllo confrontati tra loro non risultano mai significativamente diversi ( $P < 0.05$  per tutta la durata degli esperimenti).

Il grafico in figura 18 mostra la retta di regressione media ottenuta dalle densità ottiche rilevate dalla lettura a 405 nm di quantità note di proteina ricombinante 6xHis-NenCHH. I valori di DO sperimentali in seguito ottenuti sono stati inseriti nella retta di regressione al fine di estrapolare le quantità assolute di cHH "nativo". I valori medi di cHH nel peduncolo oculare di *P. elegans* in condizioni fisiologiche, cioè di animali che non hanno subito alcun trattamento, sono pari a  $5.60 \pm 2.6$  pmol SG<sup>-1</sup> (ghiandola del seno, n=14 repliche ELISA) mentre nell'emolinfa sono pari  $1.13 \pm 0.28$  pmol mL<sup>-1</sup> (n=11 repliche ELISA).

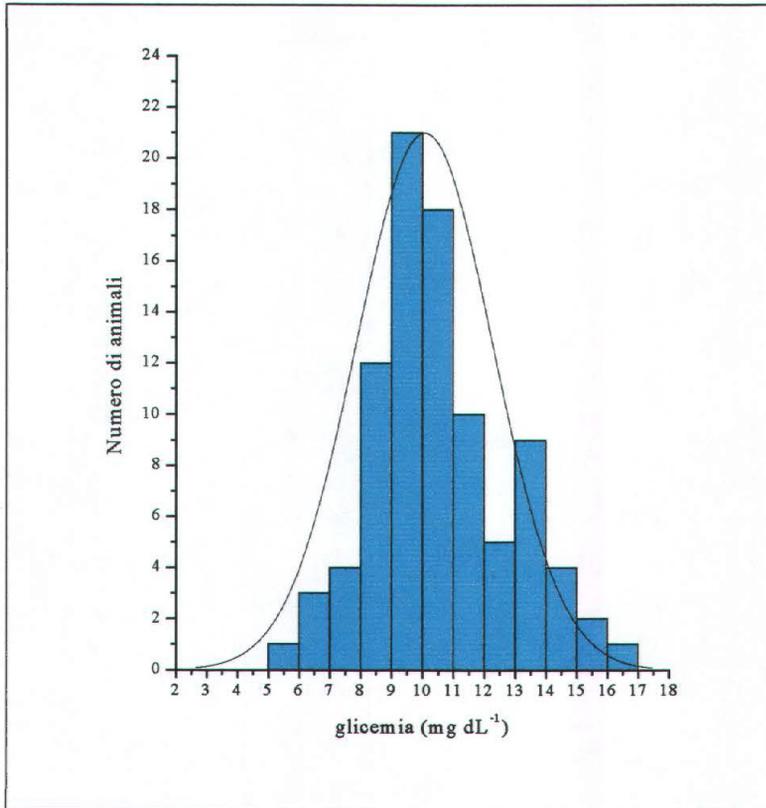


Figura 17. Distribuzione dei valori iniziali di glicemia in *P. elegans* (n = 90).

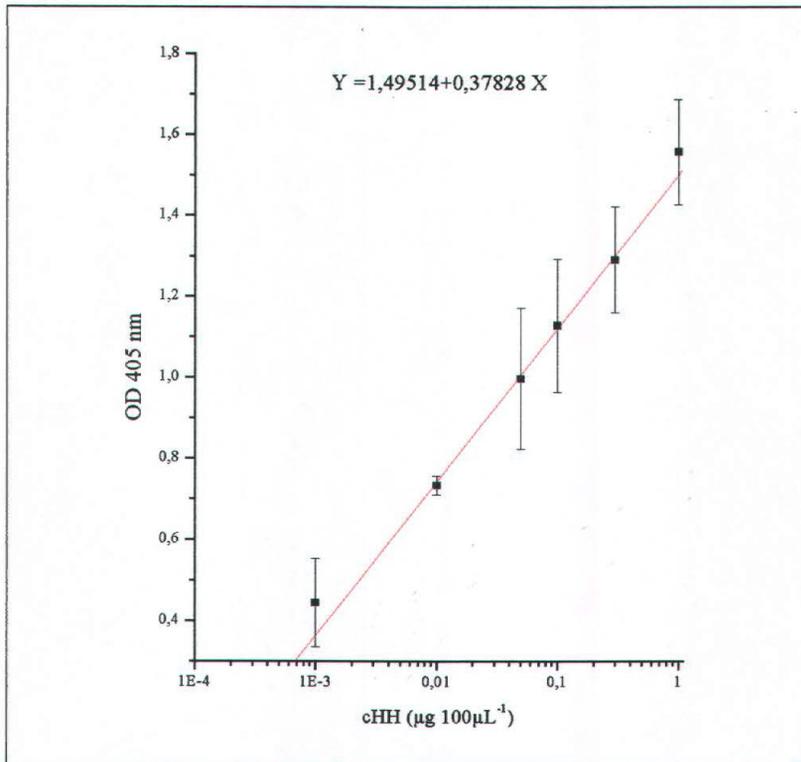


Figura 18. Retta di regressione standard ottenuta per il peptide 6xHis-NenCHH mediante ELISA. L'asse x rappresenta le quantità di peptide aggiunte per pozzetto (100µL). I dati di densità ottica sono medie  $\pm$  deviazione standard (n=6).

### 3.4.1 - Variazione del cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di *P.elegans* e andamento glicemico dopo esposizione a rame

Gli effetti dell'esposizione a concentrazioni diverse di rame: 5 mg L<sup>-1</sup> (concentrazione letale) e 0.1 mg L<sup>-1</sup> (concentrazione subletale) sul contenuto di cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di *P. elegans* sono stati valutati mediante ELISA (n =3 repliche ELISA). Il grafico in figura 19 mostra le variazioni di cHH nel peduncolo di animali esposti e nel gruppo di controllo dato da peduncoli di animali non trattati. Alla concentrazione di rame maggiore si verifica una rapida e significativa deplezione del contenuto di cHH, infatti dopo 30 minuti si passa dai valori ottenuti prima del trattamento (gruppo di controllo) di 5.60 ± 2.6 pmol SG<sup>-1</sup> a 0.71 ± 0.21 pmol SG<sup>-1</sup> (P=0.006) i valori scendono ulteriormente nelle successive 2 h con un valore minimo registrato pari a 0.45 ± 0.27 pmol SG<sup>-1</sup> (P=0.004 vs. controllo) alla terza ora dopo l'esposizione si assiste ad un recupero del contenuto di cHH che risale a 2.70 ± 3.94 pmol SG<sup>-1</sup> valore che non risulta significativamente diverso dal controllo non trattato (P=0.126).

La concentrazione 0.1 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 19) induce un rilascio del cHH dal peduncolo che avviene in maniera più graduale; i valori decrescono e dopo 1 h il contenuto di cHH è di 3.37 ± 2.99 pmol SG<sup>-1</sup> ma non risulta significativamente diverso dal controllo (P=0.207). A 2 h si rileva una ulteriore deplezione di cHH nel peduncolo con un minimo significativo pari a 2.29 ± 0.81 pmol SG<sup>-1</sup> (P=0.05), da 3 h si assiste poi ad un recupero del contenuto di cHH (5.04 ± 4.90 pmol SG<sup>-1</sup>) che ritorna sui valori precedenti al trattamento (P=0.774 vs. controllo non trattati).

L'esposizione a 5 mg L<sup>-1</sup> di rame si è dimostra un potente stimolatore del rilascio di cHH dal peduncolo all'emolinfa infatti negli animali trattati (Fig. 20) è stato riscontrato un aumento graduale del cHH che raggiunge il picco massimo di 8.67 ± 2.99 pmol mL<sup>-1</sup> a 2 h, valore significativamente diverso (P=0.001) da quello ottenuto negli animali non trattati pari a 1.13 ± 0.28 pmol mL<sup>-1</sup>. Il cHH circolante rimane su livelli significativamente (P<0.05) elevati per tutta la durata dell'esperimento. Alla concentrazione minore il valore del cHH nell'emolinfa rimane sui livelli del gruppo di controllo, solo a 2 h si verifica un aumento significativo (P=0.013) con un lieve picco di 1.68 ± 0.34 pmol mL<sup>-1</sup>. Quindi l'esposizione di *P.*

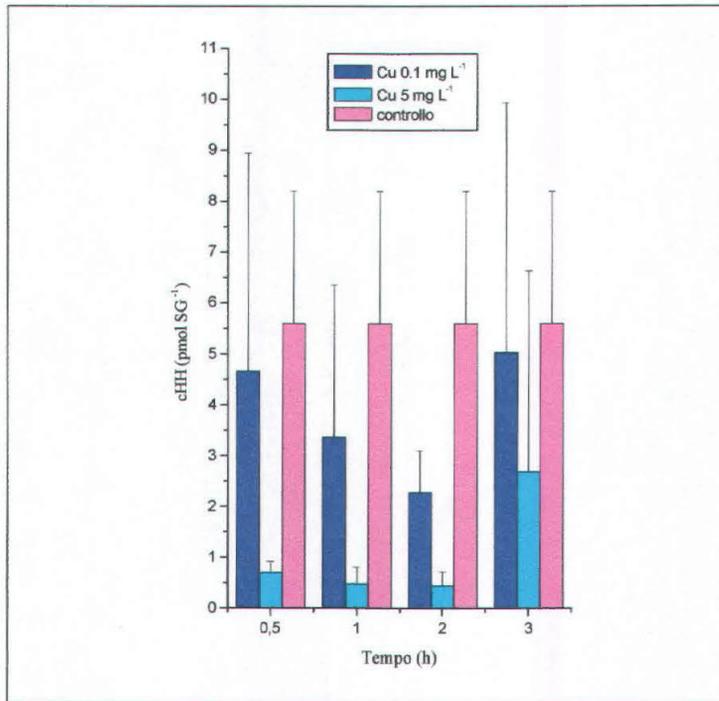


Figura 19. Andamento temporale del cHH nel peduncolo oculare di *P. elegans* trattato con due diverse concentrazioni di Cu e nel gruppo di controllo non trattato. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=3 repliche ELISA).

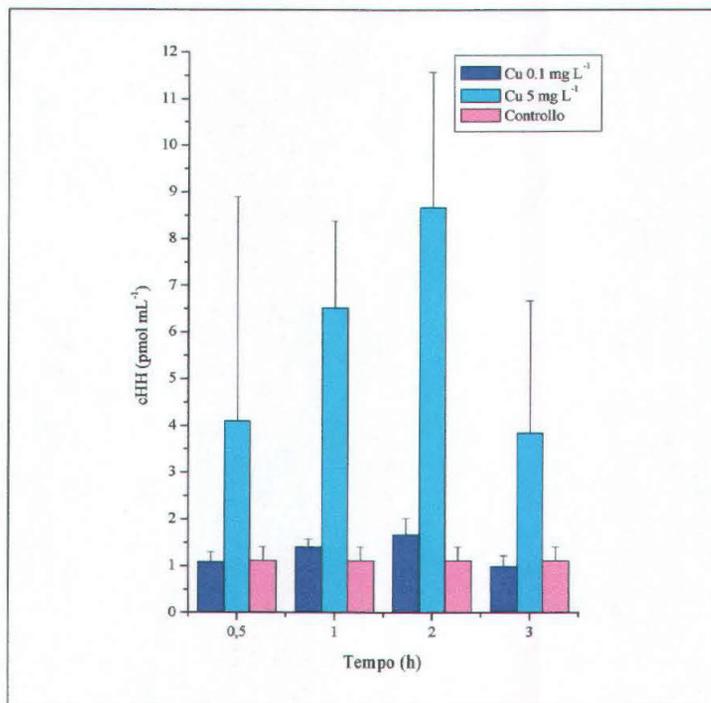


Figura 20. Andamento temporale del cHH nel emolinfa di *P. elegans* trattato con due diverse concentrazioni di Cu e nel gruppo di controllo non trattato. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=3 repliche ELISA).

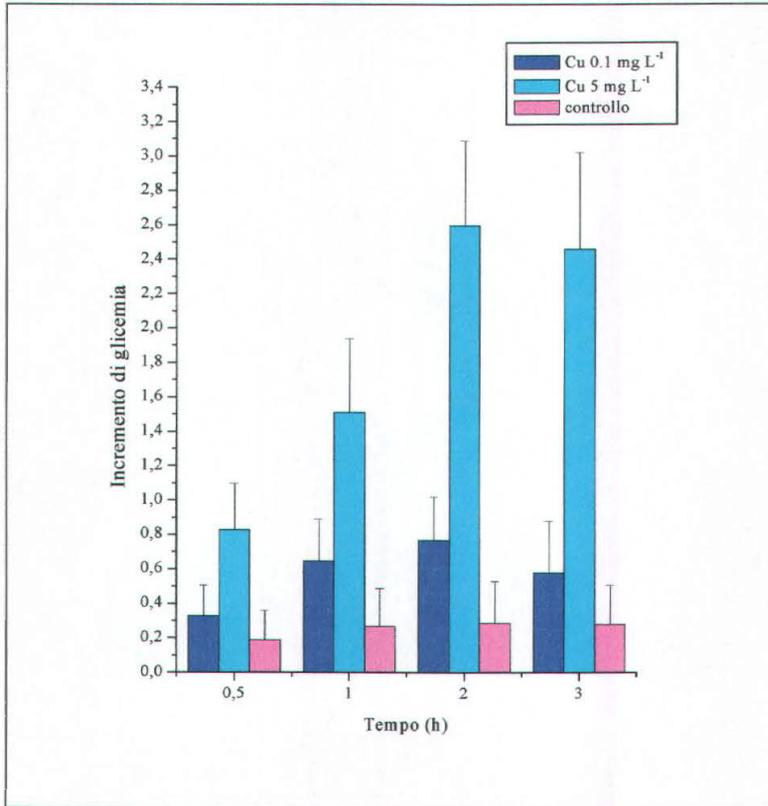


Figura 21. Andamento temporale della glicemia in *P. elegans* trattato con due diverse concentrazioni di Cu e nel gruppo di controllo non trattato. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 10).

*elegans* al rame induce in maniera dose-relata il rilascio del cHH dal peduncolo all'emolinfa. Il livello glicemico nel tempo degli animali esposti alle due concentrazioni di rame e nel gruppo di controllo sono rappresentati in figura 21.

Alla concentrazione più elevata si assiste nell'arco di 3 h dall'esposizione ad un incremento graduale del glucosio con un picco massimo di incremento di  $2.60 \pm 0.49$  sd ( $33.80 \pm 4.89$  mg dL<sup>-1</sup>) a 2 h, esso risulta significativamente diverso (P=0.001) sia dal valore iniziale ( $9.50 \pm 1.65$  mg dL<sup>-1</sup>) che da quello del gruppo di controllo ( $13.30 \pm 2.75$  mg dL<sup>-1</sup>, P=0.001) al medesimo tempo. Negli animali esposti a 0.1 mg L<sup>-1</sup> di rame (Fig. 21) l'andamento temporale dell'incremento di glicemia risulta analogo a quello della concentrazione superiore ma con aumenti molto più limitati con un picco massimo significativo di  $0.77 \pm 0.25$  ( $15.00 \pm 1.49$  mg dL<sup>-1</sup>) dopo 2 h dall'esposizione che risulta significativamente diverso sia dal valore del controllo al medesimo tempo ( $13.30 \pm 2.735$  mg dL<sup>-1</sup>; P=0.046) che da quello della concentrazione maggiore (P=0.001).

#### 3.4.2 - Variazione del cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di *P.elegans* e andamento glicemico dopo esposizione a mercurio

L'effetto del mercurio sul contenuto di cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di *P.elegans* esposti a tre concentrazioni del metallo: 5 mg L<sup>-1</sup> (concentrazione letale), 0.5 e 0.1 mg L<sup>-1</sup> (concentrazioni subletali) è stato quantificato mediante ELISA (n = 3 repliche ELISA). Il grafico in figura 22 mostra l'andamento temporale del cHH nel peduncolo alle diverse concentrazioni e nel gruppo di controllo non esposto a contaminanti. Alla concentrazione più elevata si verifica una rapida deplezione del contenuto di cHH già dopo 30 minuti, il suo valore passa da  $5.60 \pm 2.6$  pmol SG<sup>-1</sup> del gruppo non trattato a  $1.22 \pm 0.39$  pmol SG<sup>-1</sup> (P=0.012), i valori si mantengono significativamente (P<0.05) al di sotto del valore di controllo per tutta la durata dell'esperimento con un picco minimo di cHH di  $0.72 \pm 0.25$  pmol SG<sup>-1</sup> rilevato 2 h dopo l'esposizione. La concentrazione intermedia (Fig. 22) risulta essere ancora più efficace nell'indurre il rilascio del cHH dal peduncolo: dopo 30 minuti la quantità di ormone presente risulta molto bassa  $0.19 \pm 0.07$  pmol SG<sup>-1</sup> (P=0.003 vs. controllo) e

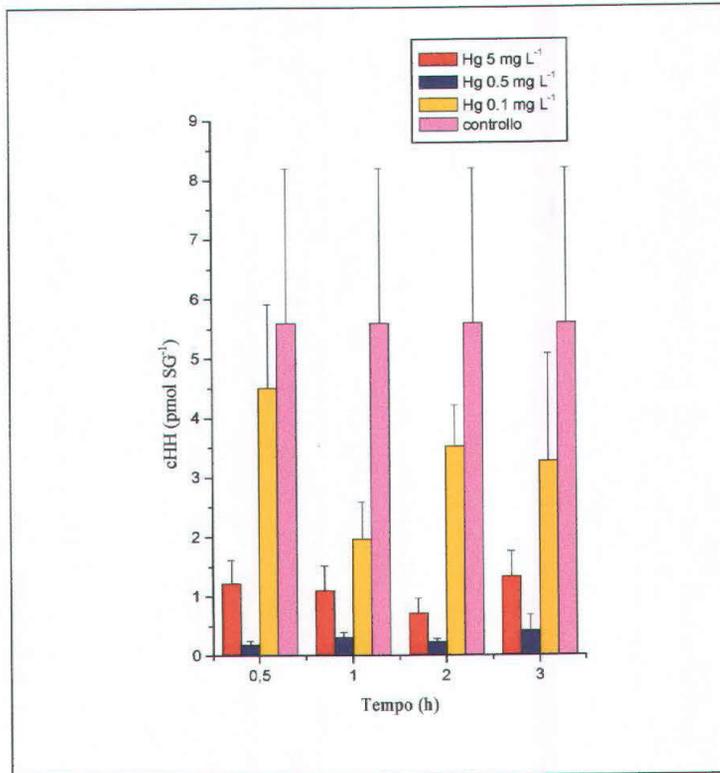


Figura 22. Andamento temporale del cHH nel peduncolo oculare di *P. elegans* trattato con tre diverse concentrazioni di Hg e nel gruppo di controllo non trattato. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=3 repliche ELISA).

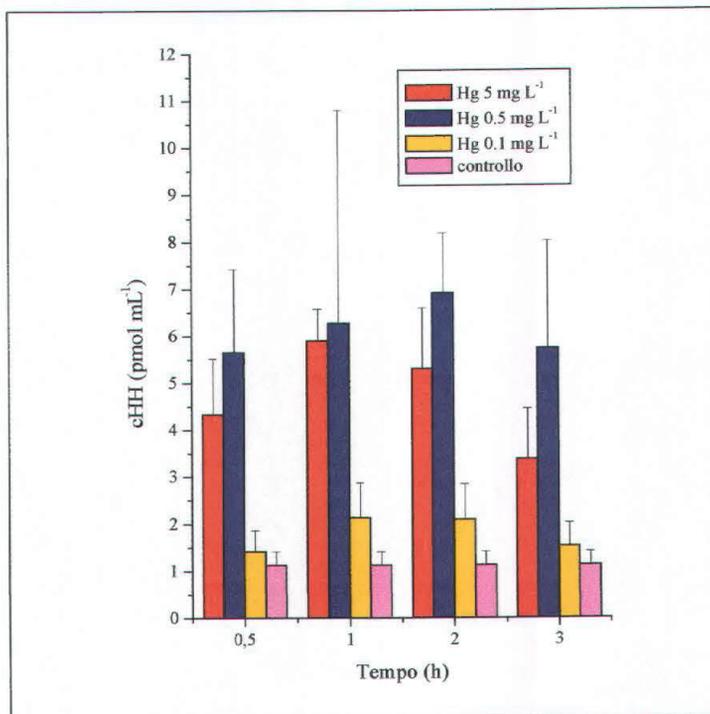


Figura 23. Andamento temporale del cHH nel emolinfa di *P. elegans* trattato con tre diverse concentrazioni di Hg e nel gruppo di controllo non trattato. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=3 repliche ELISA).

il peduncolo risulta massicciamente e significativamente depleto ( $P < 0.05$ ) del contenuto di cHH per tutta la durata dell'esperimento. Infine alla concentrazione minore di  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  si assiste ad un rilascio contenuto del cHH infatti il calo risulta significativamente diverso ( $P = 0.033$ ) dal controllo solo a 1 h dopo l'esposizione ed è pari a  $1.97 \pm 0.62 \text{ pmol SG}^{-1}$  poi i valori ottenuti dalla lettura ELISA, seppur minori, non risultano significativamente diversi ( $P > 0.05$ ) dal controllo non trattato.

A livello emolinfatico (Fig. 23) la concentrazione  $5 \text{ mg L}^{-1}$  induce un rapido aumento del cHH emolinfatico entro 1 h dall'esposizione con un picco di cHH circolante di  $5.90 \pm 0.68 \text{ pmol mL}^{-1}$  significativamente diverso ( $P = 0.001$ ) dal controllo non trattato ( $1.13 \pm 0.28 \text{ pmol mL}^{-1}$ ). Ai tempi successivi i valori tendono a ridursi ma rimangono significativamente diversi ( $P < 0.05$ ) dal controllo fino alla fine del tempo sperimentale. La concentrazione intermedia (Fig. 23) risulta la più efficace nell'indurre l'aumento dell'ormone nell'emolinfa, infatti il livello cresce rapidamente e rimane molto elevato fino a 3 h dopo l'esposizione ( $P < 0.05$  vs. controllo) con un massimo, raggiunto a 2 h, di  $6.92 \pm 1.27 \text{ pmol mL}^{-1}$ . Alla concentrazione più bassa ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) del livello di cHH si verifica solo a 1 h e 2 h dopo l'esposizione con un quantitativo massimo rilevato di ormone pari a  $2.14 \pm 0.74 \text{ pmol mL}^{-1}$ . Nel caso del mercurio quindi le variazioni del cHH sia a livello peduncolare che emolinfatico non risultano direttamente dose-relate in quanto la concentrazione intermedia risulta la più efficace nell'alterare la condizione fisiologica. Una condizione anomala che si verifica anche a livello del glucosio emolinfatico e il grafico in figura 24 mostra le variazioni nel tempo della glicemia in seguito ad esposizione di *P. elegans* alle diverse concentrazioni di mercurio.

Ancora una volta la concentrazione intermedia di  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  risulta la più efficace nell'indurre l'effetto testato, infatti l' iperglicemia si sviluppa da 1 h dopo l'esposizione con un l'incremento massimo di  $1.35 \pm 0.42 \text{ sd}$  ( $22.20 \pm 5.45 \text{ mg dL}^{-1}$ ) a 3 h, valore significativamente diverso sia dal valore iniziale  $9.40 \pm 1.35 \text{ mg dL}^{-1}$  ( $P = 0.001$ ) che dal gruppo di controllo al medesimo tempo dove l'incremento registrato è  $0.28 \pm 0.23$  ( $13.10 \pm 2.75 \text{ mg dL}^{-1}$ ,  $P = 0.001$ ). La concentrazione maggiore al contrario non induce alcuna variazione significativa del glucosio per tutta la durata dell'esperimento e il picco massimo di incremento  $0.28 \pm 0.22 \text{ sd}$  ( $13.88 \pm 2.23 \text{ mg dL}^{-1}$ ) che si sviluppa dopo 2 h non è significativamente diverso dal valore iniziale

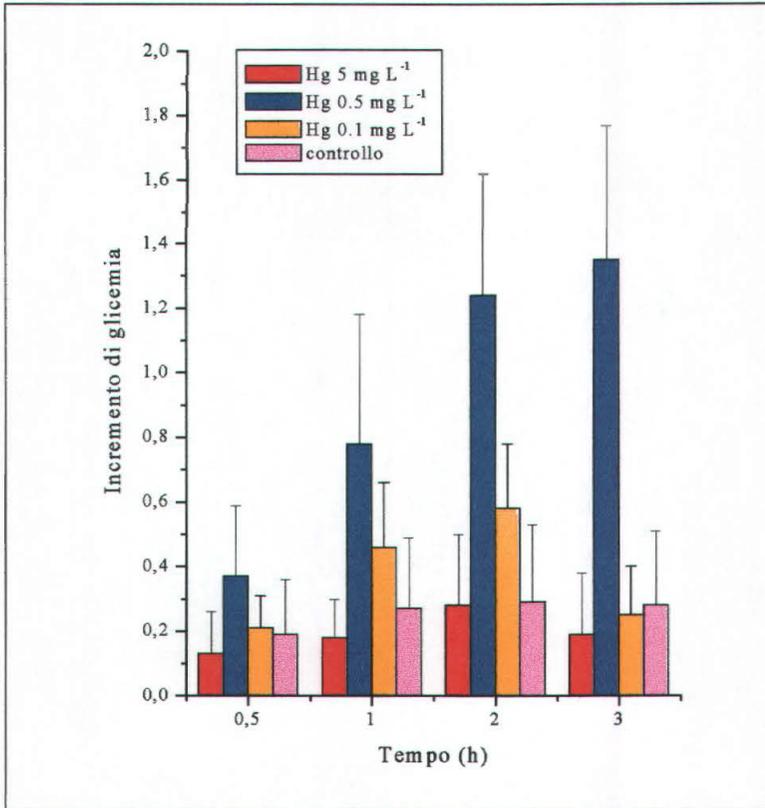


Figura 24. Andamento temporale della glicemia in *P. elegans* trattato con tre diverse concentrazioni di Hg e nel gruppo di controllo non trattato. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 10).

( $P > 0.05$ ) né da quello del controllo ( $P = 0.488$ ). L'esposizione a  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  di  $\text{Hg}^{++}$  induce una lieve iperglicemia a 2 h con un incremento di  $0.58 \pm 0.20 \text{ sd}$  ( $16.30 \pm 1.83 \text{ mg dL}^{-1}$ ) significativo sia rispetto al valore iniziale ( $10.40 \pm 1.51 \text{ mg dL}^{-1}$ ,  $P = 0.001$ ) che a quello del controllo che presenta un aumento di  $0.29 \pm 0.24 \text{ sd}$  ( $13.30 \pm 2.70 \text{ mg dL}^{-1}$ ,  $P = 0.009$ ).

### 3.4.3 - Variazione del cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di *P.elegans* e andamento glicemico dopo esposizione a LPS

L'iniezione del lipopolisaccaride di *E.coli* 0111:B4 in *P. elegans* (Fig. 25) al dosaggio di  $2 \text{ mg g}^{-1}$  peso vivo induce un elevato rilascio di cHH dal peduncolo oculare. Già dopo 30 minuti si passa infatti dal contenuto dei peduncoli di animali non trattati di  $5.60 \pm 2.6 \text{ pmol SG}^{-1}$  a  $0.26 \pm 0.03 \text{ pmol SG}^{-1}$  ( $P = 0.003$ ) i valori rimangono intorno a questo livello fino a 2 h dopo l'iniezione. A 3 h si verifica un lieve incremento del contenuto di ormone che risulta pari a  $0.75 \pm 0.14 \text{ pmol SG}^{-1}$ , valore comunque ancora significativamente inferiore al controllo ( $P = 0.007$ ), la tendenza al recupero del livello di cHH si dimostra anche a 5 h dal trattamento con un contenuto di  $1.42 \pm 0.39 \text{ pmol SG}^{-1}$  ( $P = 0.016$ ). L'iniezione del dosaggio inferiore di LPS  $0.1 \text{ mg g}^{-1}$  peso vivo (Fig. 25) induce un rilascio di cHH dal peduncolo entro 1 h dal trattamento con un valore minimo, a 30 minuti, di  $2.39 \pm 0.93 \text{ pmol SG}^{-1}$  significativamente diverso dal gruppo di controllo ( $P < 0.05$ ); successivamente si assiste ad un graduale recupero della quantità di cHH nel peduncolo. Da 2 h in poi il valore ( $4.11 \pm 2.59 \text{ pmol SG}^{-1}$ ) non risulta significativamente diverso dal controllo ( $P > 0.05$ ) e a 5 h si rileva un recupero totale del contenuto dell'ormone con un valore di  $5.21 \pm 1.23 \text{ pmol SG}^{-1}$  ( $P = 0.804$  vs. controllo di  $5.60 \pm 2.6 \text{ pmol SG}^{-1}$ ).

In conseguenza all'elevato rilascio di cHH dal peduncolo degli animali trattati con  $2 \text{ mg g}^{-1}$  peso vivo di LPS (Fig. 26) si determina nell'emolinfa un consistente aumento del cHH circolante; a 30 minuti dall'iniezione raggiunge il valore di  $7.12 \pm 1.81 \text{ pmol mL}^{-1}$ , significativamente maggiore ( $P = 0.001$ ) di quello nell'emolinfa di animali non trattati pari a  $1.13 \pm 0.28 \text{ pmol mL}^{-1}$ . La concentrazione di ormone circolante si mantiene elevata fino a 2 h, poi da 3 h inizia a decrescere e il contenuto

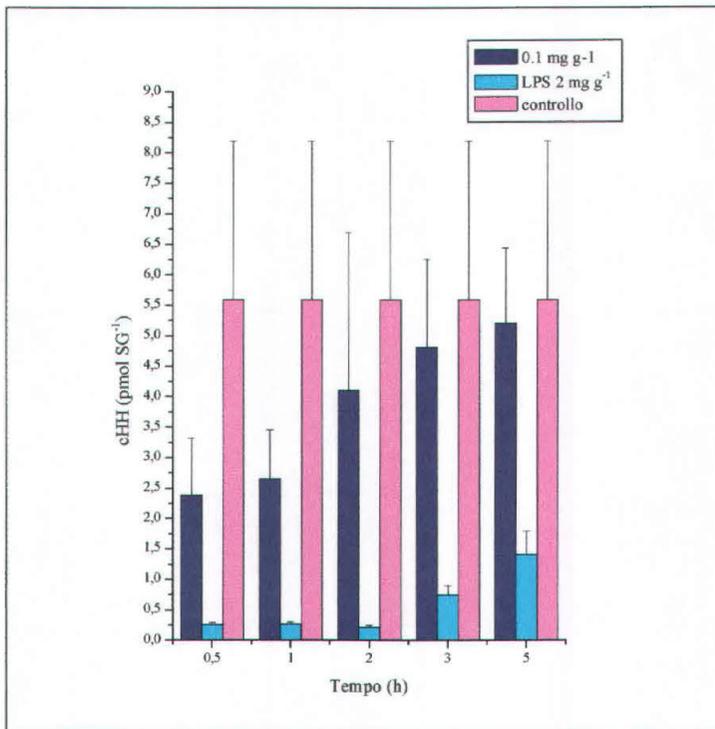


Figura 25. Andamento temporale del cHH nel peduncolo oculare di *P. elegans* iniettato con due diversi dosaggi di LPS e nel gruppo di controllo trattato con salina I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=3 repliche ELISA).

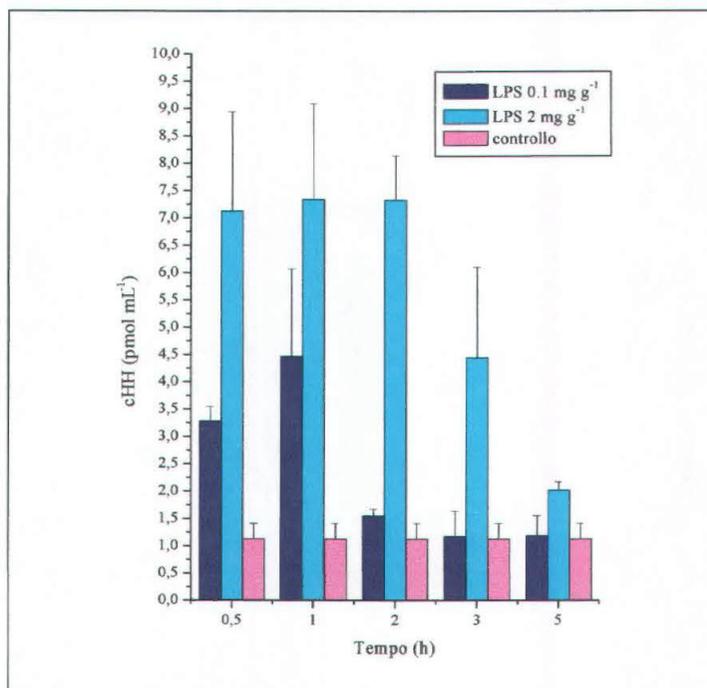


Figura 26. Andamento temporale del cHH nel emolinfa di *P. elegans* trattato con due diversi dosaggi di LPS e nel gruppo di controllo trattato con salina. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=3 repliche ELISA).

di cHH scende a  $4.45 \pm 1.65 \text{ pmol mL}^{-1}$  ( $P=0.001$  vs. controllo) riducendosi ulteriormente fino a  $2.02 \pm 0.16 \text{ pmol mL}^{-1}$  a 5 h, valore comunque, significativamente più elevato rispetto al controllo ( $P=0.001$ ). Negli animali iniettati con la concentrazione più bassa di LPS ( $0.1 \text{ mg g}^{-1}$  peso vivo; Fig. 26) in corrispondenza del rilascio del cHH dal peduncolo si determina un aumento dell'ormone circolante nell'emolinfa che sale dai 30 minuti e presenta un picco massimo di  $4.47 \pm 1.26 \text{ pmol mL}^{-1}$  a 1 h dall'iniezione, valore che risulta significativamente diverso ( $P=0.001$ ) dal livello di cHH presente negli animali di controllo ( $1.13 \pm 0.28 \text{ pmol mL}^{-1}$ ). Ai tempi successivi il livello di ormone si abbassa e da 3 h in poi non è più significativamente diverso dal controllo ( $P=0.8$ ) ed è pari a  $1.18 \pm 0.46 \text{ pmol mL}^{-1}$  (Fig. 26).

L'incremento della glicemia (Fig. 27) in seguito all'iniezione del LPS al dosaggio maggiore rispecchia l'andamento del livello di cHH emolinfatico; fin dai primi 30 minuti infatti si assiste ad un incremento del glucosio di  $1.55 \pm 1.09 \text{ sd}$  ( $26.90 \pm 12.40 \text{ mg dL}^{-1}$ ), valore significativamente diverso da quello iniziale di  $10.70 \pm 2.71 \text{ mg dL}^{-1}$  ( $P=0.001$ ) e dal controllo al medesimo tempo ( $11.40 \pm 2.37 \text{ mg dL}^{-1}$   $P=0.001$ ). A 2 h si raggiunge il picco massimo di incremento di  $4.79 \pm 2.06 \text{ sd}$  ( $58.90 \pm 16.93 \text{ mg dL}^{-1}$ ) i valori poi lentamente decrescono per tornare sui livelli iniziali dopo 24 h. Anche al dosaggio minore di LPS ( $0.1 \text{ mg g}^{-1}$  peso vivo) si riscontra, a livello di variazione di glicemia, una corrispondenza con il rilascio di cHH; infatti si determina una lieve iperglicemia con un picco significativo di  $1.22 \pm 0.44 \text{ sd}$  ( $19.10 \pm 4.01 \text{ mg dL}^{-1}$ ) dopo 1 h dall'iniezione diverso sia dal valore iniziale ( $8.70 \pm 1.42 \text{ mg dL}^{-1}$   $P=0.001$ ) che dal controllo ( $P=0.001$ ). Agli altri prelievi il livello di glucosio circolante decresce e non risulta mai significativamente ( $P>0.05$ ) diverso dal gruppo di controllo iniettato con salina.

#### 3.4.4 - Variazione del cHH nel peduncolo e nell'emolinfa di *P.elegans* e andamento glicemico dopo iniezione di bioamine

La serotonina in concentrazione  $10^{-8} \text{ mol g}^{-1}$  peso vivo si è dimostrata un potente stimolatore del rilascio del cHH dal peduncolo oculare di *P. elegans* (Fig.

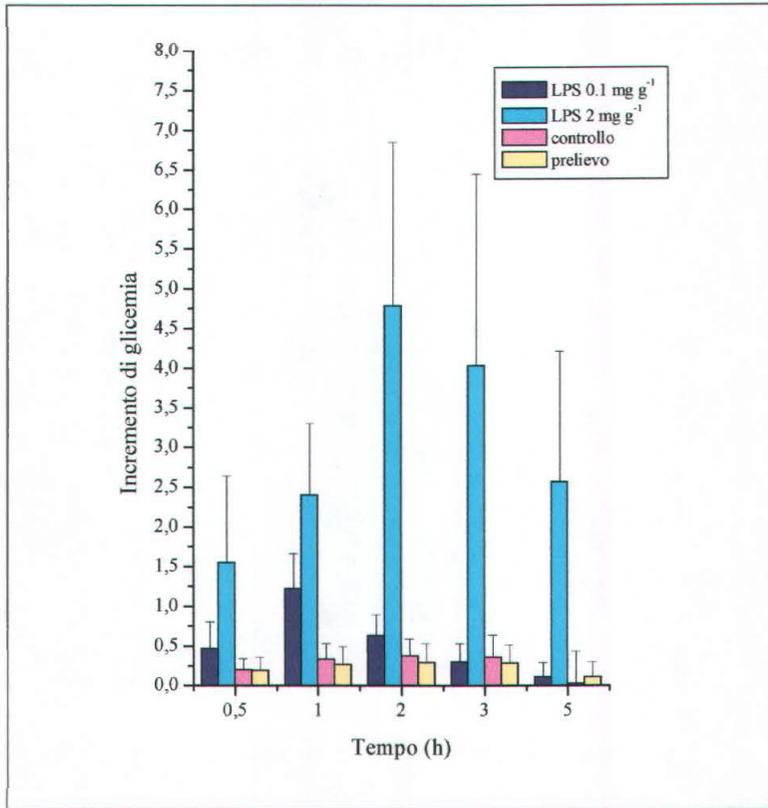


Figura 27. Andamento temporale della glicemia in *P. elegans* trattato con due diversi dosaggi di LPS e nel gruppo di controllo trattato con salina. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 10).

28), fin dai primi 30 minuti dopo l'iniezione il contenuto di cHH nel peduncolo si abbassa drasticamente fino a  $0.25 \pm 0.11 \text{ pmol SG}^{-1}$ , valore significativamente diverso ( $P=0.001$ ) rispetto a quello rilevato nel peduncolo di animali non trattati ( $5.60 \pm 2.6 \text{ pmol SG}^{-1}$ ); il contenuto rimane molto basso per tutta la durata dell'esperimento. La dopamina ( $10^{-8} \text{ mol g}^{-1}$  peso vivo) non causa invece alcuna modificazione significativa nel contenuto peduncolare di cHH; infatti nonostante i valori di cHH si abbassino nelle due ore successive all'iniezione, raggiungendo un valore minimo presente di  $4.13 \pm 1.92 \text{ pmol SG}^{-1}$  dopo 30 minuti, questo non risulta significativamente diverso dal controllo ( $P=0.374$ ).

La figura 29 mostra le variazioni di cHH a livello emolinfatico dopo iniezione delle due bioamine. La 5-HT induce un marcato e rapido incremento dell'ormone circolante con un picco massimo a 2 h di  $8.33 \pm 1.87 \text{ pmol mL}^{-1}$ , significativamente diverso ( $P=0.001$ ) dal valore di cHH negli animali non trattati che è pari a  $1.13 \pm 0.28 \text{ pmol mL}^{-1}$ . Contrariamente l'iniezione di dopamina non causa variazioni significative nel cHH circolante ( $P>0.05$  vs. controllo per tutta la durata dell'esperimento) e anche l'aumento massimo che rilevato a 1 h ( $1.57 \pm 0.07 \text{ pmol mL}^{-1}$ ) non risulta significativo ( $P=0.06$ ). Quindi la serotonina contrariamente alla dopamina si dimostra un potente fattore di stimolazione del rilascio del cHH dal peduncolo all'emolinfa; questa situazione si conferma anche valutando la risposta glicemica nell'emolinfa (Fig. 30). La 5-HT determina una iperglicemia che cresce gradualmente fin dai primi 30 minuti dall'iniezione, e raggiunge il suo picco massimo dopo 2 h con un aumento di glucosio pari a  $6.28 \pm 1.91 \text{ sd}$  ( $63.90 \pm 1.91 \text{ mg dL}^{-1}$ ) significativamente diverso sia dal valore iniziale ( $9.20 \pm 1.93 \text{ mg dL}^{-1}$ ,  $P=0.001$ ) che da quello del controllo alla medesima ora, dove l'incremento raggiunto è di  $0.37 \pm 0.22 \text{ sd}$  ( $12.90 \pm 2.56 \text{ mg dL}^{-1}$ ;  $P=0.001$ ). Successivamente i valori di glicemia decrescono tornando sui valori iniziali entro le 24 h ore successive. La dopamina invece non induce alcun effetto iperglicemico; si assiste invece ad un lieve decremento del glucosio emolinfatico con un massimo di  $-0.06 \pm 0.22 \text{ sd}$  ( $10.60 \pm 2.46 \text{ mg dL}^{-1}$ ) 2 h dopo l'iniezione valore che non è significativamente diverso ( $P=0.424$ ) dal livello iniziale di glicemia:  $11.50 \pm 2.46 \text{ mg dL}^{-1}$ ; ma è significativamente minore ( $P=0.05$ ) al valore riscontrato nel gruppo di controllo, al medesimo tempo, che presenta un incremento di  $0.37 \pm 0.22 \text{ sd}$  ( $12.90 \pm 2.56 \text{ mg dL}^{-1}$ ).

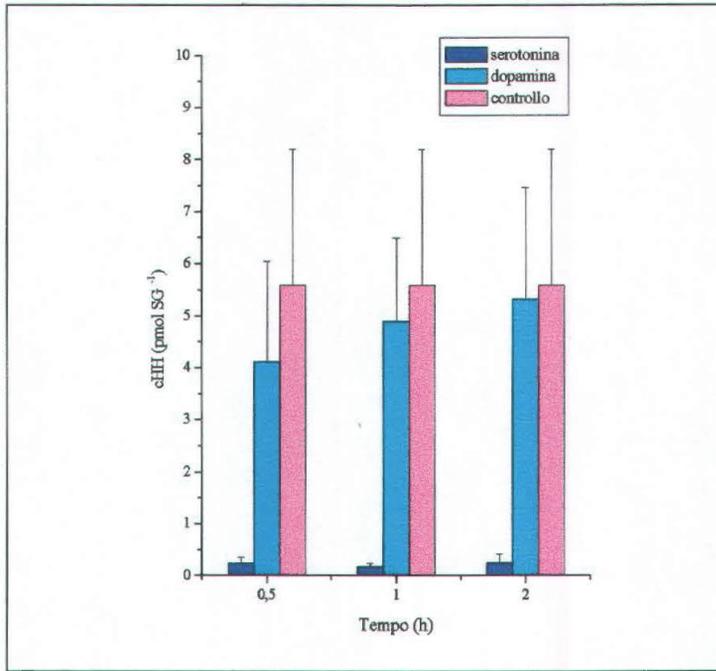


Figura 28. Andamento temporale del cHH nel peduncolo oculare di *P. elegans* iniettato con serotonina, dopamina e nel gruppo di controllo trattato con salina I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=3 repliche ELISA).

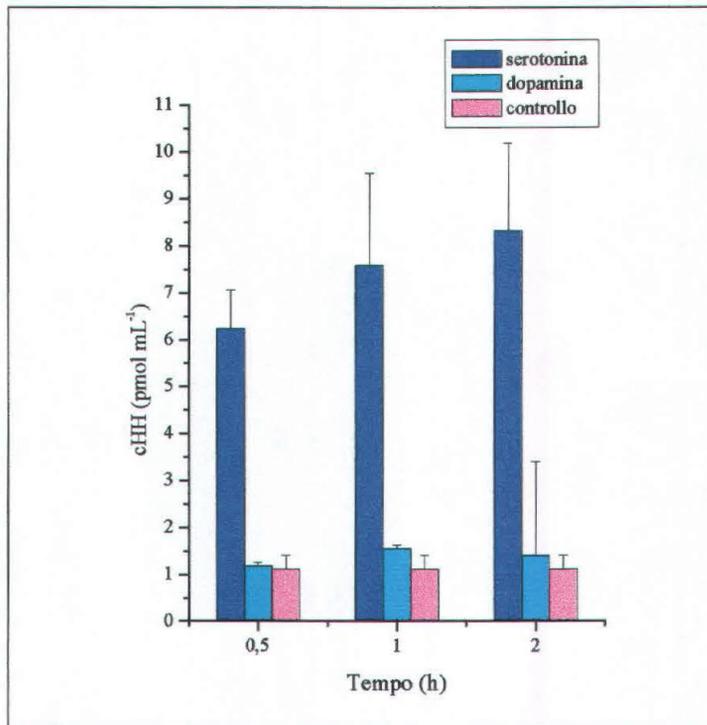


Figura 29. Andamento temporale del cHH nel emolinfa di *P. elegans* trattato con serotonina, dopamina e nel gruppo di controllo trattato con salina. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n=3 repliche ELISA).

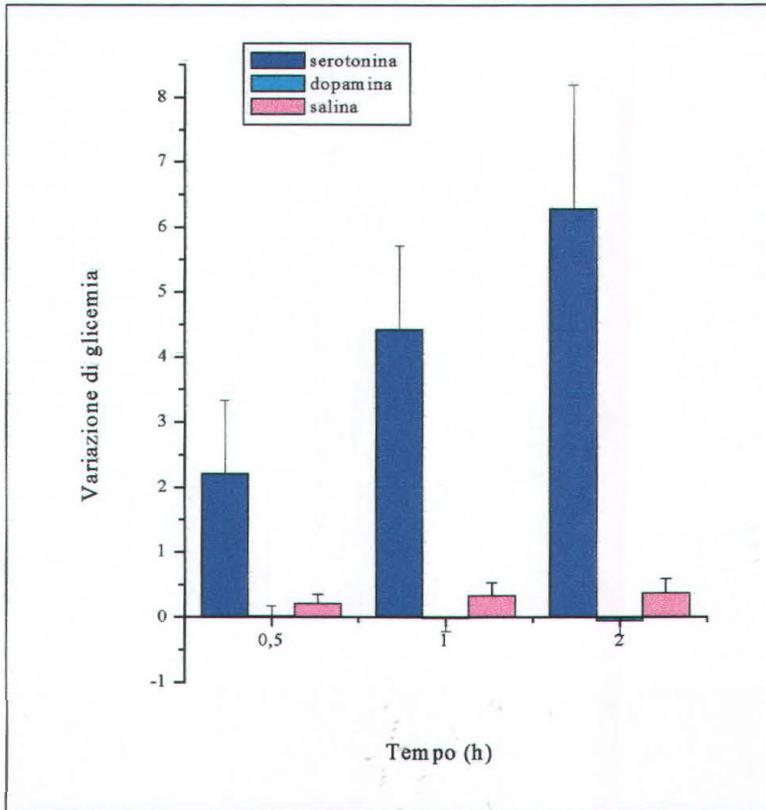


Figura 30. Andamento temporale della glicemia in *P. elegans* trattato con serotonina, dopamina e nel gruppo di controllo trattato con salina. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 10).

I risultati ottenuti dimostrano che in *P. elegans* l'esposizione al rame induce il rilascio del cHH dal peduncolo all'emolinfa e conseguente iperglicemia in maniera dose relata. La concentrazione maggiore di Cu causa un rapido e massiccio rilascio di cHH dal peduncolo, mentre alla concentrazione minore il rilascio del cHH avviene in maniera graduale nel tempo e più ridotta quantitativamente. Questa situazione si riconferma anche a livello di cHH circolante nell'emolinfa. Alla concentrazione minore non si rilevano grandi variazioni del contenuto di cHH emolinfatico mentre alla maggiore invece si assiste ad un graduale ma molto marcato incremento del cHH circolante. La misura della glicemia conferma la correlazione tra esposizione alla sostanza tossica, rilascio del cHH dal peduncolo all'emolinfa e aumento del glucosio infatti la concentrazione maggiore di Cu causa una marcata iperglicemia che raggiunge il suo picco massimo a 2 h mentre il dosaggio minore non presenta grandi alterazioni del livello di glucosio. Negli animali esposti a mercurio la situazione, per quanto riguarda le variazioni di cHH nel peduncolo e nell'emolinfa e la conseguente alterazione della glicemia, si presenta, per le concentrazioni intermedia e minore di esposizione, analoga a quella appena descritta per il rame. La concentrazione maggiore di Hg ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ , letale per tutti gli animali nelle 8 h) presenta invece un andamento anomalo. Dal peduncolo viene rilasciata una notevole quantità di cHH che risulta molto elevato anche nell'emolinfa ma a questo non segue alcuna variazione del livello di glicemia. Questa situazione anomala potrebbe essere correlata alla elevata tossicità del mercurio che potrebbe interferire con i meccanismi che regolano i vari passaggi che portano alla risposta glicemica. La contaminazione di *P. elegans* con due diversi dosaggi di LPS conferma la modalità dose relata del rilascio del cHH dal peduncolo all'emolinfa e la conseguente iperglicemia.

Infine i dati ottenuti confermano il ruolo della serotonina come potente stimolatore del rilascio del cHH dal peduncolo oculare di *P. elegans* all'emolinfa con conseguente innalzamento del glucosio, mentre, al contrario, la dopamina non induce alterazione significativa né a livello di rilascio del cHH né di variazioni di glicemia.

Si conferma quindi il coinvolgimento nella risposta agli stress ambientali del sistema liberazione di cHH dal peduncolo, aumento dell'ormone circolante e iperglicemia e la validità della misura dell'ormone per quantificare l'effetto dell'esposizione.

### 3.5 - Effetto di bioamine e di una enkefalina sulla regolazione del glucosio emolinfatico in *Squilla mantis* e *Astacus leptodactylus*

#### 3.5.1 - Concentrazione del glucosio emolinfatico in animali intatti, epeduncolati e nei gruppi di controllo

Il valore medio iniziale di glucosio nell'emolinfata di *S. mantis* è risultato di  $21.50 \pm 5.68$  sd mg dL<sup>-1</sup> (n = 70) significativamente diverso (t=8.768, P<0.001) dal valore iniziale medio ottenuto negli animali epeduncolati  $8.95 \pm 4.95$  sd mg dL<sup>-1</sup> (n=20). In *A. leptodactylus* non sono invece state rilevate differenze significative (t=0.451, P=0.656) tra le medie dei valori di glicemia negli animali intatti ( $6.57 \pm 2.10$  sd mg dL<sup>-1</sup>, n = 90) e quelle degli epeduncolati ( $6.29 \pm 2.05$  sd mg dL<sup>-1</sup>, n=24).

In *S. mantis* sottoposta ai soli prelievi un picco massimo di incremento di glicemia, non significativo (P>0.05), di  $0.17 \pm 0.04$  ( $25.00 \pm 4.95$  mg dL<sup>-1</sup>, n=5) è stato evidenziato a 2 h; successivamente il livello di glucosio torna ai valori iniziali nelle successive 8 h (tempo 0 =  $21.4 \pm 4.83$  mg dL<sup>-1</sup>). Un altro gruppo di animali di controllo iniettato con soluzione salina sterile ha raggiunto un picco non significativo di incremento di glicemia (P>0.05) pari a  $0.21 \pm 0.11$  ( $28.4 \pm 4.93$  mg dL<sup>-1</sup>) a 3 h. In seguito i valori di glucosio sono tornati sui valori iniziali (tempo 0 =  $23.4 \pm 2.3$  mg dL<sup>-1</sup>) fino alla fine dell'esperimento. Anche in *A. leptodactylus* gli animali sottoposti al solo prelievo hanno mostrato, alla seconda ora, un incremento di glicemia pari a  $0.33 \pm 0.14$  ( $10.17 \pm 1.97$  mg dL<sup>-1</sup> n=6) non significativo (LSD test P>0.05) rispetto al valore rilevato al tempo 0 ( $7.67 \pm 1.51$  mg dL<sup>-1</sup>).

Gli animali iniettati con la soluzione fisiologica sterile hanno sviluppato dopo 2 h un lieve incremento di glucosio emolinfatico pari a  $0.44 \pm 0.25$  sd ( $9.33 \pm 2.16$  mg dL<sup>-1</sup>) non significativo (LSD test P>0.05) rispetto al tempo 0, poi i valori si sono nuovamente assestati sui livelli iniziali (tempo 0 =  $6.5 \pm 1.38$  mg dL<sup>-1</sup>). In entrambe le specie quindi non si sono rilevate differenze significative (P>0.05) nei valori di glicemia ottenuti nei due gruppi di controllo, cioè negli animali sottoposti solo al prelievo e in quelli iniettati con soluzione fisiologica, perciò in seguito è stato usato come controllo più restrittivo il trattamento con iniezione di soluzione fisiologica per comparare l'effetto delle bioamine.

### 3.5.2 - Effetto della serotonina (5-HT) sulla concentrazione di glucosio su esemplari intatti e epeduncolati di *S. mantis* e *A. leptodactylus*

L'iniezione di 5-HT ( $10^{-8}$  mol  $g^{-1}$  peso vivo) in *S. mantis* (Fig. 31) induce a 2 h un aumento massimo del glucosio emolinfatico pari a  $1.95 \pm 0.93$  sd ( $44.67 \pm 14.49$  mg  $dL^{-1}$ ) volte, significativamente diverso sia dal valore iniziale di  $15.83 \pm 3.06$  mg  $dL^{-1}$  ( $P=0.001$ ) che dal gruppo di controllo iniettato con salina dove, allo stesso tempo, l'incremento è  $0.18 \pm 0.16$  ( $27.26 \pm 5.13$  mg  $dL^{-1}$  Student's t-test,  $P=0.012$ ); successivamente i valori di glicemia decrescono e il livello di glucosio torna sui valori iniziali dopo 8 h.

Negli animali epeduncolati dopo l'iniezione della medesima quantità di 5-HT, non si verifica alcuna variazione significativa di glicemia: infatti un incremento minimo pari  $0.18 \pm 0.86$  ( $6.33 \pm 3,27$  mg  $dL^{-1}$ ) si evidenzia dopo 1 h ma non è significativamente diverso ( $P=0.197$ ) dai controlli trattati con salina, dove il valore ottenuto è  $0.03 \pm 0.20$  sd ( $8.40 \pm 1.67$ ) mg  $dL^{-1}$ .

In *A. leptodactylus* dopo l'iniezione della stessa quantità di 5-HT (Fig. 32) l'incremento del glucosio emolinfatico risulta elevato: un significativo incremento della glicemia (t-test  $P<0.05$  vs. controllo) da  $2.14 \pm 1.47$  ( $20.67 \pm 6.71$  mg  $dL^{-1}$ ) a  $5.05 \pm 2.32$  ( $31.17 \pm 11.17$  mg  $dL^{-1}$ ) volte si verifica da 1 h a 5 h, poi il livello di glucosio ritorna ai livelli precedenti l'iniezione.

Non si sono verificate variazioni significative ( $P>0.05$  vs. salina in animali epeduncolati) della glicemia negli animali epeduncolati iniettati con 5-HT ( $10^{-8}$  mol  $g^{-1}$  peso vivo) dove l'incremento massimo registrato a 2 h di  $0.26 \pm 0.31$  sd ( $7.67 \pm 1.63$  mg  $dL^{-1}$ ) non risulta significativamente diverso dal valore iniziale  $6.33 \pm 1.75$  mg  $dL^{-1}$  ( $P=0.2$ ) né dal controllo.

### 3.5.3 - Effetto della dopamina (DA) sulla concentrazione di glucosio in *Squilla mantis* e *Astacus leptodactylus* interi ed epeduncolati

In *S. mantis* l'iniezione di  $10^{-8}$  mol  $g^{-1}$  peso vivo di dopamina (DA) induce una significativa ipoglicemia che compare a 2 h dopo l'iniezione con un decremento del

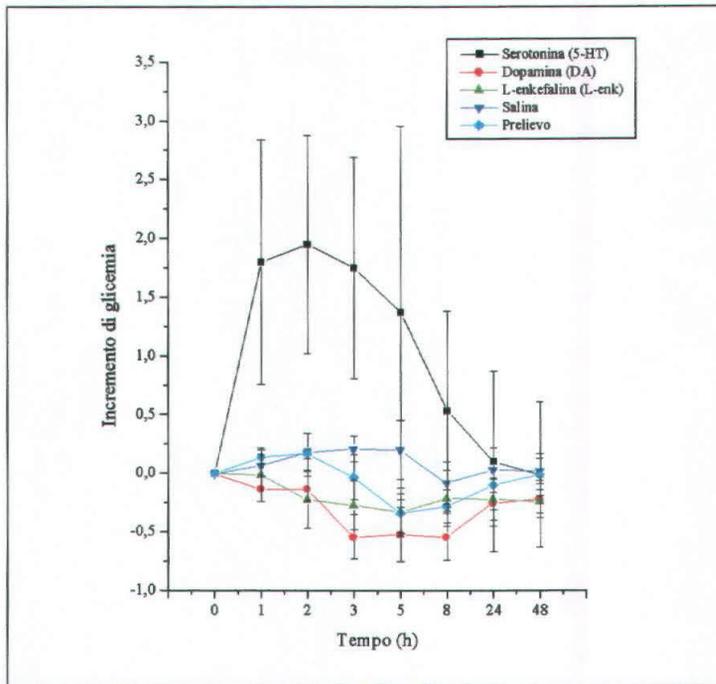


Figura 31. Variazioni glicemiche nel tempo in *S. mantis* iniettata con 5-HT, DA, L-enk e nei gruppi di controllo, uno iniettato con soluzione salina e uno con solo prelievo. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 5).

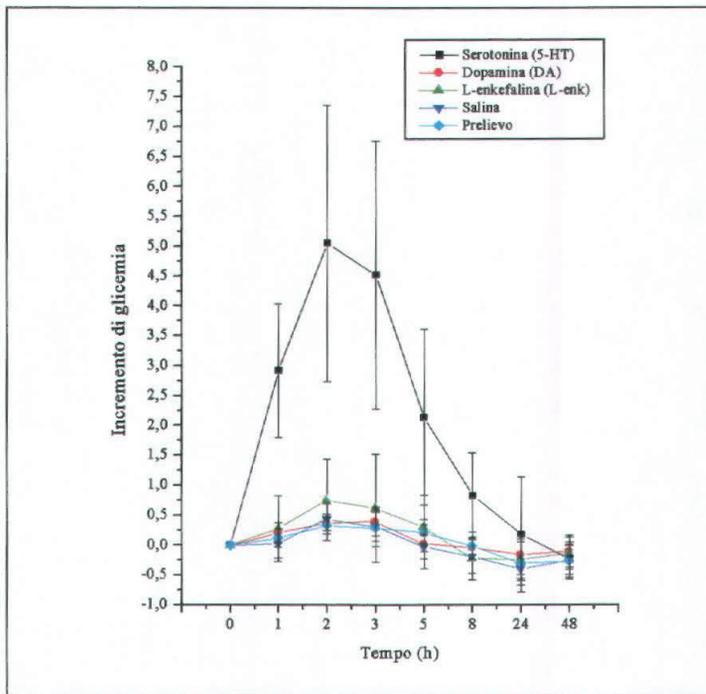


Figura 32. Variazioni glicemiche nel tempo in *A. leptodactylus* iniettata con 5-HT, DA, L-enk e nei gruppi di controllo, uno iniettato con soluzione salina e uno con solo prelievo. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 6).

glucosio che varia tra  $-0.13 \pm 0.11$  sd ( $22.20 \pm 3.70$  mg dL<sup>-1</sup>) e  $-0.54 \pm 0.2$  sd ( $11.20 \pm 3.83$  mg dL<sup>-1</sup>). L'ipoglicemia risulta significativa sia rispetto al valore iniziale  $25.40 \pm 2.70$  mg dL<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ) che al controllo ( $P < 0.05$  rispetto agli animali iniettati con salina); dopo 24 h il glucosio emolinfatico ritorna sui valori iniziali (Fig. 31).

Durante tutto il periodo sperimentale negli animali privi del peduncolo oculare e iniettati con la stessa quantità di DA non si sono verificate variazioni significative di glucosio; infatti solo un lieve incremento di  $0.05 \pm 0.2$  sd ( $6.60 \pm 1.14$  mg dL<sup>-1</sup>) si evidenzia a 2 h ma non risulta significativamente diverso ( $P = 0.067$ ) dal valore ottenuto nel gruppo di controllo (al medesimo tempo) di  $-0.03 \pm 0.06$  ( $8.00 \pm 1.22$  mg dL<sup>-1</sup>), né dal valore iniziale ( $6.40 \pm 1.14$  mg dL<sup>-1</sup>;  $P = 0.767$ ).

L'iniezione di DA ( $10^{-8}$  mol g<sup>-1</sup> peso vivo) in *A. leptodactylus* (Fig. 32) non induce variazioni significative ( $P > 0.05$  vs. controllo) nel glucosio emolinfatico; a 3 h si riscontra un picco massimo di glicemia di  $0.40 \pm 0.24$  sd ( $11.17 \pm 2.99$  mg dL<sup>-1</sup>) che risulta significativo ( $P = 0.041$ ) rispetto al valore iniziale di  $8.00 \pm 1.41$  mg dL<sup>-1</sup> ma non rispetto al controllo al medesimo tempo ( $8.50 \pm 2.17$  mg dL<sup>-1</sup>  $P = 0.112$ ). Negli animali epeduncolati un lieve ma significativo decremento del livello di glucosio ( $P < 0.05$  rispetto agli animali epeduncolati di controllo) che varia tra  $-0.27 \pm 0.14$  ( $5.83 \pm 2.04$  mg dL<sup>-1</sup>) e  $-0.48 \pm 0.08$  sd ( $4.17 \pm 1.17$  mg dL<sup>-1</sup>) è stato evidenziato da 2 h a 8 h dopo l'iniezione della stessa quantità di DA.

#### 3.5.4 - Effetto della Leucina-enkefalina (L-enk) sulla concentrazione di glucosio emolinfatico di *Squilla mantis* e *Astacus leptodactylus* interi ed epeduncolati.

La Figura 31 mostra gli effetti dell'iniezione di L-enk ( $10^{-8}$  mol g<sup>-1</sup> peso vivo) in *S. mantis*; da 2 h si evidenzia una significativa ipoglicemia (t-test  $P < 0.05$  vs. controllo con salina) e il decremento si situa tra  $-0.21 \pm 0.24$  ( $24.00 \pm 4.54$  mg dL<sup>-1</sup>) e  $-0.33 \pm 0.21$  sd ( $20.20 \pm 5.36$  mg dL<sup>-1</sup>). Questi valori risultano significativamente diversi rispetto al valore iniziale di  $30.60 \pm 5.46$  mg dL<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ). Negli animali epeduncolati e trattati con la medesima quantità di L-enk, si verifica un lieve e progressivo decremento della glicemia che da 3 h in poi è compreso tra  $-0.17 \pm 0.13$

( $6.60 \pm 0.89 \text{ mg dL}^{-1}$ ) e  $-0.27 \pm 0.13 \text{ sd}$  ( $6.00 \pm 0.82 \text{ mg dL}^{-1}$ ) valori significativamente diversi ( $P < 0.05$ ) dal valore iniziale (tempo 0) di  $8.00 \pm 0.71 \text{ mg dL}^{-1}$  ma non rispetto al controllo ai medesimi tempi ( $P > 0.05$ ).

In *A. leptodactylus* interi non si rilevano variazioni significative nel livello di glucosio emolinfatico dopo l'iniezione di  $10^{-8} \text{ mol g}^{-1}$  peso vivo di L-enk (Fig. 32). La lieve iperglicemia che si evidenzia con un picco massimo di incremento di  $0.76 \pm 0.68 \text{ sd}$  ( $10.33 \pm 2.73 \text{ mg dL}^{-1}$ ) a 2 h non risulta significativa ( $P = 0.489$ ) rispetto al valore del controllo al medesimo tempo dove l'incremento è di  $0.44 \pm 0.25 \text{ sd}$  ( $9.33 \pm 2.16 \text{ mg dL}^{-1}$ ); anche ai tempi successivi non si verificano variazioni significative ( $P > 0.05$ ) del glucosio emolinfatico rispetto al gruppo di controllo (Fig. 32).

Negli animali epeduncolati da 2 h dopo l'iniezione e fino alla fine del periodo sperimentale si verifica un decremento del livello di glucosio che si pone tra  $-0.01 \pm 0.26$  e  $-0.34 \pm 0.15 \text{ sd}$  ma che non risulta significativo ( $P > 0.05$ ) rispetto ai valori ottenuti negli animali epeduncolati del gruppo di controllo iniettati con soluzione fisiologica.

### 3.5.5 - Effetto della ketanserina e della ciproheptadina (CPH), antagonisti della 5-HT, in *S. mantis* e *A. leptodactylus*

Lo scopo di questo esperimento è stato verificare se l'effetto della 5-HT potesse essere inibito dalla ketanserina, inibitore dei recettori della 5-HT (5-HT<sub>2</sub>-like), e dal CPH (inibitore dei recettori 5-HT<sub>1</sub>-like).

In *S. mantis* (Fig. 33) l'iniezione in animali interi di ketanserina ( $10^{-8} \text{ mol g}^{-1}$  peso vivo) determina da 2 h un aumento del glucosio emolinfatico con un incremento compreso tra  $0.72 \pm 0.54$  ( $34.20 \pm 12.50 \text{ mg dL}^{-1}$ ) e  $0.9 \pm 0.66 \text{ sd}$  ( $37.20 \pm 13.59 \text{ mg dL}^{-1}$ ) valori che risultano significativamente maggiori rispetto a quelli ottenuti nel gruppo di controllo iniettato con soluzione salina (t-test  $P < 0.05$ ).

Quando la 5-HT e la ketanserina sono state co-iniettate non si sono verificati effetti significativi di incremento della glicemia ( $P > 0.05$  vs. controllo per tutta la durata dell'esperimento), infatti si rileva solo un picco massimo di effetto  $0.43 \pm 0.29$

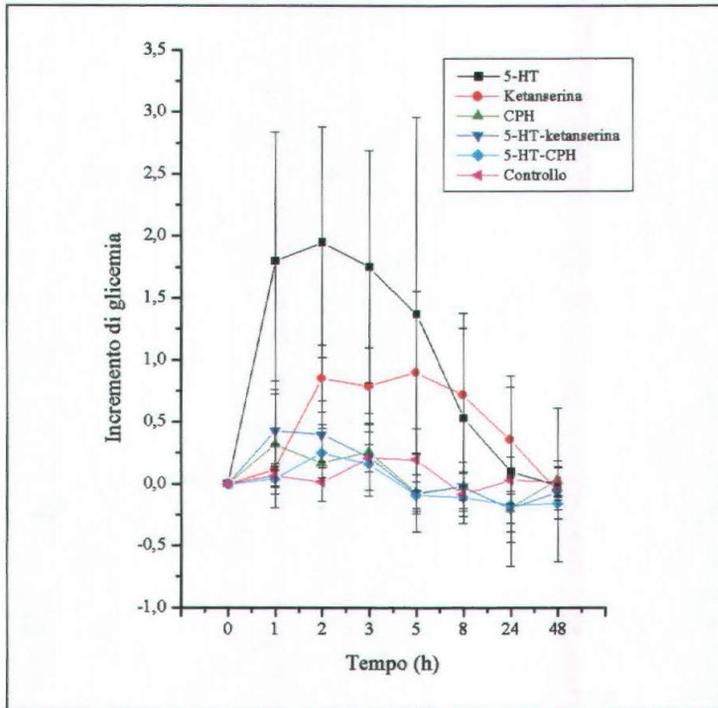


Figura 33. Variazioni glicemiche nel tempo in *S. mantis* iniettata con 5-HT e i suoi inibitori ketanserina e CPH singolarmente o in combinazione e nel gruppo di controllo. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 5).

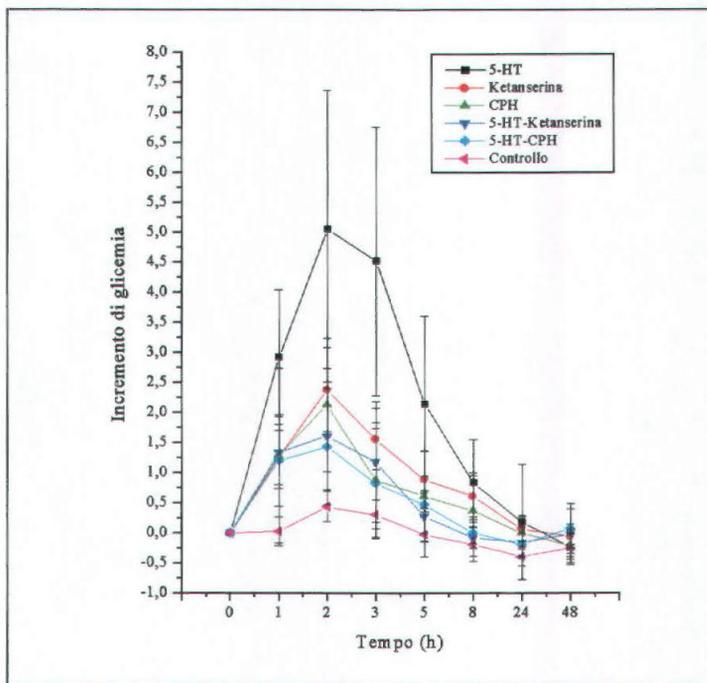


Figura 34. Variazioni glicemiche nel tempo in *A. leptodactylus* iniettato con 5-HT e i suoi inibitori ketanserina e CPH singolarmente o in combinazione e nel gruppo di controllo. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 6).

sd ( $26.60 \pm 3.44$  mg dL<sup>-1</sup>) a 1 h, quindi la ketanserina è risultata in grado di antagonizzare l'effetto iperglicemico della serotonina.

L'iniezione di  $10^{-8}$  mol g<sup>-1</sup> peso vivo di CPH non produce alcun effetto significativo sul livello di glucosio (Fig.33), con un incremento massimo di  $0.32 \pm 0.51$  sd ( $22.00 \pm 6.01$  mg dL<sup>-1</sup>, P=0.312 vs. controllo) 1 h dopo l'iniezione. Quando il CPH è co-iniettato con la 5HT è in grado di inibire l'effetto iperglicemizzante di quest'ultima. Infatti si rileva un lieve ma non significativo incremento della glicemia di  $0.25 \pm 0.2$  sd a 2 h (P=0.56 vs. controllo).

In *A. leptodactylus* l'iniezione della sola ketanserina ( $10^{-8}$  mol g<sup>-1</sup> peso vivo) causa una marcata e significativa iperglicemia (P<0.05 vs. gruppo di controllo) nelle 5 h dopo l'iniezione con un incremento che varia tra  $0.89 \pm 0.48$  e  $2.38 \pm 0.7$  sd.

Quando co-iniettata con la 5-HT, la ketanserina non è in grado di inibire completamente l'azione della 5-HT anche se si verifica un decremento del livello di glucosio emolinfatico rispetto all'effetto determinato dalla sola serotonina. Per questo motivo è stato eseguito un secondo esperimento in cui con la 5-HT ( $10^{-8}$  mol g<sup>-1</sup> peso vivo) è stata co-iniettata ketanserina in concentrazione  $10^{-7}$  mol g<sup>-1</sup> peso vivo; in questo caso (Fig. 34) la ketanserina inibisce in maniera significativa (P<0.05 comparato con gli animali trattati con 5-HT) l'effetto della serotonina.

Il CPH da solo ( $10^{-8}$  mol g<sup>-1</sup> peso vivo) induce un incremento del glucosio emolinfatico e 2 h dopo l'iniezione si raggiunge il picco massimo di  $2.13 \pm 1.11$  sd (P<0.05 rispetto al controllo).

Quando viene co-iniettato con la 5-HT è in grado di inibirne completamente l'effetto anche alla concentrazione di  $10^{-8}$  mol g<sup>-1</sup> peso vivo: infatti i valori di incremento del glucosio emolinfatico ottenuti da 2 h ( $2.43 \pm 1.35$  sd) a 8 h ( $-0.13 \pm 0.18$  sd) dopo l'iniezione sono significativamente più bassi (P<0.05) di quelli ottenuti dall'iniezione della sola 5-HT. Questo effetto inibitorio risulta ancora più evidente quando si inietta CPH alla concentrazione di  $10^{-7}$  mol g<sup>-1</sup> peso vivo (Fig. 34).

### 3.5.6 - Effetto del domperidone antagonista della DA in *Squilla mantis* e *Astacus leptodactylus*

La figura 35 mostra l'andamento della glicemia in *S. mantis* dopo l'iniezione di domperidone (antagonista della DA) in concentrazione  $10^{-8}$  mol g<sup>-1</sup> peso vivo. Un incremento dei valori di glucosio nell'emolinfa (t-test  $P < 0.05$  rispetto al controllo) risulta evidente con un massimo a 2 h di  $0.84 \pm 0.26$  ( $37.00 \pm 4.53$  mg dL<sup>-1</sup>) significativamente diverso ( $P = 0.007$ ) sia dai valori del controllo al medesimo tempo, dove l'incremento è di  $0.18 \pm 0.16$  sd ( $27.60 \pm 5.13$  mg dL<sup>-1</sup>), che dal valore iniziale di  $20.60 \pm 4.51$  mg dL<sup>-1</sup> ( $P = 0.001$ ); i valori di glucosio poi decrescono lentamente per tornare ai livelli iniziali. La co-iniezione di domperidone con DA (Fig. 35) causa una inibizione dell'azione ipoglicemizzante della DA, si assiste infatti a un aumento della glicemia dalla seconda ora fino a 5 h dopo l'iniezione con un incremento che varia tra  $0.23 \pm 0.34$  ( $23.20 \pm 3.54$  mg dL<sup>-1</sup>) e  $0.69 \pm 0.48$  sd ( $31.40 \pm 6.54$  mg dL<sup>-1</sup>), valori che risultano significativamente diversi da quelli degli animali trattati con sola DA ( $P < 0.05$ ).

La figura 36 mostra il marcato incremento di glucosio emolinfatico in *A. leptodactylus* dopo iniezione di domperidone ( $10^{-8}$  mol g<sup>-1</sup> peso vivo) con un picco massimo di incremento a 2 h di  $2.02 \pm 0.96$  sd ( $14.33 \pm 3.08$  mg dL<sup>-1</sup>) volte significativamente diverso sia dal valore registrato nel gruppo di controllo,  $0.44 \pm 0.25$  sd ( $9.33 \pm 2.16$  mg dL<sup>-1</sup>,  $P = 0.009$ ), che dal valore iniziale di  $5.00 \pm 1.10$  mg dL<sup>-1</sup> ( $P = 0.001$ ); successivamente i valori di glucosio tornano sui livelli iniziali al tempo 0. Quando il domperidone viene co-iniettato con la stessa concentrazione di DA risulta efficace nell'inibirne l'azione (Fig. 36); infatti una marcata iperglicemia si sviluppa nelle ore successive alla co-iniezione con un picco massimo di incremento a 2 h di  $1.53 \pm 0.38$  ( $18.33 \pm 2.88$  mg dL<sup>-1</sup>) volte significativamente diverso dal valore ottenuto al medesimo tempo con la sola DA ( $P = 0.001$ ).

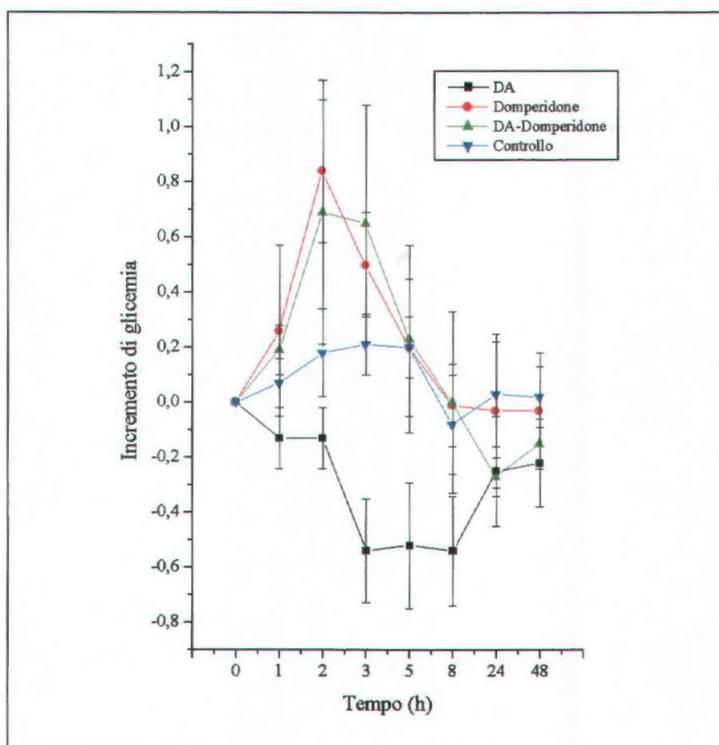


Figura 35. Variazioni glicemiche nel tempo in *S. mantis* iniettata con DA e il suo inibitore domperidone singolarmente o in combinazione e nel gruppo di controllo. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 5).

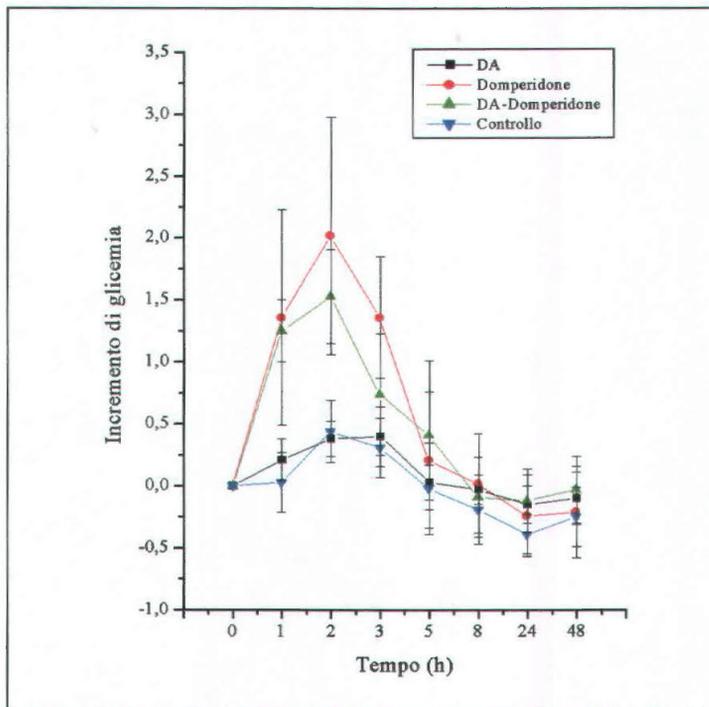


Figura 36. Variazioni glicemiche nel tempo in *A. leptodactylus* iniettato con DA e il suo inibitore domperidone singolarmente o in combinazione e nel gruppo di controllo. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 6).

### 3.5.7 - Effetto del naloxone, antagonista della L-enk, in *Squilla mantis* e *Astacus leptodactylus*

In *S. mantis* (Fig. 37) l'iniezione di naloxone ( $10^{-8}$  mol  $g^{-1}$  peso vivo), inibitore della L-enk, determina una notevole iperglicemia con un incremento crescente nelle 3 h dopo l'iniezione che varia tra  $0.62 \pm 0.12$  ( $32.20 \pm 4.02$  mg  $dL^{-1}$ ) e  $1.09 \pm 0.46$  sd ( $40.80 \pm 3.11$  mg  $dL^{-1}$ ), valori che risultano significativamente diversi dal valore iniziale di  $20.00 \pm 2.92$  mg  $dL^{-1}$  ( $P < 0.05$ ) e dal gruppo di controllo trattato con salina ( $P < 0.05$ ). Quando viene co-iniettato con L-enk ( $10^{-8}$  mol  $g^{-1}$  peso vivo) il naloxone è in grado di bloccare l'effetto ipoglicemico della L-enk. Infatti a 2 e 3 h dopo l'iniezione si verifica un aumento del glucosio circolante con un picco di incremento massimo di  $0.42 \pm 0.23$  sd significativamente diverso dai valori ottenuti con l'iniezione di sola L-enk (t-test  $P = 0.001$ ).

La figura 38 mostra l'andamento temporale della glicemia in *A. leptodactylus* dopo l'iniezione di naloxone ( $10^{-8}$  mol  $g^{-1}$  peso vivo). Questo non induce variazioni significative del glucosio emolinfatico per tutta la durata dell'esperimento ( $P > 0.05$  vs. controllo): infatti l'incremento massimo raggiunto a 1 h di  $0.65 \pm 0.68$  sd ( $9.33 \pm 3.67$  mg  $dL^{-1}$ ) non risulta significativamente diverso dal controllo al medesimo tempo. La co-iniezione di uguali concentrazioni di naloxone e L-enk determina un incremento della glicemia nelle 3 h successive che varia tra  $0.98 \pm 0.50$  sd ( $15.50 \pm 5.58$  mg  $dL^{-1}$ ) e  $1.32 \pm 0.34$  sd ( $17.33 \pm 6.77$  mg  $dL^{-1}$ ) volte, valori che risultano significativamente diversi ( $P < 0.05$ ) da quelli ottenuti dagli animali trattati con salina ma non ( $P > 0.05$ ) da quelli ottenuti negli animali iniettati solo con la L-enk.

Questa serie di esperimenti, già effettuata su *Palaemon elegans* (Lorenzon *et. al.*, 1999), è stata eseguita per verificare l'effetto di serotonina, dopamina, L-enkefalina e dei loro inibitori sulla regolazione della quantità di glucosio nell'emolinfa in *Squilla mantis* e *Astacus leptodactylus* due specie molto diverse sia dal punto di vista filogenetico che di ambiente di vita. I risultati ottenuti dimostrano che le bioamine e la L-enk sono in grado di influenzare il livello di glucosio nelle due specie oggetto di studio ed estendono le conoscenze sul coinvolgimento di 5-HT, DA e L-enk *in vivo* sul meccanismo di controllo del rilascio del cHH.

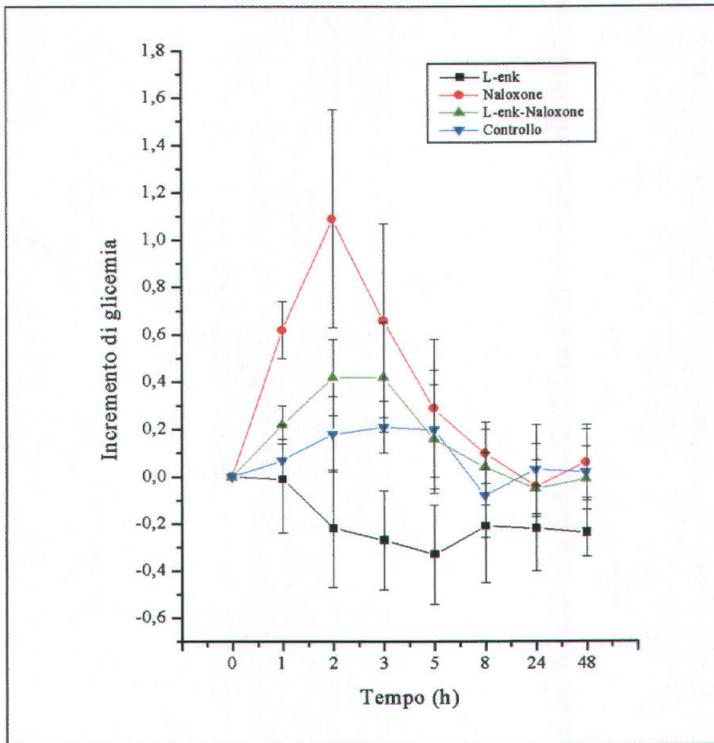


Figura 37. Variazioni glicemiche nel tempo in *S. mantis* iniettata con L-enk e il suo inibitore naloxone singolarmente o in combinazione e nel gruppo di controllo. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 5).

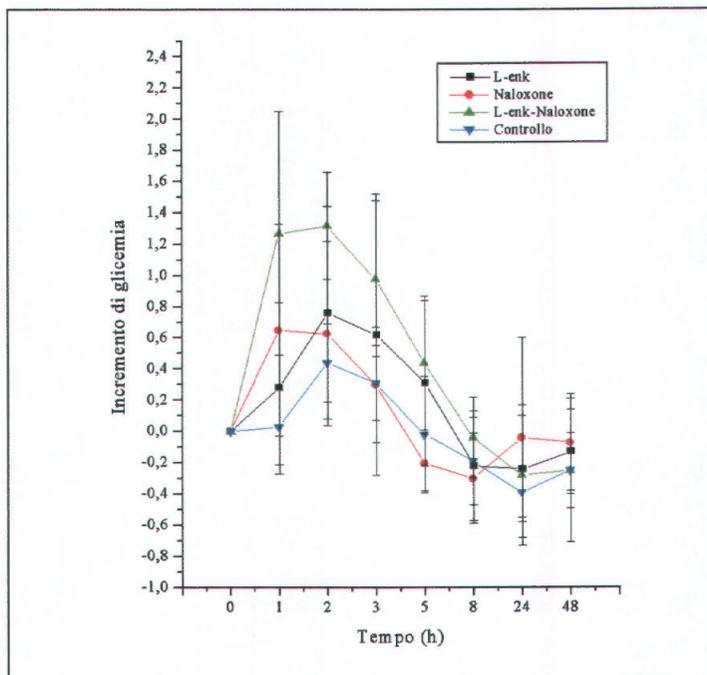


Figura 38. Variazioni glicemiche nel tempo in *A. leptodactylus* iniettato con L-enk e il suo inibitore naloxone singolarmente o in combinazione e nel gruppo di controllo. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 6).

### 3.6 - Effetto del lipopolisaccaride (LPS) sulla glicemia di *A. leptodactylus*

L'esperimento è stato eseguito al fine di verificare l'effetto del lipopolisaccaride (LPS), proveniente da due diverse specie batteriche *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, sul glucosio emolinfatico di esemplari di *A. leptodactylus* interi ed epeduncolati.

Il grafico in figura 39 mostra l'andamento glicemico nel tempo rilevato in *A. leptodactylus* dopo l'iniezione di diversi dosaggi di LPS del ceppo *E. coli* 0111:B4. Al dosaggio maggiore di 0.1 mg g<sup>-1</sup> peso vivo si assiste ad una rapida e marcata iperglicemia con un picco massimo a 3 h, i valori nelle 8 h successive tendono poi a scendere. Gli incrementi ottenuti variano tra 1.21 ± 0.95 (16.33 ± 6.95 mg dL<sup>-1</sup>) e 3.27 ± 1.19 sd (26.75 ± 10.40 mg dL<sup>-1</sup>), valori che risultano significativamente diversi (P>0.05) sia dal tempo 0 (7.50 ± 1.87 mg dL<sup>-1</sup>) che dai valori del gruppo di controllo iniettati con fisiologica. La concentrazione risulta letale per tutti gli animali testati entro 48 h.

Ai dosaggi inferiori di 0.01 e 0.001 mg g<sup>-1</sup> peso vivo si assiste ad un incremento della glicemia che rimane elevato fino a 24-48 h dopo l'iniezione. Gli incrementi variano tra 1.10 ± 1.64 e 1.99 ± 1.27 sd a 0.01 mg g<sup>-1</sup> peso vivo, e tra 0.84 ± 0.50 e 2.11 ± 0.94 sd a 0.001 mg g<sup>-1</sup> peso vivo. Tutti i valori risultano significativamente diversi (t-test P<0.05) dal gruppo di controllo. La mortalità risulta ancora elevata al dosaggio 0.01 mg g<sup>-1</sup> peso vivo, infatti nessun animale sopravvive oltre le 72h. Al dosaggio più basso di 0.0001 mg g<sup>-1</sup> si rileva un picco massimo di glucosio emolinfatico entro 2 h dopo l'iniezione, i valori si mantengono elevati e significativamente diversi (P<0.05) dal controllo fino a 48 h poi si riassetano sui valori iniziali. Nel gruppo di controllo trattato con sola soluzione fisiologica si assiste ad un incremento massimo del glucosio alla 3 h di 0.38 ± 0.10 sd. Il valore di LC<sub>50</sub> a 96h risulta pari a 0.0004 mg g<sup>-1</sup> peso vivo.

L'iniezione di 0.1 mg g<sup>-1</sup> peso vivo in *A. leptodactylus* epeduncolati non induce alcun incremento significativo della glicemia infatti il picco massimo di incremento ottenuto 1 h dopo l'iniezione pari a 0.29 ± 0.33 sd (6.60 ± 1.82 mg dL<sup>-1</sup>) non risulta significativamente diverso (P=0.199) dal valore registrato al tempo 0 (5.20 ± 1.30 mg

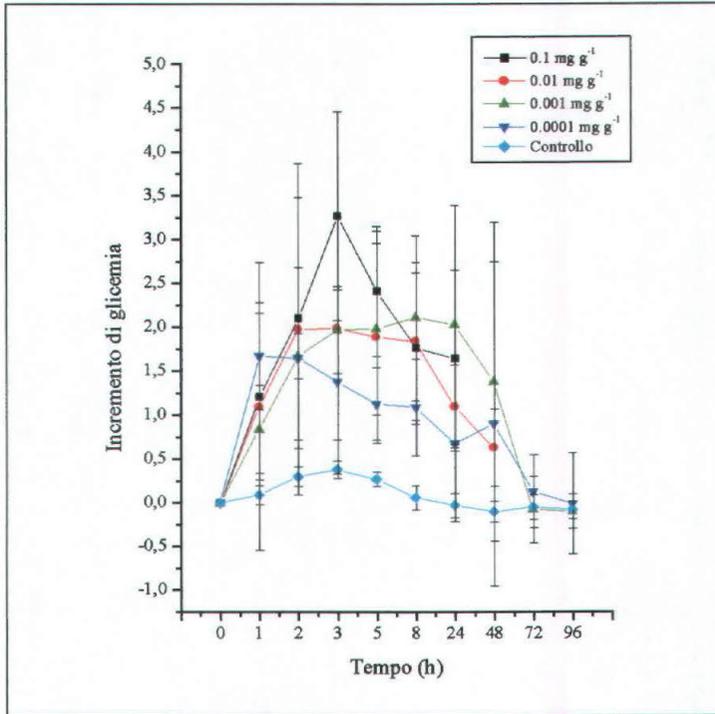


Figura 39. Variazioni glicemiche nel tempo in *A. leptodactylus* iniettato con diversi dosaggi di LPS da *E. coli* 0111:B4 e nei gruppi di controllo iniettato con soluzione salina. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 6).

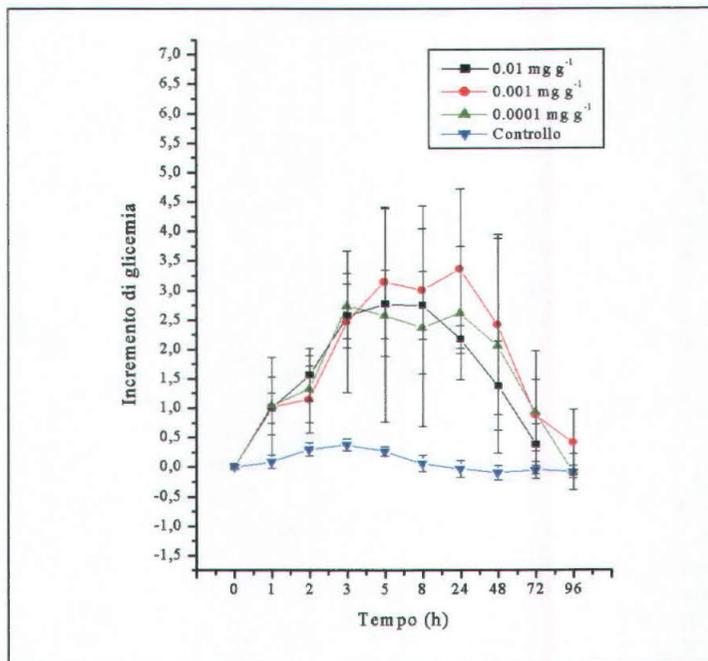


Figura 40. Variazioni glicemiche nel tempo in *A. leptodactylus* iniettato con diversi dosaggi di LPS da *S. marcescens* e nei gruppi di controllo iniettato con soluzione salina. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 6).

dL<sup>-1</sup>); inoltre i valori non risultano significativamente ( $P>0.05$ ) diversi, per tutta la durata dell'esperimento, rispetto a quelli del gruppo di controllo (animali epeduncolati e iniettati con soluzione fisiologica). La mortalità risulta ancora più elevata che nel caso degli animali interi, infatti la mortalità risulta del 100% entro le 24h dall'iniezione.

Il grafico in figura 40 mostra l'andamento temporale della glicemia dopo iniezioni di dosi diverse di LPS di *S. marcescens*. Si può notare come l'effetto iperglicemico non dipenda dalla dose testata, infatti, nelle prime 8 h dopo l'iniezione, i valori di glicemia ottenuti per i tre dosaggi, 0.01, 0.001 e 0.0001 mg g<sup>-1</sup> peso vivo, non sono significativamente diversi tra loro ( $P>0.05$  ai vari tempi e dosaggi) ma tutti significativamente diversi ( $P<0.05$ ) dal gruppo di controllo iniettato con soluzione fisiologica. Nei valori di picco gli incrementi si situano tra  $2.74 \pm 0.55$  e  $3.15 \pm 1.26$  sd. Tra 48 e 72 h dopo l'iniezione del dosaggio maggiore il livello di glucosio emolinfatico tende a diminuire ma si assiste anche alla morte di tutti degli animali testati entro 96 h. Negli altri due casi invece gli animali sopravvivono per tutto il periodo sperimentale e i livelli glicemici si mantengono su livelli significativamente ( $P>0.05$ ) diversi rispetto al controllo allo stesso tempo e rispetto i valori iniziali.

In *A. leptodactylus* epeduncolati l'iniezione di 0.01 mg g<sup>-1</sup> peso vivo non induce alcun incremento significativo della glicemia infatti il valore massimo di glicemia rilevato 3 h dopo l'iniezione pari a  $0.26 \pm 0.65$  sd ( $6.20 \pm 2.49$  mg dL<sup>-1</sup>) non risulta significativamente diverso ( $P=0.532$ ) dal valore registrato al tempo 0 ( $5.40 \pm 1.14$  mg dL<sup>-1</sup>); inoltre i valori non risultano significativamente ( $P>0.05$ ) diversi, per tutta la durata dell'esperimento rispetto, a quelli del gruppo di controllo (animali epeduncolati iniettati con soluzione fisiologica). Anche in quest'ultimo caso la mortalità indotta dal LPS è maggiore che negli animali interi infatti raggiunge il 100% entro le 48h.

I risultati ottenuti in questa fase della ricerca dimostrano l'efficacia del LPS, proveniente da due diverse specie batteriche *E. coli* e *S. marcescens*, nell'indurre incremento del glucosio emolinfatico in *A. leptodactylus* interi ma non in animali epeduncolati, confermando nuovamente il ruolo del cHH peduncolare nelle riposta glicemica. L'incremento per entrambi gli LPS testati risulta molto elevato e

contrariamente a ciò che accade in *P. elegans* (Lorenzon *et al.*, 1997, 2002) per il lipopolisaccaride da *S. marcescens* non risulta evidente una relazione con il dosaggio iniettato. Per tutti i dosaggi testati di entrambi gli LPS l'iperglicemia rimane evidente per un periodo molto lungo 48-74 h contrariamente a quello che accade in *P. elegans* e negli altri crostacei marini già testati, dove lo sviluppo dell'iperglicemia si conclude nell'arco delle 24 h quando i valori di glucosio tornano sui valori normali.

### **3.7 - Variazioni dei livelli di serotonina (5-HT) in *P. elegans* e *A. leptodactylus* in seguito a stress**

Con questa serie di esperimenti si è voluto verificare l'andamento temporale dei valori di serotonina (5-HT), valutati mediante ELISA, nell'emolinfa di *A. leptodactylus* e *P. elegans* indotto rispettivamente da iniezione di LPS e contaminazione da rame; inoltre in *P. elegans* si sono valutate anche eventuali modifiche a livello del contenuto di 5-HT nel peduncolo oculare in animali esposti a rame.

La figura 41 mostra la curva standard di densità ottiche (a 450 nm) ottenute mediante tecnica ELISA per concentrazioni note di 5-HT (0 ng mL<sup>-1</sup>, 15 ng mL<sup>-1</sup>, 50 ng mL<sup>-1</sup>, 150 ng mL<sup>-1</sup>, 500 ng mL<sup>-1</sup> e 2500 ng mL<sup>-1</sup>) da cui sono stati estrapolati i valori di 5-HT ottenuti nei diversi esperimenti.

#### **3.7.1 Effetto del LPS sui livelli emolinfatici di 5-HT di *A. leptodactylus***

Il grafico in figura 42 mostra gli andamenti temporali e dei livelli di 5-HT nell'emolinfa di *A. leptodactylus* dopo iniezione di 100 µL di LPS di *E. coli* 0111:B4 in concentrazione 0.1 e 0.001 mg g<sup>-1</sup> peso vivo e nel gruppo di controllo iniettato con soluzione fisiologica.

L'iniezione dell'alto dosaggio di LPS induce un rapido aumento della quantità di 5-HT nell'emolinfa, infatti entro 30 minuti dall'iniezione si passa da un valore iniziale pari a  $6.87 \pm 2.51$  ng mL<sup>-1</sup> a  $77.55 \pm 16.82$  ng mL<sup>-1</sup>. Il valore si mantiene alto

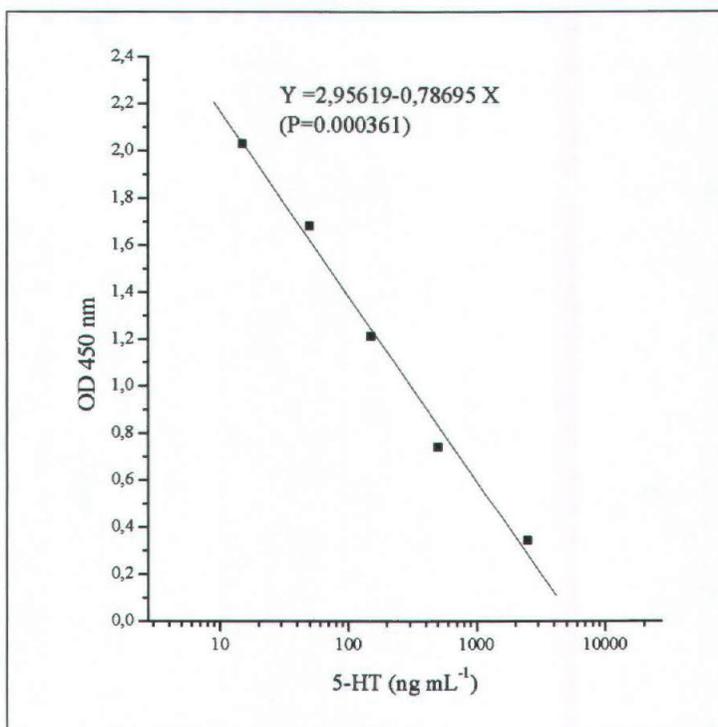


Figura 41. Curva standard di densità ottiche ottenute mediante ELISA per concentrazioni note di 5-HT (0 ng mL<sup>-1</sup>, 15 ng mL<sup>-1</sup>, 50 ng mL<sup>-1</sup>, 150 ng mL<sup>-1</sup>, 500 ng mL<sup>-1</sup> e 2500 ng mL<sup>-1</sup>).

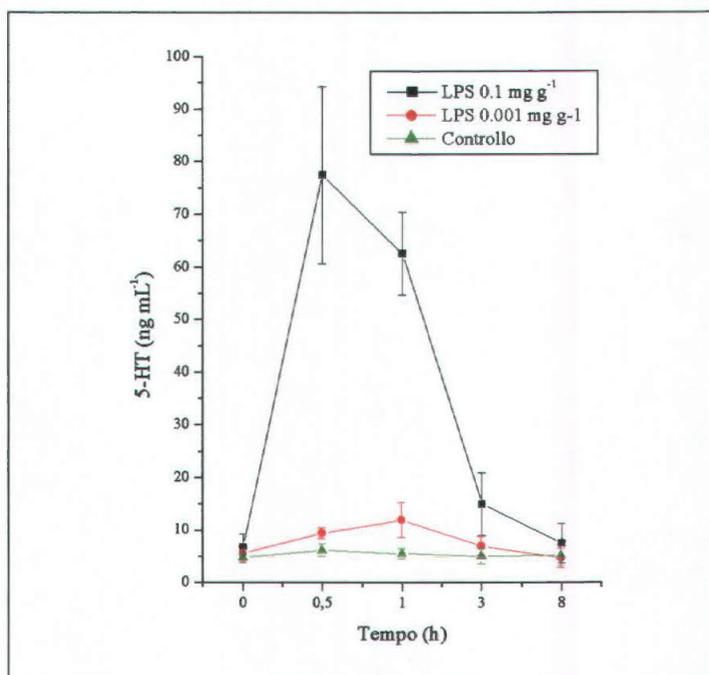


Figura 42. Variazioni del livello emolinfatico di 5-HT nel tempo in *A. leptodactylus* iniettato con diversi dosaggi di LPS da *E. coli* 0111:B4 e nel gruppo di controllo iniettato con soluzione fisiologica. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 3 repliche ELISA).

fino a 1 h ( $62.61 \pm 7.58 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e poi inizia a decrescere; i valori si mantengono significativamente diversi ( $P < 0.05$ ) dal valore iniziale fino a 3 h. Nelle successive 8 h il livello di 5-HT torna sui valori iniziali. I valori registrati risultano significativamente diversi ( $P < 0.05$ ) fino a 3 h anche rispetto a quelli ottenuti dall'emolinfa degli animali del gruppo di controllo, iniettato con soluzione fisiologica, dove i valori non mostrano alcun incremento significativo ( $P > 0.05$  ad ogni tempo) di 5-HT per tutta la durata dell'esperimento.

Al dosaggio minore di  $0.001 \text{ mg g}^{-1}$  peso vivo (Fig. 42) l'incremento di 5-HT risulta molto inferiore; dopo 30 minuti il valore di serotonina rilevato nell'emolinfa è pari a  $9.52 \pm 1.07 \text{ ng mL}^{-1}$  significativamente diverso ( $P = 0.01$ ) dal valore iniziale di  $5.67 \pm 1.77 \text{ ng mL}^{-1}$ ; dopo 1 h dall'iniezione si verifica un picco massimo di aumento pari a  $12.05 \pm 3.34 \text{ ng mL}^{-1}$  ( $P = 0.015$  vs. valore iniziale). Entrambi i valori sono significativamente diversi ( $P < 0.05$ ) anche da quelli del gruppo di controllo agli stessi tempi. Da 3 h fino alla fine dell'esperimento il livello di 5-HT si abbassa ritornando sui valori precedenti al trattamento.

### 3.7.2 - Effetto del rame sui livelli emolinfatici di 5-HT di *P. elegans*

L'esposizione di *P. elegans* a diverse concentrazioni di rame induce una variazione dei livelli emolinfatici della 5-HT. Il grafico in figura 43 mostra gli andamenti temporali dei livelli di serotonina nell'emolinfa di *P. elegans* dopo esposizione a rame in concentrazione  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ; il controllo è dato dall'emolinfa di animali non esposti ad alcun contaminante dove il valore di 5-HT rilevato risulta di  $4.85 \pm 0.98 \text{ ng mL}^{-1}$  ( $n=8$ ).

La concentrazione maggiore di rame induce un notevole e significativo ( $P = 0.001$  vs. valore iniziale e controllo) aumento di 5-HT nei primi 30 minuti dopo l'esposizione, si passa infatti da valori iniziali di  $4.41 \pm 0.51 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $31.85 \pm 5.71 \text{ ng mL}^{-1}$ . Il valore rimane elevato a 1 h ( $28.15 \pm 4.15 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $P = 0.001$  vs. valore iniziale e controllo) per poi decrescere e a 2 h il livello di 5-HT riscontrato pari a  $8.34 \pm 3.59$  non risulta significativamente diverso dal valore iniziale ( $P = 0.07$ ) né dal controllo ( $P = 0.107$ ). I valori emolinfatici di serotonina degli animali esposti

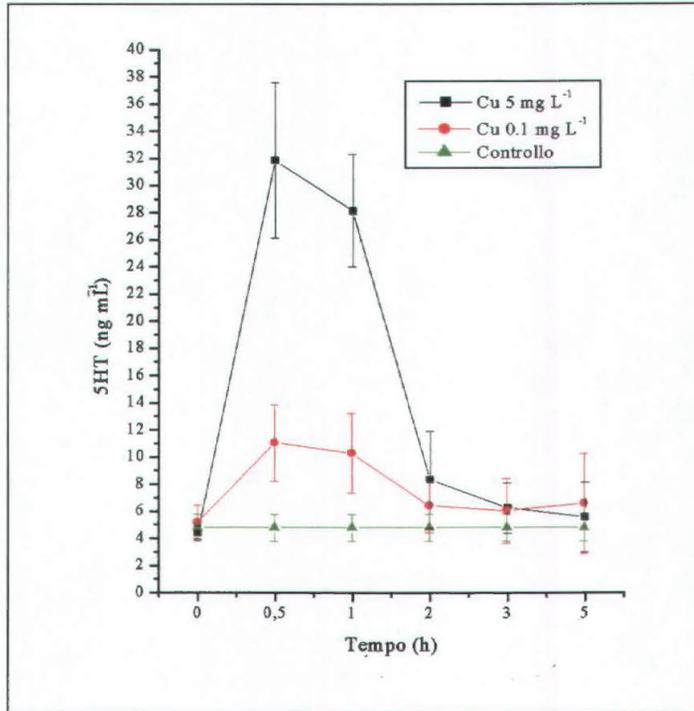


Figura 43. Variazioni del livello emolinfatico di 5-HT nel tempo in *P. elegans* esposto a diverse concentrazioni di rame e nel gruppo di controllo non trattato. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 3 repliche ELISA).

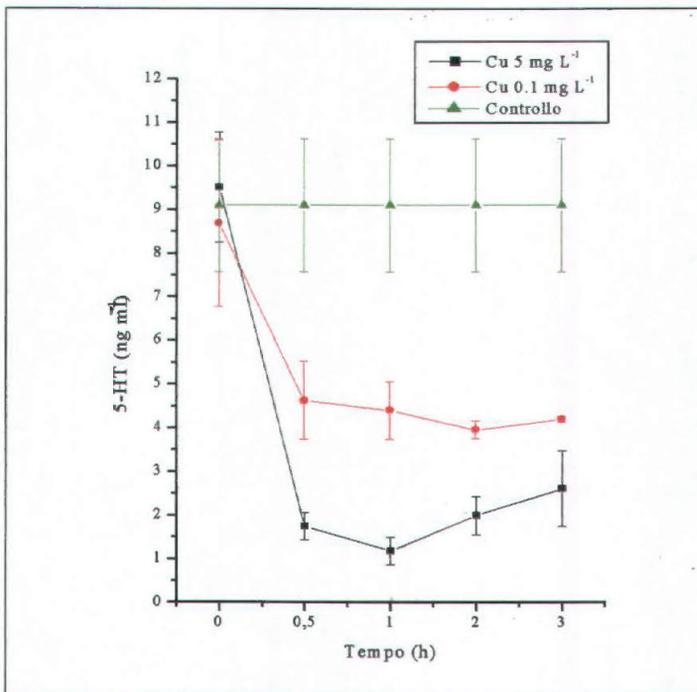


Figura 44. Variazioni nel tempo del livello di 5-HT nel peduncolo oculare di *P. elegans* esposto a diverse concentrazioni di rame e nel gruppo di controllo non trattato. I valori sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard (n = 3 repliche ELISA).

rimangono su livelli non significativamente diversi ( $P>0.05$ ) dal controllo e dal valore iniziale fino alla fine dell'esperimento.

Alla concentrazione inferiore di  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 43) l'aumento massimo si verifica nuovamente dopo 30 min. dall'esposizione ed è pari a  $11.08 \pm 2.83 \text{ ng mL}^{-1}$  significativamente diverso sia dal valore iniziale di  $5.22 \pm 1.24$  ( $P=0.009$ ) che dal controllo ( $P=0.019$ ). Analogamente accade per il valore ottenuto dopo 1 h dall'esposizione ( $10.31 \pm 2.94 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $P=0.019$  rispetto al valore iniziale e  $P=0.012$  rispetto al controllo) successivamente i livelli di serotonina emolinfatica decrescono e si pongono su valori che non risultano significativamente diversi ( $P>0.05$ ), per tutta la durata dell'esperimento, dal valore iniziale e dal controllo.

### 3.7.2 - Effetto del rame sui livelli di 5-HT nel peduncolo di *P. elegans*

Il grafico in figura 44 mostra gli andamenti temporali dei livelli di serotonina nel peduncolo oculare di *P. elegans* dopo esposizione a rame in concentrazione  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ; il controllo è dato dai peduncoli di animali non esposti ad alcun contaminante dove il valore di 5-HT rilevato risulta di  $9.10 \pm 1.52 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Dopo esposizione al rame a concentrazione  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  si assiste ad un massiccio e rapido decremento nel contenuto di 5-HT nel peduncolo: si passa infatti da  $9.51 \pm 1.26 \text{ ng mL}^{-1}$  a un minimo, dopo 1 h, di  $1.17 \pm 0.31 \text{ ng mL}^{-1}$  valore che risulta significativamente diverso ( $P=0.001$ ) sia dal valore iniziale che dal controllo. I valori si mantengono molto bassi, per tutta la durata dell'esperimento, e sono significativamente diversi ( $P>0.05$ ) dal valore iniziale e dal controllo.

Alla concentrazione minore (Fig. 44) si assiste a un dimezzamento del contenuto di 5-HT dai primi 30 minuti dall'esposizione: si passa da un contenuto iniziale di  $8.69 \pm 1.91 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $4.63 \pm 0.89 \text{ ng mL}^{-1}$  ( $P=0.02$ ), valore che risulta significativamente diverso ( $P=0.001$ ) anche dal controllo. I valori si mantengono poi sul medesimo livello per tutta la durata dell'esperimento.

Con i risultati ottenuti in questa serie di esperimenti di misura, mediante ELISA, dei livelli di 5-HT nell'emolinfa e nel peduncolo di *Astacus leptodactylus* e

*Palaemon elegans* esposti a contaminati è stato possibile dimostrare come la 5-HT subisca delle variazioni.

Nell'emolinfa di *A. leptodactylus* iniettato con diversi dosaggi LPS da *E. coli* 0111:B4 rispetto al gruppo di controllo, iniettato con soluzione fisiologica, è risultato che i livelli di 5-HT circolante subiscono un rapido e drastico incremento già dopo 30 minuti dall'iniezione del dosaggio maggiore. Alla concentrazione minore si assiste solo a un lievissimo aumento del valore del 5-HT, indicando una variazione dose relata.

In *P. elegans* esposto a due concentrazioni di rame ancora una volta si ottiene nell'emolinfa un aumento della serotonina concentrazione-dipendente. Andando poi a quantificare la concentrazione di 5-HT nei peduncoli di animali trattati si è rilevato un calo, ancora una volta proporzionale alla concentrazione, nel contenuto della bioamina.

Quindi la serotonina risulta molto importante nei meccanismi di valutazione dello stato di stress dell'animale non solo in quanto implicata nel meccanismo di regolazione del cHH e della glicemia ma in quanto essa stessa soggetta a modificazioni in caso di condizioni sfavorevoli.

## 4 - DISCUSSIONE

### **4.1 – Effetto dei metalli pesanti sugli emociti di *P. elegans***

I risultati ottenuti nella prima parte di questo progetto di ricerca dimostrano che in *Palaemon elegans* il numero di emociti circolanti è fortemente influenzato dall'esposizione, anche per un breve periodo, ai metalli pesanti.

Gli studi precedentemente svolti nei crostacei sull'effetto della contaminazione da metalli pesanti avevano valutato o la sola letalità (Clark, 1989), o variazioni morfologiche e strutturali dei tessuti (Depledge, 1984; Reddy & Fingerman, 1994; Devi & Fingerman, 1995) o la modificazione di processi fisiologici (Soegianto *et al.*, 1999). I pochi autori che hanno valutato le variazioni nel numero di emociti circolanti in relazione all'esposizione a metalli, o altri contaminanti ambientali, hanno suggerito che queste possano portare ad una alterazione delle risposte immunitarie con conseguenza la morte degli individui (Smith & Johnston, 1992; Victor, 1993, 1994; Smith *et al.*, 1995).

Questa risulta la prima ricerca dettagliata su crostacei marini sugli effetti di metalli pesanti, a diverse concentrazioni, sulla popolazione emocitaria, inoltre è la prima a collegare la riduzione del numero di emociti circolanti con la sopravvivenza dell'individuo.

L'importanza dell'emolinfa nei crostacei nel regolare e mantenere l'omeostasi indica che il mantenimento di un numero adeguato di emociti circolanti è un pre-requisito fondamentale per mantenere lo "stato di salute". Mix e Sparks, (1980) e Martin e Graves, (1985) hanno proposto il monitoraggio del numero di emociti come misura dello stress e/o della valutazione delle condizioni fisiologiche. Quale sia un "adeguato" livello di emociti circolanti al momento non è ancora stato definito, in quanto bisogna considerare l'ampio spettro di variazioni, nel numero totale e differenziato di emociti circolanti, correlato al ciclo vitale, alla muta e al livello di nutrizione (Persson *et al.*, 1987; Söderhäll *et al.*, 1988; Truscott & White, 1990; Smith & Johnston, 1992). Sono necessari quindi ulteriori studi per sviluppare e definire l'uso della conta emocitaria come biomarker per i crostacei.

Nel presente lavoro, il numero medio di emociti circolanti in *P. elegans* esposti a diversi tipi e concentrazioni di metalli pesanti, è stato comparato con il THC

dell'emolinfa negli animali di controllo che è stato usato come livello base. Dai risultati ottenuti si evidenzia che tutti i metalli testati inducono una riduzione significativa nella conta emocitaria, anche se la loro efficacia è diversa, e il piombo è risultato essere il metallo più efficace seguito nell'ordine da Zn, Hg, Cr, Cu e Cd. In lavori precedenti era già stata dimostrata in *P. elegans* una analoga influenza sul calo del numero di emociti da parte del lipopolisaccaride (LPS) proveniente da diversi ceppi batterici (Lorenzon *et al.*, 1999, 2002). In altri decapodi la perdita di emociti, dopo iniezione di LPS o altre sostanze non-self (per esempio  $\beta$ -1,3 glucano o batteri), è dovuta alla formazione di aggregati/noduli di emociti (Smith & Ratcliffe, 1980a, b; Smith & Söderhäll, 1983a, b; Smith *et al.*, 1984) quindi è ragionevole pensare che l'emocitopenia osservata nella presente ricerca in *P. elegans* sia un effettivo fenomeno fisiologico e non un artefatto dovuto al prelievo o ad altri cambiamento non di tipo cellulare (per esempio una variazione del volume emolinfatico).

In *P. elegans*, per quanto riguarda il calo di emociti, il NOEL (No Observed Effect Level cioè la concentrazione di una sostanza che non induce alcun effetto osservabile sul parametro oggetto di studio) si pone tra 1 (Hg, Cr, Zn) e 2 (Cd, Cu, Pb) unità  $\log_{10}$  al di sotto del valore del  $LC_{50}$ . Il THC nella valutazione di tossicità dei metalli in *P. elegans* risulta da 10 a 100 volte più sensibile che il test standard di tossicità  $LC_{50}$  a 96 h (Lorenzon *et al.*, 2000) candidando la conta degli emociti ad utile e precoce indicatore dello stato di salute.

In questo lavoro, inoltre, è stato valutato sia il livello minimo di THC tollerato da *P. elegans* e compatibile con la sopravvivenza, che una soglia oltre la quale l'organismo non è in grado di sopravvivere, calcolando la percentuale di riduzione del numero di emociti circolanti in relazione all'esposizione ai metalli. La riduzione massima tollerata e compatibile con la sopravvivenza è risultata di circa il 36 % delle cellule circolanti prima dell'esposizione, mentre la soglia di mortalità risulta dalla perdita di circa il 43% degli emociti iniziali. In un precedente lavoro (Lorenzon *et al.*, 1999) è stato dimostrato come il livello letale di emocitopenia in *P. elegans* iniettati con LPS si pone a 70% delle cellule iniziali cioè gli animali sopravvivono con un numero minore di cellule rispetto al caso dei metalli pesanti. In questo caso la minore tolleranza alla perdita di cellule nell'emolinfa può essere correlata alla maggiore tossicità dei metalli stessi che va ad interferire con altri processi fisiologici. Una differenza nel grado di risposta ad ogni singolo metallo

suggerisce un diverso effetto tossico sui gamberi anche se le differenze osservate sono minime, con il piombo che induce il calo di emociti più elevato pur essendo il metallo meno tossico. Il meccanismo con cui i metalli inducono una riduzione della popolazione emocitaria è ancora sconosciuto; può essere dovuto ad un effetto tossico diretto sugli emociti stessi, forse inducendo lisi o degranolazione, come nel caso del LPS o di altri agenti non-self (Söderhäll & Smith, 1983b), oppure può essere correlato ad uno stress generalizzato che induce un disturbo fisiologico come proposto da Smith & Johnston (1992) and Smith *et al.*, (1995).

Tra i metalli testati nel presente lavoro, rame e zinco sono noti come essenziali per il metabolismo dei crostacei; il rame è un costituente dell'emocianina mentre lo zinco è utilizzato per l'attività di molti enzimi (Bryan, 1984; Rainbow, 1988). I crostacei sono in grado di regolare la concentrazione di questi metalli all'interno del corpo; piccole quantità vengono mantenute in una forma metabolicamente disponibile per intervenire nei meccanismi biochimici. Le quantità in eccesso vengono detossificate, con una trasformazione ad una forma inerte, e immagazzinate nel corpo temporaneamente (verranno eliminate con la muta) o in maniera permanente (Bryan, 1984; Rainbow, 1988); la strategia accumulo/detossificazione varia da specie a specie e in base al tipo di metallo (Rainbow, 1988; 1997). Il fatto che rame e zinco, come si evidenzia dal presente lavoro in *P. elegans*, inducano un minor grado emocitopenia rispetto al piombo può essere correlato a strategie di detossificazione legate al loro ruolo metabolico; per quanto riguarda gli altri metalli testati (Cr, Cd e Hg) si conosce ancora molto poco sui meccanismi di risposta in *P. elegans*.

Comunque indipendentemente dai meccanismi con cui i crostacei rispondano alla contaminazione da metalli pesanti i risultati di questa ricerca dimostrano che a concentrazioni sub-letali i meccanismi di omeostasi possono essere influenzati dalla perdita, sul breve periodo, di emociti circolanti. Questa perdita determina negli animali un deficit dal punto di vista immunologico e risultano quindi più esposti a contaminazioni di tipo microbico. Quindi anche se il recupero del THC nel lungo periodo, indica che un'esposizione cronica ai metalli non rende gli animali direttamente più sensibili alle malattie, il calo di emociti indotto dall'esposizione ad improvvise contaminazioni da metalli tossici (come ad esempio nel caso di versamenti accidentali), può produrre una

finestra critica dal punto di vista immunologico rendendo gli animali suscettibili all'invasione di microrganismi e parassiti opportunisti o patogeni.

Chiaramente c'è un punto critico (indotto dall'entità e molto probabilmente anche la durata della perdita di emociti) oltre il quale la sopravvivenza dell'organismo risulta minacciata e vengono messi in atto tentativi di recupero del titolo emocitario tramite la mobilitazione dalle riserve nei seni emolinfatici e/o regolando la divisione cellulare e la maturazione nei tessuti emopoietici. È stato ampiamente dimostrato che c'è un recupero del numero di emociti circolanti dopo l'acuta emocitopenia indotta da LPS o altri agenti non-self che riporta normalmente i valori emocitari sui livelli fisiologici di base dopo circa 48 h (Smith & Ratcliffe, 1980a; Smith & Söderhäll, 1983a; Smith *et al.*, 1984; Hauton *et al.*, 1997; Lorenzon *et al.*, 1999; Cheng & Chen, 2000). Un fenomeno analogo di recupero del titolo emocitario sul medio periodo è stato rilevato anche dalla presente ricerca.

Al momento nei crostacei i fenomeni biochimici e citologici associati all'emopoiesi sono poco conosciuti, sebbene stiano emergendo alcune evidenze che nella circolazione emolinfatica esistono emociti in fase di proliferazione (Sequeira *et al.*, 1996). Recentemente Hammond e Smith, (2002) hanno dimostrato *in vitro* che nel granchio *Liocarcinus depurator* la stimolazione mediante LPS induce sintesi di DNA in una subpopolazione di emociti.

Se l'emocitopenia indotta dall'avvelenamento da metalli pesanti è dovuta a effetti citotossici è poi molto probabile che la proliferazione emocitaria indotta per recuperare il numero di cellule perse risulti a sua volta incompleta in quanto è noto che le cellule in divisione sono a loro volta particolarmente sensibili agli agenti citotossici.

Quindi risulta molto importante verificare gli effetti dei metalli pesanti sulla mitosi sia delle cellule circolanti che nei tessuti emopoietici di *P. elegans*.

#### 4.2 - Cross-reattività dell'anticorpo anti-*Nenc*HH e attività biologica della proteina ricombinante.

L'interspecificità dell'ormone anti-*Nenc*HH testata con tecnica immunostochimica è stata dimostrata in questo lavoro dalla cross-reattività rilevata in specie appartenenti a diverse superfamiglie (Nephropoidea vs. Astacoidea nel caso di *A. leptodactylus* ), diversi infraordini (Astacidea vs. Caridea per *P. elegans*) e diverse sottoclassi (Hoplocarida vs. Eumalacostraca nel caso di *S. mantis*; Bowman & Abele, 1982) indicando un elevato grado di conservazione di alcuni epitopi del peptide maturo. E' molto importante sottolineare come la cross-reattività dell'anticorpo anti-*Nenc*HH nei confronti del cHH della SG dello Stomatopode *S. mantis* sia al momento il primo dato di reattività immunostochimica di un anticorpo prodotto da un Decapode al di fuori della sottoclasse degli Eumalacostraca (Giulianini *et al.*, 2002). I risultati ottenuti dimostrano come l'anticorpo anti-*Nenc*HH riconosca in maniera specifica il peptide cHH e che possa quindi essere utilizzato come sonda non solo in saggi di tipo immunostochimico ma anche in metodiche, quali l'ELISA, per quantificare in maniera precisa le variazioni dell'ormone sia in condizioni fisiologiche che di stress.

L'anticorpo anti-*Nenc*HH inoltre è risultato efficace anche nell'inibire *in vivo* l'azione iperglicemizzante del peptide sintetico 6xHis-*Nenc*HH in *A. leptodactylus*.

In *P. elegans* e *A. leptodactylus* è stata inoltre dimostrata la funzionalità dal punto di vista biologico dei due peptidi di sintesi GST-*Nenc*HH e 6xHis-*Nenc*HH.

Il GST-*Nenc*HH iniettato in *P. elegans* a diverse concentrazioni è in grado di indurre iperglicemia ma il suo effetto non è dose relata. L'efficacia nell'indurre iperglicemia risulta comunque inferiore a quella determinata dall'iniezione dell'estratto di peduncolo (1 peduncolo equivalente) di *P. elegans*; ciò potrebbe dipendere o da un diverso quantitativo iniettato o da una perdita di efficacia del peptide sintetico dovuta a una alterazione strutturale.

Il peptide 6xHis-*Nenc*HH iniettato in *A. leptodactylus* mostra invece una risposta dose relata nell'indurre iperglicemia. L'iniezione del peptide GST-*Nenc*HH induce un effetto comparabile a quello del medesimo dosaggio di 6xHis-*Nenc*HH in

quanto l'incremento glicemico indotto non risulta significativamente diverso ( $P > 0.05$ ). Anche nel caso di 6xHis-NenCHH la capacità di indurre aumento del glucosio emolinfatico risulta inferiore a quella ottenuta con l'iniezione dell'estratto di peduncolo di *A. leptodactylus*.

I risultati da noi ottenuti concordano parzialmente con quelli di Gu *et al.*, (2000), unico lavoro al momento disponibile sugli effetti biologici del cHH sintetico, in seguito ad iniezione di cHH ricombinante in *Metapenaeus ensis*. Qui l'azione iperglicemizzante del cHH ricombinante raggiungeva il suo picco massimo dopo 1 h e risultava comparabile a quella ottenuta dall'iniezione di estratto di peduncolo. Le differenze che compaiono con i nostri risultati, ovviamente dipendono dal tipo e quantità di molecola iniettata.

#### **4.3 – Verifica delle variazioni dei livelli di cHH, mediante ELISA, nel peduncolo e nell'emolinfa di *P. elegans* in seguito a stress e verifica della relazione con la risposta glicemica**

Con questo lavoro è stata dimostrata la validità dell'utilizzo dell'anticorpo anti-NenCHH come sonda per la quantificazione del cHH mediante ELISA al fine di monitorare le variazioni dell'ormone a livello di peduncolo oculare e emolinfa.

Il livello base di cHH determinato nel peduncolo di *P. elegans* non trattato è di  $5.6 \pm 2.6$  pmol SG<sup>-1</sup> ( $0.062 \pm 0.029$  µg SG<sup>-1</sup>), valori che si pongono in maniera intermedia a quelli fino ad ora rilevati in altre specie. In *Homarus americanus* ad esempio Chang *et al.*, (1990) hanno valutato, mediante HPLC, che il contenuto di cHH nella ghiandola del seno è pari a 3 pmol SG<sup>-1</sup>. Huberman *et al.*, (1995) hanno valutato, mediante RP-HPLC, il contenuto delle due isoforme del cHH ottenendo un rapporto di presenza di cHH-I e cHH-II pari a 3:1 con un contenuto in *Procambarus bouvieri* rispettivamente di 60 e 20 ng SG<sup>-1</sup>. Più recentemente (Marco *et al.*, 2000) nell'aragosta *Jasus lalandii* è stata confermata mediante HPLC ed ELISA una diversa proporzione nelle quantità delle due isoforme con un rapporto in questo caso di 4:1 e un contenuto di cHH-I pari a 20 pmol SG<sup>-1</sup> e di 3 pmol SG<sup>-1</sup> per il cHH-II. In *C. maenas* i dati ottenuti sono molto diversi rispetto ai precedenti, viene infatti

riportato un valore di cHH nella ghiandola del seno molto maggiore pari cioè a 180 pmol SG<sup>-1</sup> (Keller *et al.*, 1985). Non risultano, comunque, ad oggi misure del livello di deplezione e di rilascio del cHH nel peduncolo oculare in seguito a stress.

In *P. elegans* l'esposizione al rame induce il rilascio del cHH dal peduncolo all'emolinfa e conseguente iperglicemia in maniera dose relata; questa situazione si riconferma anche a livello di cHH circolante nell'emolinfa dove la concentrazione maggiore induce un incremento maggiore di cHH circolante. La misura della glicemia conferma la correlazione tra esposizione alla sostanza tossica, rilascio del cHH dal peduncolo all'emolinfa e aumento del glucosio: infatti la concentrazione maggiore di Cu causa una marcata iperglicemia che raggiunge il suo picco massimo a 2 h, mentre il dosaggio minore non presenta grandi alterazioni del livello di glucosio. Negli animali esposti a mercurio, alle sue concentrazioni subletali, la situazione per quanto riguarda le variazioni di cHH nel peduncolo e nell'emolinfa e la conseguente alterazione della glicemia è analoga a quella appena descritta per il rame; ma alla concentrazione maggiore di Hg (5 mg L<sup>-1</sup>, letale per tutti gli animali nelle 8 h) presenta invece un andamento anomalo. Dal peduncolo viene rilasciata una notevole quantità di cHH che risulta molto elevato anche nell'emolinfa ma a questo non segue alcuna variazione del livello di glicemia. Questa situazione anomala potrebbe essere correlata alla elevata tossicità del mercurio che potrebbe interferire con i meccanismi che regolano i vari passaggi che portano alla risposta glicemica. Il mercurio (ma anche cadmio e piombo) potrebbe influenzare la funzionalità del cHH in quanto potrebbe legarsi alle cisteine che rappresentano una componente fondamentale della struttura del peptide, modificandone la conformazione (Rodgers *et al.*, 2001). Il mercurio inoltre influenza la capacità osmoregolatoria nel granchio *Eriocheir sinensis* (Péqueux *et al.*, 1996); in *P. clarkii* invece causa una inibizione dell'attività dell'acetilcolinesterasi (Devi & Fingerman, 1995). L'alterata risposta glicemica (rispetto al modello fino ad ora delineato) alle alte concentrazioni del mercurio potrebbe essere vincolata anche ad alterazioni fisiologiche indotte dal metallo a diversi livelli sistemici.

La contaminazione di *P. elegans* con LPS convalida la modalità dose relata del rilascio del cHH dal peduncolo all'emolinfa e la conseguente iperglicemia. La serotonina conferma il suo ruolo di potente stimolatore del rilascio del cHH dal

peduncolo all'emolinfa con conseguente innalzamento del glucosio, mentre al contrario la dopamina non induce alterazione significativa né a livello di rilascio del cHH né di variazioni di glicemia.

Variazioni del cHH nell'emolinfa sono state riportate da recenti studi su alcune specie di crostacei sottoposti a stress. In *Cancer pagurus*, mediante RIA, sono stati rilevati i livelli di cHH emolinfatico dopo stress da emersione, in questo caso si passa molto rapidamente da livelli di ormone praticamente non rilevabili a  $30 \text{ pmol L}^{-1}$  dopo 4 h di esposizione all'aria e la glicemia cresce parallelamente all'aumentare dell'ormone nell'emolinfa (Webster *et al.*, 1996).

Chang *et al.*, 1998 hanno valutato, mediante ELISA, i livelli di cHH emolinfatico in *Homarus americanus* sottoposto a diversi stressogeni (emersione, variazione della temperatura e della salinità). L'emersione è risultata ancora una volta un potente stimolatore dell'elevazione del cHH emolinfatico passando da valori base di  $4 \text{ fmol mL}^{-1}$  a  $168.1 \text{ fmol mL}^{-1}$  dopo 4 h, anche la variazione di temperatura e di salinità causano un incremento anche se più modesto rispetto all'emersione. Nel caso dell'emersione in *H. americanus* l'incremento di glicemia ha il suo picco in un tempo (2 h) precedente a quello dell'aumento massimo di cHH (4 h) contrariamente a quanto si rileva nei nostri esperimenti dove il picco di incremento di cHH nell'emolinfa precede o al massimo coincide con quello del massimo incremento di glucosio.

Variazioni del livello di cHH emolinfatico sono state riportate (con tecnica RIA) durante le fasi di muta in *C. maenas* (Chung *et al.*, 1999) dove la fase di ecdisi è associata ad un massiccio incremento del cHH (da  $1-5 \text{ fmol } 100 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$  a  $200 \text{ fmol } 100 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$ ). In questo particolare caso però il rilascio del cHH non è vincolato solo al peduncolo in quanto l'aumento di glicemia in fase di ecdisi si rileva anche in animali epeduncolati.

Anche l'infezione da parte di parassiti è in grado di modificare il livello di cHH emolinfatico. In *Nephrops norvegicus* infatti la contaminazione con un dinoflagellato *Hematodinium sp.* causa un incremento dell'ormone nell'emolinfa (Stentiford *et al.*, 2001). Il cHH circolante passa da  $32.2 \text{ fmol mL}^{-1}$  negli animali non contaminati a valori che variano a seconda della fasi di infezione tra  $77.2$  e  $107.65 \text{ fmol mL}^{-1}$ ; in questo caso però non si assiste ad un incremento del glucosio emolinfatico, anzi i

valori di glucosio si riducono durante l'infezione probabilmente a causa dell'utilizzo del glucosio come substrato di crescita da parte del parassita (Stentiford *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda il cHH circolante nell'emolinfa i livelli base per *P. elegans* sono di  $1.13 \pm 0.28 \text{ pmol mL}^{-1}$  ( $0.012 \pm 0.003 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i valori molto più elevati rispetto a quelli riportati in letteratura. La discordanza potrebbe essere collegata a una differenza legata alle singole specie oppure ai diversi volumi interni, nel caso di *P. elegans* molto ridotti rispetto alle altre specie, vista l'analogo contenuto di cHH nel peduncolo oculare. Inoltre non sono ancora state chiarite in maniera esaustiva le cinetiche di rilascio, i tempi di emivita, di utilizzo e di degrado del cHH.

I risultati di questa parte di ricerca, comunque, sono i primi a mettere in relazione, in seguito a stress di diversa natura, il rilascio di cHH dal peduncolo, la quantità di ormone circolante nell'emolinfa e la conseguente variazione del glucosio confermandone il ruolo nella risposta agli stress ambientali.

#### **4.4 - Effetto di bioamine e di una enkefalina sulla regolazione del glucosio emolinfatico in *Squilla mantis* e *Astacus leptodactylus***

I risultati di questo progetto dimostrano che 5-HT, DA e L-enk sono in grado di influenzare il livello di glucosio emolinfatico in *Squilla mantis* e *Astacus leptodactylus*, due specie che sono caratterizzate da ambienti di vita molto differenti e che rappresentano taxa molto distanti dal punto di vista filogenetico. Come già detto, questi dati vanno poi ad integrare quelli di una ricerca precedentemente svolta su *P. elegans* (Lorenzon *et al.*, 1999) di verifica *in vivo* degli effetti delle due bioamine e della enkefalina sul coinvolgimento nel meccanismo di regolazione del glucosio.

I lavori precedenti generalmente riportano gli effetti sulla glicemia di una singola bioamina e/o antagonista e i risultati sono frammentari e a volte anche in conflitto, come riassunto nella tabella 2 (pag. 82).

Il primo risultato che si evidenzia, in questa parte della ricerca, è la differenza tra i valori di glicemia iniziali naturali nelle due specie considerate.

In *A. leptodactylus* interi il livello di glucosio naturale emolinfatico ( $6.57 \pm 2.10$  sd mg dL<sup>-1</sup>, n = 90) è significativamente ( $P < 0.001$ ) più basso che in *S. mantis* ( $21.50 \pm 5.68$  sd mg dL<sup>-1</sup>; n=70). Inoltre in *A. leptodactylus* non ci sono variazioni del valore iniziale di glicemia tra animali interi ed animali epeduncolati ( $6.29 \pm 2.05$  sd mg dL<sup>-1</sup>, n=24); mentre in *S. mantis* il valore iniziale degli epeduncolati è significativamente più basso  $8.95 \pm 4.95$  sd mg dL<sup>-1</sup> (n=20). Analogamente in un nostro precedente lavoro (Lorenzon *et al.*, 2000) il valore iniziale medio di glicemia in *P. elegans* interi è risultato di  $10.25 \pm 3.52$  sd mg dL<sup>-1</sup> (n=260) significativamente più elevato ( $P < 0.05$ ) di quello riscontrato negli epeduncolati pari a  $8.23 \pm 3.1$  sd mg dL<sup>-1</sup> (n=220). Questo indica che il livello basale di glicemia è controllato da un rilascio continuo di cHH dal peduncolo, come riportato per *P. indicus* e *M. monocerus* (Kishori *et al.*, 2001) e per *S. serrata* (Reddy and Kishori, 2001) sotto controllo della M-enk.

La differenza nei valori base di glucosio emolinfatico è probabilmente correlata con i diversi ambienti di vita delle tre specie caratterizzati da livelli di salinità molto diversi: *S. mantis* è una specie bentonica stenoalina adattata ad un ambiente con costante elevata salinità; *P. elegans* nell'ambiente marino-lagunare è sottoposto ad una salinità variabile mentre *A. leptodactylus* è un animale di acqua dolce.

Gli animali marini hanno la necessità di regolare i componenti del sangue per mantenere la concentrazione ionica e osmotica nel loro range di salinità; i valori più elevati di glucosio, nel nostro caso, sono stati trovati nelle due specie marine e questo potrebbe essere correlato con il contributo alla osmolarità e la richiesta di energia necessari per adattarsi alla salinità.

Sebbene gli organi pericardici siano i più coinvolti nel meccanismo di regolazione idromineraie, nei crostacei però altri tessuti neuroemali, quali ad esempio la ghiandola del seno nel peduncolo, stanno ricevendo nuove attenzioni in questo senso in quanto anche la sola epeduncolazione è in grado di dimostrare l'influenza della SG sul bilancio ionico (Morris, 2001). Per il cHH inoltre è stata suggerita una funzione osmoregolatoria in aggiunta alla sua principale attività nella regolazione del glucosio (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000).

E' da lungo tempo conosciuto l'effetto iperglicemizzante della serotonina in molte specie di crostacei (Bauchau & Mengeot, 1966; Keller & Bayer, 1968;

Lorenzon *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001) e i risultati di questa ricerca confermano i dati precedenti ed inoltre evidenziano una maggiore efficacia della 5-HT nell'elevare il glucosio emolinfatico in *A. leptodactylus* che in *S. mantis*.

Non si sono riscontrati, in questo lavoro, effetti della 5-HT sulla glicemia degli animali epeduncolati di entrambe le specie, suggerendo il coinvolgimento dell'ormone cHH nella risposta glicemica. Lee *et al.*, (2001) hanno dimostrato *in vitro* che dopo somministrazione di 5-HT si verifica rilascio di cHH, da tessuti di peduncolo di *Procambarus clarkii* e che l'effetto iperglicemizzante del *medium* veniva annullato dall'immuno-adsorbimento con un antisiero specifico anti-cHH.

In entrambe le specie gli antagonisti ketanserina e CPH sono stati in grado di inibire l'effetto iperglicemizzante della 5-HT. I recettori 5-HT<sub>1</sub> appaiono come i maggiormente coinvolti nel mediare l'azione della 5-HT, poiché il CPH è risultato un più efficace antagonista che la ketanserina (inibitore del recettore 5-HT<sub>2</sub> e anche presunto antagonista della DA). Tutto questo conferma i dati precedenti ottenuti per *P. elegans* (Lorenzon *et al.*, 1999) e concorda con quelli di Lee *et al.*, (2000) in *P. clarkii* suggerendo che l'iperglicemia indotta dalla 5-HT sia mediata dai recettori 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>.

L'iniezione di DA in *S. mantis* causa un marcato abbassamento del glucosio circolante, mentre non sono stati riscontrati effetti rilevanti negli epeduncolati come già riportato per *P. elegans* (Lorenzon *et al.*, 1999) e in *Procambarus clarkii* (Saronjini *et al.*, 1995). Questi risultati però contrastano con quelli ottenuti da Luschen *et al.*, (1993) in *Carcinus maenas* e da Kuo *et al.*, (1995) in *Penaeus monodon* per i quali la DA risultava iperglicemizzante.

Nella presente ricerca l'iniezione del domperidone, bloccante del recettore DA<sub>2</sub>, è risultato in grado di inibire l'effetto sulla glicemia, apparentemente permettendo il rilascio del cHH in entrambe le specie testate. Inoltre questo lavoro dimostra l'effetto ipoglicemizzante della L-enk in *S. mantis* ma non negli animali epeduncolati.

I risultati ottenuti su *S. mantis* confermano quelli conseguiti da Jaros (1990), Luschen *et al.*, (1991), Rothe *et al.*, (1991) and Saronjini *et al.*, (1995) che riportano un effetto ipoglicemico della L-enk rispettivamente in *Uca pugilator*, *C. maenas* e *P. clarkii*.

Al contrario però in *A. leptodactylus* abbiamo riscontrato un effetto iperglicemico della L-enk negli animali interi ma non in quelli privi di peduncolo oculare. Queste osservazioni concordano con quelle su *P. elegans* (Lorenzon *et al.*, 1999) e con le più recenti sui granchi *Oziotelphusa senex senex* (Reddy & Basha, 2001), e *S. serrata* (Reddy and Kishori, 2001) nonché sui peneidi *P. indicus* e *M. monocerus* (Kishori *et al.*, 2001). L'iniezione di naloxone (antagonista della L-enk) in *S. mantis* è in grado di bloccare l'effetto iperglicemizzante della L-enk mentre in *A. leptodactylus* si verifica un effetto iperglicemico sommatorio.

I risultati ottenuti, quindi, confermano il ruolo della 5-HT nell'indurre iperglicemia attraverso il rilascio di cHH dal complesso SGXO, mediato dalla modulazione dell'attività elettrica delle cellule dell'organo X (Saenz *et al.*, 1997).

La ricostruzione più dettagliata dei circuiti neuronali che stanno al di sotto dei meccanismi di rilascio soffre della mancanza di una più precisa identificazione dei tipi di cellule neurosecretrici e da risultati contrastanti sulle evidenze elettrofisiologiche (Glowik *et al.*, 1997 vs Saenz *et al.*, 1997), discrepanze dovute probabilmente alle differenze interspecifiche.

I dati riguardanti la dopamina e le encefaline sono ancora più scarsi infatti solo pochi lavori riportano un adeguato controllo del coinvolgimento del cHH (tabella 2).

Riassumendo quindi la 5-HT sembra provvedere al controllo preminente sulla mobilitazione del glucosio mentre DA e L/M-enk agiscono come modulatori, la cui azione varia anche tra specie molto vicine tra di loro.

Tabella 2. Effetto delle bioamine sui livelli di glucosio di diverse specie di Crustacea

specie	5-HT	DA	L/M-enk	Procedura	Agonista/antagonista	Bibliografia
<i>C. granulata</i>	iper (I)			saggio biologico ELISA CHH	T	Santos <i>et al.</i> , 2001
<i>U. pugilator</i>			ipo (I); NE(E)	saggio biologico	T	Lushen <i>et al.</i> , 1991
<i>U. pugilator</i>			ipo (I)	saggio biologico cromatografia CHH	T	Jaros, 1990
<i>U. pugilator</i>			ipo (I); NE (E)	saggio biologico cromatografia CHH	T	Rothe <i>et al.</i> , 1991
<i>C. maenas</i>	iper (I); iper (E)	iper (I); NE (E)		saggio biologico	T	Luschen <i>et al.</i> , 1993
<i>S. serrata</i>			iper (I); NE (E)	saggio biologico	NT	Reddy & Kishori, 2001
<i>O. senex senex</i>			iper (I)	saggio biologico	NT	Reddy, 1999
<i>O. senex senex</i>			iper (I) NE (E)	saggio biologico	T	Reddy & Basha, 2001
<i>O. limosus</i>	iper (I)			Saggio biologico ELISA CHH	T	Santos <i>et al.</i> , 2001
<i>O. limosus</i>	iper (I), NE (E)			saggio biologico	NT	Keller & Bayer, 1968
<i>P. clarkii</i>		ipo (I); NE (E)	ipo (I); NE (E)	saggio biologico	T	Saronjini <i>et al.</i> , 1995
<i>P. clarkii</i>	iper (I); NE (E)			saggio biologico cromatografia CHH	T	Lee <i>et al.</i> , 2001
<i>A. leptodactylus</i>	iper (I), NE (E)	NE (I):	iper (I); NE (E)	saggio biologico	T	Dati attuali
<i>P. monodon</i>	iper (I); NE (E)	iper (I); NE (E)		Saggio biologico HPLC CHH	T	Kuo <i>et al.</i> , 1995
<i>P. indicus</i>			iper (I); NE (E)	saggio biologico	NT	Kishori <i>et al.</i> , 2001
<i>P. vannamei</i>	iper (I)			saggio biologico	NT	Racotta & Palacios, 1998
<i>M. monocerus</i>			iper (I); NE (E)	saggio biologico	NT	Kishori <i>et al.</i> , 2001
<i>P. elegans</i>	iper (I); NE (E)	ipo (I); NE (E)	iper (I); NE (E)	saggio biologico	T	Lorenzon <i>et al.</i> , 1999
<i>S. mantis</i>	iper (I), NE (E)	ipo (I); NE (E)	iper (I) NE (E)	saggio biologico	T	Dati attuali

Note: iper = iperglicemizzante; ipo = ipoglicemizzante; NE= nessun effetto; I = animali intatti; E= animali epeduncolati; T= testato; NT = non testato.

#### 4.5 - Effetto del lipopolisaccaride (LPS) sulla glicemia di *A. leptodactylus*

Lo scopo di questa breve parte del progetto di ricerca è stato di dimostrare l'efficacia del LPS, proveniente da due diverse specie batteriche *E. coli* e *S. marcescens*, come stressogeno nell'indurre incremento del glucosio emolinfatico in *A. leptodactylus* al fine di utilizzare il LPS come modello per la successiva verifica della relazione tra stress, glicemia e serotonina. L'incremento di glucosio nell'emolinfa per entrambi gli LPS testati risulta molto elevato negli animali interi ma non in animali epeduncolati, confermando nuovamente il ruolo del cHH peduncolare nella risposta glicemica. Contrariamente a ciò che accade in *P. elegans* (Lorenzon *et al.*, 1997, 2002) per il lipopolisaccaride da *S. marcescens* non risulta evidente una relazione con il dosaggio iniettato. Per tutti i dosaggi testati di entrambi gli LPS, inoltre, l'iperglicemia rimane evidente per un periodo molto lungo 48-74 h diversamente a quello che accade in *P. elegans* e negli altri crostacei marini già saggiati dove lo sviluppo dell'iperglicemia si conclude nell'arco delle 24 h, quando i valori di glucosio tornano sui valori normali.

#### 4.6 - Variazioni dei livelli di serotonina (5-HT) in *P. elegans* e *A. leptodactylus* in seguito a stress

Questa serie di esperimenti, di misura dei livelli di 5-HT mediante ELISA, risulta ad oggi, una delle poche quantificazioni effettuate del livello della bioamina nel peduncolo e nell'emolinfa di crostacei, e ha permesso di dimostrare le variazioni subite dalla 5-HT in *A. leptodactylus* e *P. elegans* esposti a contaminati.

Nell'emolinfa di *A. leptodactylus* il livello base di 5-HT è  $5.68 \pm 1.68$  ng mL<sup>-1</sup>; dopo iniezione con diversi dosaggi LPS da *E. coli* 0111:B4 è risultato che i livelli di 5-HT circolante subiscono un rapido e drastico incremento (di circa 12 volte) già dopo 30 minuti dall'iniezione del dosaggio maggiore. Alla concentrazione minore si assiste solo a un lievissimo aumento del valore di 5-HT indicando una variazione dose relata. In *P. elegans* esposto a due concentrazioni di Cu ancora una volta si ottiene nell'emolinfa un aumento (circa 8 volte il livello base di  $4.81 \pm 0.98$  ng mL<sup>-1</sup>)

della serotonina concentrazione-dipendente. Nei peduncoli (quantitativo base  $9.1 \pm 1.52 \text{ ng mL}^{-1}$ ) di animali trattati l'esposizione induce un calo, nel contenuto della bioamina, che risulta ancora una volta proporzionale alla concentrazione.

Sneddon *et al.*, (2000) riportano dei valori di 5-HT nell'emolinfa di *C. maenas* (rilevati con gas cromatografia) di circa  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ , negli animali sottoposti a combattimento e risultati vincitori è stata rilevato un incremento della concentrazione di serotonina.

La 5-HT risulta quindi molto importante nei meccanismi di valutazione dello stato di stress dell'animale, non solo perché implicata nel meccanismo di regolazione del cHH e della glicemia ma in quanto essa stessa soggetta a modificazioni in caso di condizioni sfavorevoli. In *P. clarkii* ad esempio è stato riportato un effetto inibitore del cadmio, del mercurio e del naftalene sull'effetto stimolante della 5-HT sulla maturazione ovarica (Sarojini *et al.*, 1995a; Reddy *et al.*, 1997).

## 5 – CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il lavoro svolto per questo progetto di ricerca ha permesso di individuare in *P. elegans* (specie modello per i nostri studi) una serie di processi fisiologici (THC, regolazione del cHH, risposta glicemica e ruolo delle bioamine) che rappresentano dei bersagli funzionali delle alterazioni ambientali. Le loro variazioni possono quindi essere utilizzate, singolarmente o in associazione, al fine di valutare lo “stato di salute” di un organismo in presenza di sostanze tossiche, in maniera precoce e a concentrazioni subletali, rendendoli utili strumenti predittivi delle alterazioni di vita nei crostacei.

Gli emociti, il cui ruolo nella risposta immunitaria è fondamentale, sono risultati anche un buon indicatore della alterazione dell’ambiente di vita di *P. elegans*, in precedenti lavori in conseguenza ad iniezione di LPS e ora in presenza di contaminazione da metalli pesanti, in quanto la variazione del loro numero è risultata correlata sia alla concentrazione che al tipo di metallo. L’individuazione di livelli soglia di THC compatibili con la sopravvivenza può diventare un utile strumento di valutazione della gravità dello stato di stress in cui si trova l’organismo. Infine il fatto che questo tipo di analisi sia risultato un metodo più efficace e sensibile dei normali test di mortalità, lo rende un utile strumento predittivo. Restano aperte comunque molte domande sul ruolo che gli emociti rivestono nei meccanismi di comunicazione ed eventuale attivazione di altre risposte in condizione di stress e sulle cinetiche di recupero del numero di cellule in seguito alla deplezione indotta da contaminanti.

La dimostrazione della catena di eventi che dal rilascio di cHH dal peduncolo all’emolinfa porta alla variazione del glucosio in seguito a stress di diversa natura, ha confermato l’importanza di questo sistema come efficace e sensibile metodo di valutazione della condizione dell’organismo. Anche in questo caso però restano da approfondire alcuni passaggi fondamentali del processo legati: alle cinetiche di rilascio e di controllo della produzione e liberazione del cHH; al ruolo protettivo che questo sistema possa esercitare e infine ai meccanismi con i quali alcune sostanze,

come nel caso di elevate concentrazioni di metalli pesanti, vanno ad interferire nel corretto funzionamento.

I risultati dello studio sul ruolo della serotonina, dopamina e della L-enkefalina in *Squilla mantis* e *A. leptodactylus*, che completano i precedenti in *P. elegans*, e inoltre la quantificazione della serotonina, indicano la grande importanza di questi neuromediatrici, non solo per il loro ruolo nella cascata di eventi che porta alla risposta glicemica ma anche in quanto essi stessi, come dimostrato in questo progetto per la serotonina, sono possibili bersagli degli agenti tossici e quindi probabili biomarker di contaminazione.

## **6. – RINGRAZIAMENTI**

Questo progetto di Dottorato di Ricerca è stato finanziato grazie ai fondi 4C186 MIPA e MURST 40% (Prof. E.A. Ferrero); ai fondi per il “Progetto giovani ricercatori” anno 2000 e anno 2001 (S. Lorenzon) e con il contributo inoltre dei fondi 5C134 MIPA (Shoreline srl).

Desidero ringraziare tutti quelli che hanno permesso il raggiungimento di questo traguardo. Primo fra tutti Enrico Ferrero guida sempre presente in tutti questi anni di lavoro e di vita; tutti i “Castellani” per la loro partecipazione indispensabile con consigli, aiuto, comprensione e risate.

Cristiano e Michela per la forza e la gioia di affrontare ogni giorno ed infine soprattutto la mia Famiglia che da sempre mi supporta e sopporta.

## 5 - BIBLIOGRAFIA

- Abramowitz A. A., Hisaw, F. L. & Papandrea, D. N. (1944). The occurrence of diabetogenic factor in the stalks of crustaceans. *Biological Bulletin* 86, 1-5.
- Ahsanullah, M. Negilski, D. S. & Mobley, M. C. (1981). Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimps *Callinassa australiensis*. I. Effect of individuals metals. *Marine Biology* 64, 299-304.
- Amirante, G. A. (1986). Agglutinins and lectins of crustacea. Their composition, synthesis, and functions. In: Hemocytic and humoral immunity in arthropods. (A. P. Gupta, ed.) pp. 359-380. Wiley Interscience, New York.
- Aramant, R. & Elofsson, R. (1976). Distribution of monoaminergic neurons in the nervous system of non Malacostraca Crustaceans. *Cell and Tissue Research* 166, 1-24.
- Armstrong, P. B., (1985). Adhesion and motility of the blood cells of *Limulus*. In: Blood cells of Marine invertebrates. (W. D. Cohen ed.) pp 77-124. Alan R. Liss Inc.
- Barthe, J. Y., Mons, N., Cattaert, D., Geffard, M. & Clarac, F. (1989). Dopamine and motor activity in the lobster *Homarus gammarus*. *Brain Research* 497, 368-373.
- Bauchau A. G. (1981). Crustaceans. In: Invertebrate Blood Cells (N. A. Ratcliffe & A. F. Rowley eds.) vol. 2, pp 386-420. Academic Press, New York.
- Bauchau, A. G. & Mègeot, J.C. (1966). Sérotonine et glycémie chez les crustacés. *Experientia* 22, 238-239.
- Bauchau, A. G. & Plaquet, J. C. (1973). Variation du nombre des hemocytes chez les crustacés brachyours. *Crustaceana* 24, 215-223.
- Beltz, B. (1995). Neurobiology and neuroendocrinology. In: Biology of the Lobster *Homarus americanus* (J. R Factor ed.) pp 267-289. Academic Press, San Diego.
- Bocking, D., Dirksen, H. & Keller, R. (2001). The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: structures and biological activities. In: The crustacean nervous system. (W. Korand ed.) pp 84-97. Springer, Berlin.
- Bowman, T. E. & Abele, L. G. (1982). Classification of the recent Crustacea. In: The Biology of Crustacea. (L. G. Abele ed.) vol. I, pp 1-27. Academic Press, New York.
- Bryan, G. W. (1984) Pollution due to heavy metals and their compounds. *Marine Ecology* 5, 1289-1431.
- Brusca, R. C. & Brusca, G. J. (2000). Phylum Arthropoda: il Bauplan degli artropodi e dei trilobiti. In: Invertebrati (Zanichelli ed.) Zanichelli Spa, Bologna.
- Cannon, J. G. (1992). Endotoxin and cytokine responses in human volunteers. In Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides (J. L. Rayan & D. C. Morrison, eds.) Vol. 2, pp. 311-323. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Chaga, O., Lignell, M. & Söderhäll, K. (1995). The haemopoietic cells of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Animal Biology* 4, 59-70.
- Chang, E. S., Prestwich, G. D. & Bruce, M. J. (1990). Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster *Homarus americanus*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 171, 818-826.
- Chang, E. S., Keller, R., & Chang, S. A. (1998). Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stress. *General and Comparative Endocrinology* 111, 359-366.

- Chang, E. S., Ghang S. A., Beltz B. S. & Kravitz E. A. (1999). Crustacean hyperglycemic hormone in the lobster nervous system: localization and release from cells in the subesophageal ganglion and thoracic second roots. *Journal of Comparative Neurology* 414, 50-56.
- Cheng, W. & Chen, J. C. (2000). Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology* 10, 387-391.
- Chisholm J. R. S. & Smith V. J. (1992). Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Journal of Marine Biology Association of the United Kingdom* 72, 529-542.
- Chisholm, J. R. S. & Smith, V. J. (1995). Comparison of antibacterial activity in the haemocytes of different crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110, 39-45.
- Chung, J. S., Dirksen, H. & Webster, S. G. (1999). A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *PNAS* 96, 13103-13107.
- Clark, R. B. (1989). *Marine Pollution*. pp 220 Oxford University Press.
- Cooper, E. L. & Parrinello, N. (1996). Comparative immunologic models can enhance analyses of environmental immunotoxicity. *Annual Review of Fish Disease* 6, 179-191.
- Cornick, J. W. & Stewart, J. E. (1968). Interaction of the pathogen, *Gaffkya homari*, with the natural defence mechanisms of *Homarus americanus*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 25, 695-709.
- Dean, J. M. & Verneberg, F. J. (1966). Hypothermia and blood of crabs. *Comparative Biochemistry and Physiology* 17, 19-22.
- De Klejin, D. P. V., Coenen, T., Laverdure, A. M., Tensen, C. P. & van Herp, F. (1992). Localization of messenger RNA encoding the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) and the Gonad-Inhibiting Hormone (GIH) in the X-organ sinus gland complex of the lobster *Homarus americanus*. *Neuroscience* 51, 121-128.
- De Klejin, D. P. V., De Leuw, E. P. H., Van den Berg, M. G., Martens, G. J. M. & van Herp, F. (1992 a). Cloning and expression of two mRNA encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*. *Biochemical and Biophysical Acta* 1260, 62-66.
- De Klejin, D. P. V. & van Herp, F. (1998). Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development* 33, 263-272.
- Depledge, M. H. (1984). Disruption of circulatory and respiratory activity in shore crabs (*Carcinus maenas* (L.)) exposed to heavy metal pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 78, 445-459.
- Devi, M. & Fingerman, M. (1995). Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, by mercury, cadmium and lead. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 746-750.
- Durliat, M., (1985). Clotting process in Crustacea, Decapoda. *Biological Reviews*, 60, 473-498.
- Elekes, K. Florey, E., Cahill, M. A. Hoeger, U. & Geffard, M. (1988) Morphology synaptic connections and neurotransmitters of the efferent neurons of the crayfish hindgut. *Symposia Biologica Hungarica* 36, 129-146.

- Elofsson, R., & Klemm, N. (1972). Monoamine-containing neurons in the optic ganglia of crustaceans and insects. *Zeitschrift für Zellforschung* 74, 464-473.
- Elofsson, R., Kauri, S., Nielsen, O. & Stromberg, J. O. (1966). Localization of monoaminergic neurons in the central nervous system of *Astacus astacus*. *Zeitschrift für Zelleforschung* 74, 464-473.
- Elofsson, R., Kauri, T. Nielsen S. O. & Strömberg J. O. (1968). Catecholamine-containing nerve fibres in the hind-gut of the crayfish *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Experientia* 24: 1159-1160.
- Elofsson, R., Laxmyr, L., Rosengren, E. & Hanson, C. (1982). Identification and quantitative measurements of biogenic amines and DOPA in the central neurons and haemolymph of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea). *Comparative Biochemistry and Physiology* 71C, 191-205.
- Evans, L. (1999). Lobster health and disease: basic concepts. In: *Proceeding of International Symposium on Health Management*. pp. 3-8. Adelaide, Australia 19-21 September 1999.
- Evans, L., Paganini, M., Fan, A., Fotedar, S., Fotedar, R. & Jussilla J. (1999). Acute and chronic stress studies in freshwater crayfish. In: *Book of Abstract, World Aquaculture 99*. pp. 249. Sidney, Australia 26 April – 2 May 1999.
- Fingerman, M. (1987). The endocrine mechanisms of crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 7, 1-24.
- Fingerman, M. (1992). Glands and secretion. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrate*. (F. W. Harrison & A. G. Humers eds.) Vol 10, pp. 345-394. Wiley Liss Inc. New York
- Fingerman, M. (1995). Endocrine mechanisms in crayfish, with emphasis on reproduction and neurotransmitter regulation of hormone release. *American Zoology* 35, 68-78.
- Fingerman, M. (1997). Crustacean Endocrinology: A retrospective, prospective and introspective analysis. *Physiological Zoology* 70, 257-269.
- Fingerman, M. (1997a). Role of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development* 31, 47-54.
- Fingerman, M., Devi, M., Reddy, P. S. & Katayayani, R. (1996). Impact of heavy metal exposure on the nervous system and endocrine-mediate process in crustaceans. *Zoological Studies* 35, 1-8.
- Fingerman, M., Hanumante, M. M., Deshpande, U. D., & Nagabhushanam, R. (1981). Increase in the total and reducing substances in the hemolymph of the freshwater crab, *Barytelphusa guerini*, produced by a pesticide (DDT) and an indolealkylamine (serotonin). *Experientia* 37, 178-179.
- Fingerman, M., Hanumante, M. M., Kulkarni, G. K., Ikeda, R. & Vacca, L. L. (1985). Localization of substance P-like, Leucine-enkephaline-like, and FMRFamide-like immunoreactivity in the eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Cell and Tissue Research* 241, 473-477.
- Fingerman, M., Nagabhushanam, R. Sarojini, R. & Reddy, P. D. (1994). Biogenic amines in crustaceans: identification, localization and roles. *Journal of Crustacean Biology* 14, 413-437.
- Garcia, U. & Aréchiga, H. (1998). Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. *Cellular and Molecular Neurobiology* 18, 81-99.

- Gentile, J. H., Johns, D. M., Cardin, J. A. & Heltshe, J. F. (1984) - Marine ecotoxicological testing with crustaceans. In : Ecotoxicological testing for marine environment. (G. Persoone, E. Jaspers & C. Claus eds.) vol.1 pp. 479-502. State Univ. Ghent & Inst. Mar. Sci Res., Bredene, Belgium.
- Ghiretti-Magaldi, A., Milanese, C. & Tognon, G. (1977). Hematopoiesis in crustaceans decapoda: origin and evolution of haemocytes and cynocytes of *Carcinus maenas*. Cell Differentiation 6, 167-186.
- Giulianini, P. G., Smullen, R. P., Bentley, M. G. & Ferrero, E. A. (1998). Cytological and immunochemical study of the sinus gland in the Norway Lobster *Nephrops norvegicus*. Invertebrate Reproduction and Development 33, 57-68.
- Giulianini, P. G., Pandolfelli, N., Lorenzon, S., Ferrero, E. A. & Edomi, P. (2002). An antibody to recombinant crustacean hyperglycaemic hormone of *Nephrops norvegicus* cross-reacts with neuroendocrine organs of several taxa of malacostracan Crustacea. Cell and Tissue Research 307, 243-254.
- Glowik R.M., J. Golowasch, R. Keller, and E. Marder (1997). D-Glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation of the blood glucose level. The Journal of Experimental Biology 200,1421-1431.
- Gopaland, U. K. & Young J. S. (1975). Incidence of shell disease in shrimp in the New York Bight. Marine Pollution Bulletin 6, 149-153.
- Govind, C. K. (1992). Nervous system. In: Microscopic Anatomy of Invertebrate.(F. W. Harrison & A. G. Humers eds.) Vol 10 pp 395-438. Wiley Liss Inc. New York
- Gu, P., Yu, K. L. & Chan, S. (2000). Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinat proteins. FEBS Letters 472,122-128.
- Gupta, A. P. (1986) Arthropod immunocytes: Identification, structure, functions and analogies to the functions of vertebrate B- and T- lymphocytes. In: Hemocytic and Humoral Immunity in Athropods. (Gupta, A. P. ed. ) pp. 3-59 Wiley Intersciences, New York.
- Hammond, J. A. & Smith, V. J. (2002). Lipopolisaccharide induces DNA-syntesis in a sub population of hemocytes from the swimming crab, *Liocarcinus depurator*. Developmental and Comparative Immunology 26, 227-236.
- Hanstrom, B. (1933). Neue untersuchung uber sinnersogane und nervensystem der crustaceen. II. Zool. Jarhrb. Abeitkung Anat. Ontogenie Tiere 56, 387-520.
- Harris-Warrick, R. M. & Kravitz, E. A (1984). Cellular mechanisms for modulation of posture by octopamine and serotonin in lobster. Journal of Neuroscience 4, 1976-1993.
- Hauton, C., Williams, J. A. & Hawkins, L. E. (1997). The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common crab, *Carcinus maenas* (L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 211, 115-128.
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D. & Freminet, A. (1996). Behavioral, ventilatory, and methabolic responses of the hypogean amphipod *Niphargus virei* and the epigean isopod *Asellus aquaticus* to severe hypoxia and subsequent recovery. Physiological Zoology 69, 1277-1300.
- Hose, J. E., Martin, G. G. & Gerard, A. S. (1990). A decapod haemocyte classification scheme integrating morphology, citochemistry, and function. Biological Bulletin 178, 33-45.
- Huber, R., Smith, K., Delago, A., Isaksson, K. & Kravitz, E. A. (1997). Serotonin and

- aggressive motivation in crustaceans: altering decision to retreat. PNAS 94, 5939-5942.
- Huberman, A., Aguilar, M. B. & Quackenbush, L. S. (1995). A neuropeptide family from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Aquaculture* 135, 149-160.
- Humanante, M. M. & Fingerman, M. (1982). Roles of 5-hydroxytryptamine and dopamine as neurotransmitters eliciting release of erythropoietic hormones in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Life Sciences* 31, 2667-2672.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. & Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45-52.
- Johansson, M. W. & Söderhäll, K. (1985). Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *Journal of Comparative Physiology* 156, 175-181.
- Johnson I. (1987). The effects of combination of heavy metals, hypoxia and salinity on oxygen consumption and carbohydrate metabolism of *Crangon crangon* (L) and *Carcinus maenas* (L.). *Ophelia* 27, 155-169.
- Jaros, P. P. (1990). Enkephalins, biologically active neuropeptides in invertebrates, with special reference to crustaceans. In: *Frontiers in Crustacean Neurobiology*, (K. Wise, W.D. Krenz, J. Tautz, H. Reichert & B. Mulloney eds.) pp. 471-482 Birkhäuser, Basel.
- Jaros, P. P & Keller, R. (1983). Localization of Leu-enkephalin-like material in the brain and neurohaemal organ of the brachyuran *Carcinus maenas* and the astacidean *Orconectes limosus*. 12<sup>th</sup> Congress of European Comparative Endocrinology. Sheffield.
- Kallen, J. L., Abrahamse, S.L. & van Herp, F. (1990). Circadian rhythmicity of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the haemolymph of the crayfish. *Biological Bulletin* 179, 351-357.
- Keller, R. & Bayer, J. (1968). Zur hyperglykämischen Wirkung von Serotonin und Augentielextrakt beim Flusskrebs *Orconectes limosus*. *Z. Vergl. Physiol.* 59, 78-85.
- Keller, R., Haylett, B. & Cooke, I. (1994). Neurosecretion of crustacean hyperglycemic hormone evoked by axonal stimulation or elevation of saline K<sup>+</sup> concentration quantified by a sensitive immunoassay method. *Journal of Experimental Biology* 188, 293-316.
- Keller, R., Jaros, P. P. & Kegel, G. (1985). Crustaceans Hyperglycemic Neuropeptides. *American Zoology*. 25, 207-221.
- Keller, R. & Orth, H. (1990) Hyperglycemic neuropeptides in crustaceans. In: *Progress in Comparative Endocrinology*. (A. Epple, C. Scanes & M. Stetson eds.) pp. 265-271 Wiley Liss, New York.
- Khayat, M., Yang, W. Y., Aida, K., Nagasawa, H., Tietz, A., Funkenstein, B., & Lubzens, E. (1998). Hyperglycemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in vitro incubated ovarian fragments of the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. *General and Comparative Endocrinology* 110, 307-318.
- Kishori, B., Premasheela, B., Ramamurthi, R. & Reddy, S. (2001). Evidence for hyperglycemic effect of methionine-enkephalin in the prawns *Penaeus indicus* and *Metapenaeus monoceris*. *General and Comparative Endocrinology* 123, 90-99.
- Klein, J. (1990) Entwicklung eines Enzymimmunoassays (ELISA) zur Bestimmung von Neuropeptiden von *Carcinus maenas* L. Diploma thesis, University of Bonn.

- Knowles, F. G. W. & Carlise, D. B. (1956). Endocrine control in the Crustacea. *Biological Review* 31, 396-473.
- Kulkarni, G. K. & Fingerman, M. (1992). Qualitative analysis by reverse phase high performance liquid chromatography of 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Biological Bulletin* 182, 341-347.
- Kuo, C. M., Hsu, C. R. & Lin, C. Y. (1995). Hyperglycemic effects of dopamine in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 135, 161-172.
- Kuo, C. M. & Yang, Y. H. (1999). Hyperglycemic responses to cold shock in the freshwater giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Comparative Physiology B* 169, 49-54.
- Laxmyr, L. (1984). Biogenic amines and DOPA in the central nervous system of decapod crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 77, 139-143.
- Lee C., Yang, P. & Zou, H. (2001). Serotonergic regulation of crustacean hyperglycemic hormone secretion in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Physiological and Biochemical Zoology* 74, 376-382.
- Lee, C., Yau, S., Liao, C. & Huang, W. (2000). Serotonergic regulation of blood glucose levels in the crayfish, *Procambarus clarkii*: site of action and receptor characterization. *Journal of Experimental Zoology* 286, 596-605.
- Listerman, L. R., Deskins, J., Bradacs, H. & Cooper, R. L. (2000). Heart rate within male crayfish: social interactions and effects of 5-HT. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 125, 251-263.
- Livingstone, M. S., Haeis-Warrick, R. M. & Kravitz, E. A. (1980). Serotonin and octopamine produce opposite posture in lobsters. *Science* 208: 76-79.
- Lorenzon, S.** Giulianini, P. G. & Ferrero, E. A. (1997). Lipopolysaccharide-induced hyperglycemia is mediated by CHH release in crustaceans. *General and Comparative Endocrinology* 108, 395-405.
- Lorenzon, S.**, de Guarrini, S., Smith, V. J. & Ferrero, E. A. (1999). Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans *in vivo*. *Fish and Shellfish Immunology* 9, 31-50.
- Lorenzon, S.**, Pasqual, P. and Ferrero, E. A. (1999). Biogenic amines control blood glucose level in the shrimp *Palaemon elegans*. In: *The Biodiversity crisis and crustacea* (F.B. Schram ed.) *Crustacean Issues* 12 pp. 471-480, Balkema Rotterdam.
- Lorenzon, S.**, Francese, M. & Ferrero, E. A. (2000). Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 167-176.
- Lorenzon, S.** Francese, M., Smith V. J. & Ferrero, E. A. (2001). Heavy metal affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish Shellfish immunology* 11, 459-472.
- Lorenzon, S.**, Pasqual, P. & Ferrero, E. A. (2002). Different bacterial lipopolysaccharides as toxicants and stressors in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish and Shellfish Immunology* 13, 27-45
- Lüschen, W., Buck F., Willing, A. & Jaros, P. P. (1991). Isolation, sequence analysis and physiological properties of enkephalins in the nervous tissue of the shore crab *Carcinus maenas* L. *PNAS* 88, 8671-8675.
- Lüschen, W., Willing, A. & Jaros, P. P. (1993). The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the dacapod crustacean, *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 105, 2, 291-296.

- Machele, P. R., Khan, A. K., Sarojini, R. & Nagabhushanam, R. (1989). Copper and cadmium induces changes in blood sugar level of crab, *Barytelphusa canicularis*. Uttar Pradesh Journal of Zoology 9, 113-115.
- Maheswari, P., Mullainadhan, P. & Arumugam, M. (1997). Characterisation of a natural haemagglutinin with affinity for acetylated aminosugars in the serum of the marine prawn, *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards). Fish and Shellfish Immunology 7, 17-28.
- Maffiotti, A. & Bona, F. (1997). Introduzione all'ecotossicologia. In: Quaderni di tecniche di protezione ambientale. Pitagora Editrice Bologna. 139, 17-28.
- Marco, H. G., Brandt, W., Stoeva, S., Voelter, W. & Gäde, G. (2000). Primary structure of a second hyperglycemic peptide and of two truncated forms in the spiny lobster, *Jasus lalandii*. Peptides 21, 19-27.
- Martin, G. G. & Graves, B. L. (1985). Fine structure and classification of shrimps hemocytes. Journal of Morphology 185, 339-348.
- Martin, G. G., Hose, J. E., Choi, M., Provost, R., Omori, G., McKrell, N. & Lam, G. (1993). Organization of haemopoietic tissue in intermolt lobster *Homarus americanus*. Journal of Morphology 216, 65-78.
- Martinez, E. A., Murray M., Leung, M. K & Stefano, G. B. (1988). Evidence for dopaminergic and opiod involvement in the regulation of locomotor activity in the land crab *Gecarcinus lateralis*. Comparative Biochemistry and Physiology 90 C, 89-93.
- Mattson, M. P. & Spaziani, E. (1985). 5-hydroxytryptamine mediated the release of molt-inhibiting hormone activity from isolated crab eyestalk ganglia. Biological Bulletin 169, 246-255.
- McCarthy, J. F. & Shugart, L. R. (1990). Biomarker of environmental contamination. (J. F. McCarthy & L. R. Shugart eds.) Lewis Publishers.
- McKay, D. & Jenkin, C. R. (1970). Immunity in the invertebrates. Correlation of the phagocytotic activity of haemocytes with resistance to infection in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Australian Journal of Experimental Biological and Medical Sciences 48, 609-617.
- Migliore L., de Nicola Giudici, M. (1990). Toxicity of heavy metal to *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea, Isopoda). Hydrobiologia 203, 155-164.
- Mix, M. C. & Sparks, A. K. (1980). Haemocyte classification and differential counts in the dungeness crab, *Cancer magister*. Journal of Invertebrate Pathology 35, 134-143.
- Mo, J. L. Devos, P. & Trausch, G. (2002). Dopamine D<sub>1</sub> receptors in the gills of Chinese crab *Eriocheir sinensis*. Comparative Biochemistry and Physiology 131, 433-438.
- Morris, S. (2001). Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. The Journal of Experimental Biology 204, 979-989.
- Nagabhushanam, R. & Kulkarni, G. K. (1981). Freshwater palaemonid prawn, *Macrobrachium kistenensis* (Tiwari)-Effect of heavy metal pollutants. Proceedings of Indian National Science Academy 47, 380-386.
- Ollivaux, C. & Soye, D. (2000). Dynamics of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ-sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus*. FEBS 267, 5106-5114.
- Perazzolo, L. M., Gargioni, R., Ogliari, P. & Barracco, M. A. A. (2002). Evaluation of some emato-immunological parameters in the shrimps *Farfantepenaeus paulensis*

- submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 214, 19-33.
- Persson, M., Cerenius, L. & Söderhäll, K. (1987). The influence of haemocytes number on the resistance of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus, *Aphanomyces astaci*. *Journal of Fish Diseases* 10, 471-477.
- Péqueux, A., Bianchini, A. & Gilles, R. (1996). Mercury and osmoregulation in the euryhaline crab, *Eriocheira sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 111, 149-155.
- Racotta, I. S. & Palacios, E. (1998). Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of World Aquaculture Society* 29, 351-356.
- Rainbow, P. S. (1988). The significance of trace metal concentrations in decapods. *Symposium Zoological Society London* 59, 291-313.
- Rainbow, P. S. (1997). Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Eстуarine Coastal Shelf Science* 44, 169-175.
- Rao, K. R. & Fingerman, M. (1975). Action of the biogenic amines on crustacean chromatophores. IV. Analysis of the synergistic erythrophoric pigment dispersion evoked by 5-hydroxytryptamine and lysergic acid diethylamide in the dwarf crayfish *Cambarellus shufeldti*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 51, 53-58.
- Ratcliffe, N. A., White, K. N., Rowley, A. F. & Walters, J. B., (1982). Cellular defence system of Arthropoda. In: *The Reticuloendothelial System. A Comparative Treatise*. (N. Cohen, & M. Siegel, eds.), vol. 3, pp. 167-225. Plenum Press, New York.
- Ravindranath, M. H. (1977). The circulating haemocyte population of the mole crab *Emerita (=Hippa) asiatica*, Milne Edwards. *Biological Bulletin* 152, 415-423.
- Reddy, P. S. (1999). A neurotransmitter role of methionine-enkephalin in causing hyperglycemia in the fresh water crab *Oziothelphusa senex senex*. *Current Sciences* 76, 1126-1128.
- Reddy, P. S. & Basha, M. R. (2001). On the mode of action of methionine-enkephalin, FK33-824 and naloxone in regulating the haemolymph glucose level in the fresh water field crab *Oziothelphusa senex senex*. *Zeitschrift fur naturforschung C* 56, 629-632.
- Reddy, P. S. & Bhagyalakshmi, A. (1994). Change in oxidative metabolism in selected tissues of the crab *Scylla serrata* in response to cadmium toxicity. *Ecotoxicological and Environmental Safety* 29, 255-264.
- Reddy, P. S., Bhagyalakshmi A. & Ramamurthy, R. (1983). In vivo acute physiological stress induced by BHC on hemolymph biochemistry of *Oziothelphusa senex senex*, the Indian rice field crab. *Toxicological Letters* 18, 35-38.
- Reddy, P.S., Devi, M. Sarojini, R., Nagabhushanam, R. & Fingerman, M. (1993). Cadmium chloride induced hyperglycemia in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*: Possible role of crustacean hyperglycemic hormone. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 107, 1, 51-57.
- Reddy, P. S. & Fingerman, M. (1994). Effect of cadmium chloride on amylase activity in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 109, 309-314.
- Reddy, P. S., Katayayani, R. V. & Fingerman, M. (1996). Cadmium and Naphthalene induced hyperglycemia in the fiddler crab *Uca pugilator*: Differential modes of action on the neuroendocrine system. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56, 425-431.

- Reddy, P. S. & Kishori, B. (2001). Methionine-enkephalin induces hyperglycemia through eyestalk hormone in the estuarine crab *Scylla serrata*. *Biological Bulletin* 201, 17-25.
- Reddy, P. S., Tuberty, S. R. & Fingerman, M. (1997). Effects of cadmium and mercury on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 62-65.
- Rietschel, E. Th., Brade, L., Lindner, B. & Zähringer, U. (1982). Biochemistry of lipopolysaccharides. In: *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides* (J. L. Rayan & D. C. Morrison, eds.), Vol 1, 3-41. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rodriguez-soza, L., Picones, A., Rosete, G. C., Islas, S. & Arechiga, H. (1997). Localization and release of 5-hydroxytryptamine in the crayfish eyestalk. *The Journal of Experimental Biology* 200, 3067-3077.
- Rodgers, J. S., Hocker, J. R., Hanas, R. J., Nwosu, E. C. & Hanas, J. S. (2001). Mercuric ion inhibition of eukaryotic transcription factor binding to DNA. *Biochemical Pharmacology* 61, 1543-1550.
- Rothe H., Lüschen, W., Asken, A., Willing, A. & Jaros, P. P. (1991). Purified crustacean enkephalin inhibits release of hyperglycemic hormone in the crab *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 99, 1, 57-62.
- Rotllant, G., De Kleijn, D., Charmantier-Daures, M., Charmantier, G. & Van Herp, F. (1993). Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and gonad-inhibiting Hormone (GIH) in the eyestalk of *Homarus gammarus* larvae by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Cell and Tissue Research* 271, 507-512.
- Saenz F., Garcia, U. & Aréchiga, H. (1997). Modulation of electrical activity by 5-hydroxytryptamine in crayfish neurosecretory cells. *Journal of Experimental Biology* 200, 3079-3090.
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G. & Rosa, C. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198, 13-28.
- Sandeman, D. C. (1982) Organization of the central nervous system. In *The Biology of Crustacea* (H. L. Atwood & D. C. Sandeman, eds.) Vol 3, 1-54. Academic Press, New York.
- Santos, E. A. & Colares, P. C. (1986). Blood glucose regulation in an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 83, 673-675.
- Santos, E. A. & Keller, R. (1993). Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone: evidence for a dual feedback control system. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology B* 163, 374-379.
- Santos, E. A. & Keller, R. (1993a). Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism: current perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 106, 405-411.
- Santos, E. A., Keller, R., E. Rodriguez, & Lopez, R L. (2001). Effects of serotonin and floxetine on blood glucose regulation in two decapod species. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, 75-80.
- Santos, E. A., Nery, L. E. M., Keller, R. & Concalves A. A. (1997). Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic Hormone in the regulation of the lipid metabolism. *Physiological Zoology* 70, 415-420.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R. & Fingerman, M. (1995). Dopaminergic and Enkephalinergic involvement in the regulation of Blood glucose in the red swamp

- crayfish *Procambarus clarkii*. *General and Comparative Endocrinology* 97, 160-170.
- Sarojini, R., Nagabhushanam, R. & Fingerman, M. (1995a). Naphthalene-induced atresia in the ovary of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 31, 76-83.
- Sedlmeier, D. (1987). The role of the hepatopancreatic glycogen in the action of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 87, 423-425.
- Sedlmeier, D. (1988). The crustacean hyperglycemic hormone releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regulation Peptide* 20, 91-98.
- Sequeira, T., Tavare, D. & Arala-Chaves, M. (1996). Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus Japonicus*. *Developmental and Comparative Immunology* 20, 97-104.
- Smith, V. J. (1991). Invertebrate Immunology: phylogenetic, ecotoxicological and biomedical implications. *Comparative Haematology International* 1, 61-76.
- Smith, V. J. & Chisholm, J. R. S. (1992). Non-cellular immunity in crustaceans. *Fish and Shellfish Immunology* 2, 1-31.
- Smith, V. J. & Johnston P. A. (1992). Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 101 C (3), 641-649.
- Smith, V. J. & Ratcliffe, N. A. (1978). Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) *in vitro*. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 58, 367-379.
- Smith, V. J. & Ratcliffe, N. A. (1980a). Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.); clearance and distribution of injected test particles. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 60, 89-102.
- Smith, V. J. & Ratcliffe, N. A. (1980b). Cellular defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.): *in vivo* haemocytic and histopathological responses to injected bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology* 35, 65-74.
- Smith, V. J. & Söderhäll, K. (1983a).  $\beta$ , 1-3 glucan activation of crustacean haemocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biological Bulletin* 164, 229-314.
- Smith, V. J. & Söderhäll, K. (1983b). Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. *Cell and Tissue Research* 233, 295-303.
- Smith, V. J., Söderhäll, K. & Hamilton, M. (1984).  $\beta$  1,3-glucan induced cellular defence reactions in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 77, 635-639.
- Smith, V. J., Swindlehurst, R. J., Johnston, P. A. & Vethaak, A. D. (1995). Disturbance of host defence capability in the common shrimp, *Crangon crangon* by exposure to harbour dredge spoils. *Aquatic Toxicology* 32, 43-58.
- Smullen, R. P., Jonathan, A. D. & Pitman, R. M. (1996). Endocrine regulation of the phosphatidylinositol pathway in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*, and the shore crab *Carcinus maenas*. *General and Comparative Endocrinology* 104, 84-91.
- Sneddon, L. U., Taylor, A. C., Huntingford, F. A. & Watson, D. G. (2000). Agonistic behaviour and biogenic amines in shore crabs *Carcinus maenas*. *The Journal of Experimental Biology* 203, 537-545.
- Söderhäll, K. & Cerenius, L. (1992). Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, 2-23.
- Söderhäll, K. & Hall, L. (1984). Lipopolysaccharide-induced activation of

- prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochemical and Biophysica Acta* 797, 99-104.
- Söderhäll, K., Johansson, M. W. & Smith, V. J. (1988). Internal defence mechanisms. In *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. (D. M. Holdich & R. S. Lowery, eds.) pp. 213-235. Croom Held, London.
- Söderhäll, K. & Smith, V. J. (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental and Comparative Immunology* 7, 229-239.
- Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J. P. & Charmantier, G. (1999). Impact of copper on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus* (Decapoda). *Journal of Crustacean Biology* 19, 209-223
- Spanings-Pierrot, C., Soyeux, D., Van Herp, F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E. & Charmantier, G. (2000). Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *General and Comparative Endocrinology* 119, 340-350.
- Stentiford, G. D., Chang, E. S., Chang, S. A. & Neil, D. M. (2001). Carbohydrate dynamics and the crustacean hyperglycemic hormone (CHH): effects of parasitic infection in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*). *General and Comparative Endocrinology* 121, 13-22.
- Tensen, C. P., Janssen, K. P. C. & van Herp, F. (1987). Isolation, characterization and physiological specificity of crustacean hyperglycemic factor from the sinus gland of the lobster *Homarus americanus* (Milne Edwards) *Invertebrate Reproduction and Development* 16, 155-164.
- Tensen, C. P., De Kleijn, D. P. V. & Van Herp, F. (1991). Cloning and sequences analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormones from the lobster, *Homarus americanus*. *European Journal of Biochemistry* 200, 103-106.
- Truscott, R. & White, K. N. (1990). The influence of metal temperature stress on the immune system of crabs. *Functional Ecology* 4, 455-461.
- Van Harreveld, A. (1936). A physiological solution for freshwater crustaceans. *Proceeding of the Society of Experimental Biology and Medicine* 34, 428-432.
- Van Herp, F. & Kallen, J. L. (1991). Neuropeptides and neurotransmitters in the X-organ sinus gland complex, an important neuroendocrine integration centre in the eyestalk of Crustacea. In: *Comparative aspects of neuropeptide function*. (E. Florey & G. B Stefano eds.), pp 211-221. University Press Manchester, Manchester.
- Victor, B. (1993). Responses of haemocytes and gill tissue to sublethal cadmium chloride poisoning in the crab *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 24, 432-439.
- Victor, B. (1994). Gill tissue pathogenicity and hemocyte behavior in the crab *Paratelphusa hydrodromous* exposed to lead chloride. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Environmental Science and Engineering* 29, 1011-1034.
- Webster, S. G. (1996). Measurement of crustacean hyperglycemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *The Journal of Experimental Biology* 199, 1579-1585.
- Wilcockson D. C., Chung, J. S. & Webster, S. G. (2002). Is crustacean hyperglycemic hormone precursor-related peptide a circulating neurohormones in crabs? *Cell and Tissue Research* 307, 129-138.
- Young, J. S. & Pearce, J. B. (1975). Shell disease in crabs and lobsters from New York Bight. *Marine Pollution Bulletin* 6, 101-105.

Zou, E., Du, N. & Lai, W. (1996). The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentration in the blood of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 114, 105-109.