



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova**

Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: SCIENZE BIOMEDICHE VETERINARIE E COMPARATE

CICLO XXI°

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA:

**"HEAT SHOCK PROTEIN 70" E "RODLET CELLS" COME  
POSSIBILI INDICATORI DI  
STRESS IN SPECIE ITTICHE COMUNEMENTE ALLEVATE**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Massimo Morgante

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Giuseppe Radaelli

**Dottorando :** Carlo Poltronieri

## Riassunto:

Scopo di questo progetto di lavoro è stato valutare la possibilità di utilizzare le “heat shock protein” 70 (Hsp70) e le “rodlet cells” (RCs) come parametri idonei alla valutazione dello stato di stress nei pesci, in particolar modo in alcune specie ittiche comunemente allevate. Nella prima parte del lavoro è stata valutata l’espressione delle Hsp70 inducibili e la localizzazione della stessa proteina, sia nella forma inducibile che costitutiva, in larve e avannotti di spigola (*Dicentrarchus labrax*) sottoposti a stress termico. E’ stata valutata anche, in parallelo, l’espressione e localizzazione delle Hsp70 in individui di spigola triploidi (coetanei) allevati nelle stesse condizioni e sottoposti allo stesso tipo di shock termico. I risultati ottenuti tramite RT-PCR confermano, sia per i diploidi che per i triploidi, l’avvenuta espressione della forma inducibile dell’Hsp70 in conseguenza dello stress termico. La localizzazione immunostochimica delle Hsc70 (costitutive) conferma, sia nei diploidi che nei triploidi, la presenza pressoché ubiquitaria della proteina già a partire dai primi stadi di sviluppo e senza alcuna apparente dipendenza dall’esposizione allo stress termico. I tessuti maggiormente interessati dalla presenza della proteina sono, in genere, quelli di natura epiteliale: cute, mucosa del faringe e del tubo digerente. Stranamente non è stata osservata alcuna positività alla forma inducibile delle Hsp70, nonostante i risultati della RT-PCR confermino la presenza del messaggero.

E’ stata, inoltre, analizzata l’espressione della forma inducibile delle Hsp70 in larve, giovanili e adulti di spigola sottoposti a stress da trasporto e parallelamente è stata localizzata la proteina Hsp70 nelle sue due forme, inducibile e costitutiva, negli stessi animali. L’espressione delle Hsp70, analizzato tramite RT-PCR, non rileva differenze qualitative nella produzione del messaggero tra gruppi di controllo e stressati in larve ed avannotti, differenze che, a livello qualitativo, risultano invece apprezzabili negli adulti. L’analisi quantitativa (Real-Time PCR), però, ha permesso di rilevare differenze tra controlli e stressati significative per i giovanili di 80 dph ed appena evidenti per le larve di 40 dph. Mentre, negli adulti, l’espressione del messaggero per le Hsp70 è generalmente più elevata negli stressati che nei controlli. Immunoreattività alle Hsc70 (costitutiva) è stata riscontrata in diversi tessuti appartenenti ad animali in diversi stadi di sviluppo, senza differenze di rilievo tra gli animali sottoposti a stress da trasporto e quelli del gruppo di controllo. Immunoreattività alla forma inducibile delle Hsp70 non è stata riscontrata in alcun tessuto di spigola negli stadi più precoci di sviluppo.

Un esperimento analogo sullo stress da trasporto è stato effettuato successivamente utilizzando adulti di carpa (*Cyprinus carpio*) e trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). In questo caso è stata studiata solo la localizzazione della proteina e non l’espressione del messaggero. Nella carpa immunopositività all’Hsc70 (costitutiva) è stata riscontrata solo a livello della muscolatura rossa, sia nei controlli che negli stressati. Negli individui stressati, invece, è stata per la prima volta localizzata la presenza di Hsp70 (inducibile) nell’epitelio dei tubuli renali, oltre che nella cute e nelle branchie. Nella trota i risultati si rivelano molto simili a quelli evidenziati nella spigola per quanto riguarda le Hsc70, infatti diversi tessuti, sia dei controlli che degli stressati, esibiscono una netta positività.

Nella seconda parte del lavoro è stata valutata la possibilità di utilizzare le RCs come indicatori nei confronti di stress molto comuni nell'allevamento, quali il sovraffollamento e il confinamento. Sono state utilizzate spigole adulte sottoposte a due diverse densità di confinamento (20 Kg/m<sup>3</sup> e 80 Kg/ m<sup>3</sup>) e per due diversi intervalli temporali (2 ore e 24 ore); al termine dell'esperimento è stato valutato il numero di RCs presenti nelle branchie alle diverse condizioni di stress. E' stata inoltre effettuata un'analisi ultrastrutturale delle RCs al microscopio elettronico a trasmissione. Dopo 2 ore di confinamento gli individui mantenuti ad una densità di 80 Kg/m<sup>3</sup> hanno evidenziato un aumento significativo nel numero di RCs, presenti nelle branchie, rispetto agli individui confinati ad una densità inferiore (20 Kg/m<sup>3</sup>). Dopo 24 ore il numero di RCs è aumentato ulteriormente, per entrambe le densità, ma in misura significativamente maggiore negli individui mantenuti ad una densità più elevata. In conclusione, il significativo aumento nel numero di RCs osservato nelle branchie di *D. labrax* già dopo due ore di stress da sovraffollamento, indica che queste cellule sono influenzate dalla densità di allevamento. Inoltre, l'organizzazione in "cluster" a livello di lamelle primarie e secondarie, supporta l'ipotesi che attribuisce alle RCs un ruolo di difesa nei confronti di eventi stressanti. Le RCs in definitiva possono a pieno titolo essere considerate dei validi indicatori nello studio di alcune forme di stress nei pesci.

## **Abstract:**

The aim of this work was to evaluate the opportunity of using “heat shock protein 70” (Hsp70) and rodlet cells (RCs) as useful parameters to assess stressing conditions in fishes, in particular on farmed fishes. In the first part of the work we evaluate the expression of inducible Hsp70 and the localization of the protein in its inducible and constitutive (Hsc70) form in larvae and juveniles of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) submitted to heat stress condition. This study was performed on both diploid and triploid (of the same age) animals. Our RT-PCR results confirmed, for both diploid and triploid, the expression of the inducible form of Hsp70 after heat shock. The immuno-localization of Hsc70 (constitutive) confirmed, in both diploid and triploid, the ubiquitous presence of this protein since the first stages of development, regardless of stressing conditions, in different tissues, mainly of epithelial kind (skin, pharynx and gut). Curiously, no immunopositivity was found about the inducible form of Hsp70, in contrast with RT-PCR results.

Successively, we examined the expression of Hsp70 and the localization of both proteins, Hsp70 and Hsc70, in larvae, fry and adults of sea bass before and after transport. Qualitative RT-PCR analysis revealed expression of inducible HSP70 gene in larvae and fry (25, 40 and 80 days) as well as in adult tissues (liver, brain, muscle, gills, kidney, gonads, heart, spleen and skin) of both control and stressed animals. Expression of inducible HSP70 mRNA examined in different adult tissues by Real-Time PCR, was significantly higher in skin and skeletal muscle of stressed animals than in controls. Immunolocalization of inducible and constitutive forms of heat shock protein 70 (HSP70 and HSC70), reported here for the first time, demonstrated an ubiquitous distribution of HSC70 protein in several tissues of both stressed and control animals (at all stages), while inducible HSP70 protein was found only in skeletal muscle of stressed animals.

In the present work we, also, investigated the cellular localization of constitutive as well as inducible heat shock protein 70 in several tissues of common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to transport stress. In carp, the constitutive form (HSC70) was detected only in red skeletal muscle of both control and stressed animals. In the same species, the inducible form (HSP70) was evident in the epithelia of renal tubules, gills and skin of stressed animals, whereas in controls only red skeletal muscle exhibited an immunopositivity to HSP70 antibody. In trout, immunostaining to HSC70 antibody was found mainly in the epithelia of intestine, gills and skin of both control and stressed animals although the reactivity was generally higher in animals exposed to transport stress. In the same species immunostaining to HSP70 antibody was observed only in red skeletal muscle and epidermis of control animals.

In the second part of the work we investigated about the use of rodlet cells as valuable tools to assess stressing conditions in fish. We focused on the localization of RCs by light and electronmicroscopy in gills of sea bass subjected to different conditions overcrowding. In general, a significant increase in number of rodlet cells has been observed in all animals subjected to overcrowding stress. In gills of control group rare rodlet cells were detected at the level of both primary and secondary lamellae, whereas in

stressed group clusters of rodlet cells have been found in the epithelium of primary and secondary lamellae, indicating that these cells are influenced by stocking density.

## **INDICE :**

<b>1</b>	<b>Introduzione.....</b>	<b>3</b>
1.1	“Fish Welfare” .....	3
1.2	Lo stress nei pesci.....	5
1.2.1	Risposta fisiologica allo stress.....	6
1.2.2	Il sistema simpatico cromaffine.....	7
1.2.3	L'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale (HPI) e la produzione del cortisolo.....	8
1.2.4	Effetti dello stress sulla crescita.....	9
1.2.5	Stress e riproduzione.....	10
1.2.6	Effetti dello stress sul sistema immunitario.....	11
1.3	“Heat shock protein” .....	12
1.3.1	Regolazione ed espressione delle Hsp.....	13
1.3.2	Hsp nei pesci.....	14
1.3.3	Fattori che inducono la produzione di Hsp70.....	16
1.3.4	Hsp e sistema endocrino.....	17
1.3.5	Ruolo delle Hsp durante lo sviluppo.....	19
1.4	“Rodlet cells” .....	21
1.4.1	Ipotesi sulla natura delle “rodlet cells” .....	21
1.4.2	RCs come elementi del sistema immunitario.....	23
1.4.3	Utilizzo delle RCs come “biomarkers” .....	25
<b>2</b>	<b>Scopo della tesi.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Materiali e metodi.....</b>	<b>29</b>
3.1	Hsp70.....	29
3.1.1	Espressione dell'mRNA per la forma inducibile delle Hsp70 e localizzazione immunohistochimica di Hsp70 e Hsc70 in spigole diploidi e triploidi sottoposte a stress termico .....	29
3.1.2	Analisi RT-PCR qualitativa e quantitativa di Hsp70 e localizzazione immunohistochimica di Hsc70 e Hsp70 in spigole sottoposte a stress da trasporto.....	36

3.1.3	Localizzazione immunohistochemical di Hsp70 costitutive e inducibili in carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> ) e trota iridea ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) sottoposte a stress da trasporto.....	42
3.2	“Rodlet cells”.....	43
3.2.1	Influenza dello stress da sovraffollamento e confinamento sul numero di “rodlet cells” nella spigola.....	43
<b>4</b>	<b>Risultati.....</b>	<b>46</b>
4.1	Hsp70.....	46
4.1.1	Espressione dell’ mRNA per la forma inducibile delle Hsp70 e localizzazione immunohistochemical di Hsp70 e Hsc70 in spigole diploidi e triploidi sottoposte a stress termico.....	46
4.1.2	Analisi RT-PCR qualitativa e quantitativa e localizzazione immunohistochemical di Hsp70 in spigole sottoposte a stress da trasporto.....	54
4.1.3	Localizzazione immunohistochemical di Hsp70 costitutive e inducibili in carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> ) e trota iridea ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) sottoposte a stress da trasporto.....	64
4.2	“Rodlet cells”.....	68
4.2.1	Influenza dello stress da sovraffollamento e confinamento sul numero di “rodlet cells” nella spigola.....	68
<b>5</b>	<b>Discussione.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>83</b>

# 1.INTRODUZIONE

## 1.1 “FISH WELFARE”

Negli ultimi anni l'interesse per la tutela del benessere animale, inclusi i pesci, ha coinvolto una larga parte dell'opinione pubblica, creando notevoli pressioni non solo nei confronti degli addetti ai lavori, produttori e parte della comunità scientifica, ma anche negli organi competenti, per la creazione di una legislazione in grado di garantire standard adeguati di “welfare”. La creazione di regole condivisibili pone, come primo obiettivo, la nascita di una definizione comune del significato di “welfare”, nonostante definire un tale concetto risulti per molti aspetti complesso (Dawkins, 1998). I tentativi sono stati molteplici e spesso hanno espresso posizioni determinate da diversi approcci e punti di vista (Huntingford *et al.*, 2006).

Un primo approccio pone come prioritaria la percezione soggettiva, o mentale, dell'individuo. In altri termini, i requisiti per la condizione di benessere nell'animale prevedono che esso sia libero da esperienze negative, quali paura o dolore, e che possa avere accesso ad esperienze positive in accordo con la propria natura, ad esempio: presenza di conspecifici per gli animali gregari. In quest'ottica, quindi, le strategie per garantire il “welfare” non possono prescindere dalle caratteristiche individuali della specie e, nondimeno, dalla capacità dell'uomo di percepire e interpretare lo stato mentale dell'animale.

Un secondo approccio, invece, pone maggiore risalto alle caratteristiche dell'ambiente in cui l'animale viene mantenuto. In questo caso, il benessere viene a coincidere con la garanzia, per l'animale, di trovarsi in un ambiente adatto, che non pregiudichi le capacità di adattamento o di mantenimento delle proprie funzionalità, e, ovviamente, gli permetta di vivere in buone condizioni di salute.

Il terzo punto di vista si basa sulla concezione che il benessere, per un animale, coincida con il poter esprimere a pieno un'esistenza simile a quella che condurrebbe in natura, compresa la capacità di esprimere il proprio naturale comportamento. Questa concezione si basa sul presupposto, non sempre condivisibile, che qualunque cosa, se è “naturale”, debba essere intrinsecamente buona.

Poiché situazioni di sofferenza, cattive condizioni di salute o impossibilità di esercitare il proprio naturale comportamento sono spesso tra loro interconnesse, normalmente i tre punti di vista sopra elencati convergono verso orientamenti comuni (Huntingford *et al.*, 2006).

Ciononostante, il primo approccio rimane forse uno dei più condivisi; soprattutto se ci si riferisce, non tanto all'eventualità che un animale possa essere sottoposto a stati di disagio momentanei, ma a quelle situazioni in cui queste condizioni vengano mantenute per periodi prolungati (Huntingford *et al.*, 2006). Occorre, inoltre, sottolineare che una questione ancora non del tutto risolta è se, e a che livelli di intensità, un animale, ed in particolar modo un pesce, possa provare dolore o sperimentare altre forme di sofferenza (Chandroo *et al.*, 2004; Braithwaite *et al.*, 2004). La capacità, per un organismo, di provare dolore o sofferenza viene normalmente considerata un prerequisito essenziale per porsi degli interrogativi inerenti il proprio benessere e, nel caso dei pesci, questa capacità è stata solo recentemente oggetto di studi (Rose, 2002; Chandroo *et al.*, 2004). Evidenze che nei pesci esiste la possibilità, non solo di distinguere tra esperienze positive e negative, ma anche di memorizzarle per lunghi periodi (Czanyi & Doka, 1993) è da tempo un fatto noto; solo recentemente in letteratura appaiono lavori in cui si dimostra che, diverse specie di pesci, sono in grado di apprendere ed integrare diversi blocchi di informazioni, attraverso un processo più complesso del normale apprendimento associativo (Sovrano *et al.*, 2003). E' quindi difficile escludere che in determinate specie di pesci, ove vi siano processi cognitivi e comportamentali complessi, esperienze che possano indurre sofferenza non vengano percepite come tali (Huntingford *et al.*, 2006).

Da un punto di vista neuro-anatomico le differenze tra l'encefalo dei pesci e quello dell'uomo sono notevoli in termini di struttura e dimensioni (Kotrschal *et al.*, 1998); in particolare il telencefalo è molto poco sviluppato, se paragonato a quello umano, e manca completamente la neocorteccia, che nell'uomo assume un ruolo chiave nell'esperienza soggettiva del dolore (Rose, 2002). Non è, però, da escludere che alcune aree del cervello dei pesci abbiano evoluto capacità omologhe a quelle della neocorteccia dei mammiferi; alcuni studi dimostrano l'effettiva analogia tra alcune funzioni del telencefalo dei pesci e quelle dell'ippocampo dei mammiferi, anche per comportamenti strettamente connessi alla risposta nei confronti di esperienze negative (Broglia *et al.*, 2003; Portavella *et al.*, 2004). Per completare il quadro, alcuni studi provano in maniera chiara che nei pesci esiste anche

una risposta fisiologica e comportamentale al dolore fisico e che questa può essere mitigata dalla somministrazione di morfina (Sneddon, 2003).

Esistono quindi solidi motivi per ritenere che i pesci, perlomeno nella fase adulta, abbiano la capacità di percepire stimoli dolorosi e che questi siano fortemente avversati (Huntingford *et al.*, 2006).

L'opportunità o meno di adottare comportamenti tali da garantire un giusto standard di benessere per i pesci utilizzati nelle attività umane, ha sicuramente delle forti implicazioni inerenti la sfera dell'etica, che non possono essere trattate in questa sede; esistono, però, conseguenze derivanti da una scarsa attenzione per il "welfare", che interessano sia la ricerca scientifica che il mondo produttivo, soprattutto se ci si riferisce al settore dell'acquacoltura. Pesci allevati in condizioni di benessere non adeguate, creano le condizioni per l'instaurarsi, negli animali, di quello che viene definito uno "stato di stress"; esiste in letteratura un'ampia bibliografia su tale argomento, in particolar modo su quali siano le principali cause di stress nei pesci e su come essi reagiscano, da un punto di vista comportamentale e fisiologico, per farvi fronte.

## **1.2 LO STRESS NEI PESCI**

In comune con gli altri vertebrati, i pesci dispongono di un'ampia serie di strategie adattative, comportamentali e fisiologiche, che permettono loro di superare situazioni potenzialmente dannose. Sebbene vi siano numerose differenze tra l'ambiente acquatico e quello terrestre, nonché altre differenze a livello di sistema endocrino dei pesci rispetto a quello dei vertebrati superiori, nel complesso la risposta allo stress avviene secondo modalità molto simili (Wendelaar Bonga, 1997). Esiste un'abbondante letteratura sui fenomeni e sui fattori in grado di indurre condizioni di stress nei pesci, i cosiddetti stressori, ed ancora più abbondanti sono gli studi inerenti le diverse forme di risposta allo stress. Esiste, ad esempio, una risposta comportamentale allo stress, che può essere considerata la più immediata a situazioni di pericolo o disagio di varia natura: fuga da un predatore o conflitti di tipo sociale. Le risposte più comuni implicano cambiamenti nella velocità o direzione del nuoto (Juell & Fosseidengen, 2004) e del "display" (Sutor & Huntingford, 2002). Esistono anche casi di risposte comportamentali provocati da infestazione da parassiti, come ad esempio nel salmone atlantico (*Salmo salar*) (Furevik *et al.*, 1993). Nella maggior parte dei casi, gli stessi stimoli che innescano una risposta di tipo

comportamentale, danno anche inizio alla più complessa risposta fisiologica allo stress, argomento su cui si sono concentrati numerosi studi e che verrà ampiamente trattato nei paragrafi successivi.

### **1.2.1 Risposta fisiologica allo stress**

Cannon, agli inizi del secolo, mise in evidenza che non solo le gravi alterazioni dell'omeostasi, ma anche le situazioni avvertite come potenzialmente dannose e che richiedono la mobilitazione di tutte le energie e le difese dell'organismo, determinano la liberazione di adrenalina e l'attivazione del sistema simpatico. Seyle nel 1936 propose la Sindrome da Adattamento (GAS) come modello descrittivo della reazione allo stress. Secondo tale modello, un individuo sottoposto a stress (allarme), svilupperebbe una risposta adattativa a tale condizione nel tentativo di ripristinare la normale omeostasi fisiologica (adattamento), ma perderebbe tale capacità di adattamento conseguentemente alla prolungata esposizione all'azione nociva dell'agente stressante. Egli nel 1950 per primo definì la risposta allo stress come “la somma di tutte le risposte fisiologiche attraverso le quali un animale tenta di mantenere o ristabilire il normale metabolismo in opposizione a forze fisiche o chimiche”. Secondo la definizione formulata da S.E. Wendelaar Bonga (1997) lo stress è “una condizione nella quale l'equilibrio dinamico dell'organismo animale, chiamato omeostasi, è minacciato o disturbato dall'azione di stimoli intrinseci od estrinseci chiamati stressori, i quali, da un lato producono un effetto che minaccia o disturba l'equilibrio omeostatico, dall'altro promuovono una serie di risposte comportamentali e fisiologiche compensatorie e/o adattative che permettono all'animale di superare il problema”. Se sottoposto a stress cronico intenso l'animale può perdere la propria capacità adattativa, con conseguente diminuzione dello stato di benessere che si tradurrà in una ridotta crescita corporea, nel fallimento riproduttivo e nella minor resistenza agli agenti patogeni. In base alla definizione di stress, quindi, possiamo indicare come stressore o agente stressante qualunque fattore in grado di sfidare il potere omeostatico di un organismo o di minacciarne la sopravvivenza.

In risposta ad uno stressore, il pesce manifesta una serie di cambiamenti a livello biochimico e fisiologico che hanno lo scopo di aumentare la disponibilità ed il consumo di energia.

Tali cambiamenti possono generare effetti immediati e di breve durata (ad esempio sul sistema cardio-respiratorio ed osmoregolatorio), oppure effetti a lungo termine che coinvolgono l'organismo e la popolazione intera.

Queste reazioni allo stress, mediate dal sistema neuro-endocrino, possono essere così riassunte e schematizzate:

- **risposta primaria:** percezione e riconoscimento dell'agente stressante, attivazione del sistema simpatico-cromaffine e dell'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale con conseguente rilascio in circolo di catecolamine e corticosteroidi;

- **risposta secondaria:** effetti immediati provocati dagli stimoli neuroendocrini, quali: aumento della gittata cardiaca, aumento della capacità respiratoria, mobilitazione di substrati energetici e alterazione dell'equilibrio idromineraie;

- **risposta terziaria:** effetti sull'animale quali: cambiamenti del comportamento, inibizione della crescita, della risposta immunitaria, del successo riproduttivo e della capacità di resistere all'azione di ulteriori agenti stressanti.

### 1.2.2 Il sistema simpatico cromaffine

Il sistema simpatico-cromaffine corrisponde al sistema simpatico-surrenomidollare dei mammiferi ed è composto dal sistema autonomo simpatico e dalle cellule cromaffini situate a livello di rene cefalico. Dopo stimolazione simpatica i neuroni adrenergici e le cellule cromaffini, rispettivamente a livello sinaptico e nel sangue, rilasciano adrenalina e noradrenalina (Randall & Perry, 1992). Questi neurotrasmettitori agiscono generando un aumento della glicemia (glicogenolisi) e della pressione sanguigna, della velocità di perfusione branchiale, cerebrale e muscolare, nonché un aumento degli scambi gassosi a livello branchiale. Questa maggior ossigenazione del sangue va però a scapito della capacità osmoregolatoria del pesce, poiché in questa situazione viene favorita l'irrorazione delle lamelle, ma limitata quella dei filamenti branchiali, sede delle cellule a cloruro, ad attività osmoregolatoria. Questo tipo di risposta, seppur immediata e di notevole intensità (picco ematico in 30 sec), è di breve durata in quanto la clearance di questi ormoni nel sangue è molto rapida (< 30 min).

### 1.2.3 L'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale (HPI) e la produzione del cortisolo

L'HPI è l'equivalente del sistema ipotalamo-ipofisi-corticosurrenale dei mammiferi e può essere considerato come uno dei componenti più altamente conservati della risposta allo stress nei vertebrati (Lankford *et al.*, 2003). Esso si basa sull'interazione regolatoria delle cellule secretorie dell'ipotalamo sull'adenoipofisi e sulle cellule interrenali del rene cefalico. Le cellule ipotalamiche, in risposta ad uno stimolo stressante, rilasciano la corticoliberina o CRH, un neuropeptide che va a stimolare le cellule corticotrope dell'adenoipofisi (*pars distalis rostralis*) a produrre ACTH (ormone adrenocorticotropo), che a sua volta attiva la sintesi ed il rilascio di corticosteroidi da parte delle cellule interrenali del rene cefalico.

Il corticosteroide principalmente prodotto nei teleostei è il cortisolo il quale induce cambiamenti fisiologici e metabolici negli organi bersaglio tali da completare e rinforzare l'azione svolta dalle catecolamine. Questi cambiamenti sono meno immediati (picco ematico in 30 min) ma di durata maggiore rispetto alle catecolamine. Ciò suggerisce che il cortisolo giochi un ruolo di fondamentale importanza nel prolungare la risposta allo stress nel tempo, anche dopo la fine dell'azione diretta dell'agente stressante sull'organismo (Vijayan *et al.*, 1994). Si suppone che il sistema simpatico-cromaffine e l'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale siano in stretto rapporto tra di loro. Reid *et al.* (1996), suggeriscono la possibile esistenza nei pesci di un controllo paracrino tra i due sistemi. Ipotesi avvalorata da un recente studio teso a dimostrare che l'ACTH può stimolare anche il rilascio di adrenalina e che un trattamento cronico con il cortisolo può condizionare la sintesi ed il rilascio delle catecolamine nella trota (*Oncorhynchus mykiss*) (Reid *et al.*, 1996).

Il cortisolo è stato trovato per la prima volta nel plasma dei teleostei più di 20 anni fa e sembra essere, in questi animali, lo steroide più importante secreto dal tessuto interrenale. Esso rappresenta l'indicatore di stress più comunemente misurato nel pesce in quanto la sua concentrazione ematica aumenta drasticamente in successione ad eventi stressanti. Sebbene risulti semplice ed accurato determinarne la concentrazione mediante le metodiche RIA (Gamperl *et al.*, 1994), ed ELISA (Barry *et al.*, 1993), in diverse occasioni il dosaggio del cortisolo fornisce dei risultati di difficile interpretazione, non sempre direttamente riconducibili a situazioni di stress. Molteplici fattori possono, infatti, influire sulla sua corretta misurazione, ad esempio, procedure di laboratorio non perfettamente standardizzate (Gamperl *et al.* 1994) o metodiche di campionamento

scorrette (Laidley & Leatherland, 1988; Iwama *et al.*, 1989); la produzione stessa dell'ormone può, inoltre, risentire di alcuni fattori legati alle condizioni dell'animale: cambiamenti alimentari (Bry, 1982; Rance *et al.*, 1982), maturità sessuale e stagione riproduttiva (Pickering *et al.*, 1987), variazioni stagionali e del fotoperiodo (Thorpe *et al.*, 1987).

Tuttavia, un aumento del cortisolo plasmatico è il principale indicatore di stress nel pesce. La concentrazione media basale di cortisolo plasmatico nei pesci varia da valori molto bassi di 5 ng/ml, come nei salmonidi, a valori tra 10 e 50 ng/ml negli altri teleostei (Davis & Parker, 1984), mentre può aumentare di 10-100 volte in conseguenza di uno stress acuto (Barton & Iwama, 1991).

Branchie, intestino e fegato rappresentano i principali organi bersaglio del cortisolo nei pesci, nei quali si esplicano i due ruoli più importanti dell'ormone: regolazione del bilancio idrico ed elettrolitico e regolazione del metabolismo glucidico e proteico. Per questo motivo possiamo affermare che il cortisolo svolga sia un'azione glucocorticoide che mineralcorticoide. A queste si aggiungono altre attività secondarie del cortisolo, quali l'effetto inibitorio sulla crescita, sul successo riproduttivo e sull'efficacia del sistema immunitario.

#### **1.2.4 Effetti dello stress sulla crescita**

Intense condizioni stressanti sono in grado di provocare nei pesci significative modificazioni del metabolismo energetico.

Lo stress provoca un adattamento ed una redistribuzione dell'energia a favore di attività quali il ripristino dell'omeostasi, la respirazione, il movimento; contemporaneamente si assiste spesso ad una diminuzione della crescita del pesce, in conseguenza ad un calo nell'assunzione del cibo e nell'indice di assimilazione e conversione degli alimenti (Gregory & Wood, 1999). La ridotta capacità di assimilazione è probabilmente una conseguenza delle lesioni intestinali provocate dall'evento stressante. Recenti studi condotti su gruppi di trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*) hanno evidenziato che uno stress acuto di 15 minuti causa danneggiamenti a livello ultrastrutturale della mucosa intestinale, caratterizzati da un significativo allargamento delle tight junction tra gli enterociti dell'intestino medio, un aumento della permeabilità paracellulare entro 4 ore dallo stress ed una diminuzione della flora microbica di adesione intestinale, con conseguente aumento della possibilità per l'individuo di contrarre

infezioni batteriche (Olsen *et al.*, 2005). Lo stress aumenta la velocità delle reazioni metaboliche, necessarie per la sintesi e mobilitazione del glucosio, come evidenziato da Rice (1990) nel persico trota (*Micropterus salmoides*), nel quale un aumento del 10% della velocità metabolica riduce il tasso di crescita del 22%, un aumento del 20% causa una riduzione del 42%. Da considerare anche che la crescita corporea è sotto il controllo endocrino di diversi ormoni, tra i quali il più importante è il GH. Non è ancora chiaro come lo stress condizioni la sintesi di tale ormone, in quanto studi condotti su specie diverse hanno dimostrato sia l'effetto stimolante la sintesi dell'ormone, sia l'effetto inibente da parte del cortisolo (Björnsson *et al.*, 2002; Yada *et al.*, 2005).

### **1.2.5 Stress e riproduzione**

Una riduzione delle performance riproduttive è un fenomeno comune associato allo stress in tutti i vertebrati (Moberg, 1985), compresi i pesci (Barton & Iwama, 1991), questo perché il processo di redistribuzione dell'energia va a coinvolgere le attività che non sono di fondamentale importanza per la sopravvivenza dell'individuo sottoposto allo stress, quali ad esempio la riproduzione. Lo sviluppo delle gonadi e la gametogenesi sono sotto il controllo dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (Nagahama *et al.*, 1995); alti livelli di cortisolo, durante lo stress, possono esercitare un effetto inibitore su tale asse: i livelli di testosterone e di  $17\beta$ -estradiolo, ad esempio, diminuiscono un'ora dopo la cattura nelle femmine di *Chrysophrys auratus* (Carragher, 1991) e 24 ore dopo la cattura nella trota iridea (Pankhurst *et al.*, 1994). Durante uno stress acuto e cronico inoltre, i corticosteroidi causano una riduzione di androgeni ed estrogeni plasmatici in molti teleostei (Pankhurst *et al.*, 1995), ma non in tutti, confermando anche in questo caso una elevata variabilità specie specifica. Altri studi hanno evidenziato che nelle trote immature il cortisolo porta ad un aumento della capacità di legame dell'estradiolo con le sue proteine di trasporto e ad una concomitante riduzione del legame dell'ormone nel fegato: questo probabilmente sta a significare che esso non inibisce la secrezione di estradiolo ma ne riduce l'attività biologica (produzione di vitellogenina), stimolando la produzione delle proteine trasportatrici (Pottinger & Pickering, 1990).

### 1.2.6 Effetti dello stress sul sistema immunitario

La capacità che lo stress e i corticosteroidi hanno di influenzare e modulare il sistema immunitario sono da tempo ben note per i mammiferi e molte analogie sono state riscontrate anche nei pesci. Per esempio, diversi studi hanno messo in evidenza che lo stress o somministrazioni di cortisolo abbassano le capacità di resistere ad infezioni da batteri e funghi patogeni (Maule *et al.*, 1989; Pickering *et al.*, 1989). Si è visto che somministrazioni adeguate di cortisolo sono in grado di indurre deficit linfocitari (Pickering, 1984; Pulsford *et al.*, 1994) e contemporaneamente un aumento di neutrofili e macrofagi (Pulsford *et al.*, 1994). Il cortisolo, inoltre, esercita il suo effetto inibitorio sul sistema immunitario impedendo sia la trasformazione di plasmacellule in linfociti B, produttori di anticorpi, sia il rilascio o la sintesi di citochine, necessarie a stimolare la produzione di anticorpi (Kaattari e Tripp, 1987). Questo ormone sembra anche indurre l'apoptosi in linfociti B di carpa (Weyts, 1998). Occorre tenere presente, però, che l'effetto depressivo del cortisolo sulla risposta immunitaria dipende sia dalla concentrazione del cortisolo, sia dalla durata dello stress. In un altro studio sugli effetti di alte dosi di cortisolo sulla risposta immunitaria cellulare innata nell'orata (*Sparus aurata*), si è dedotto che solo dosi farmacologiche di cortisolo, per tempi molto prolungati, causano un'evidente azione depressiva sui leucociti (Esteban *et al.*, 2004).

### 1.3 “HEAT SHOCK PROTEIN”

Un organismo soggetto a stress metabolico od ambientale reagisce con dei cambiamenti che coinvolgono l'individuo anche a livello cellulare e molecolare. Questa reazione prevede la sintesi di particolari proteine dello stress quali: l'enzima citocromo P450, le metallotioneine e le heat shock protein (Hsp). In particolare, la sintesi di queste ultime è stata studiata principalmente come risposta cellulare a stress di tipo termico.

Le Hsp sono una famiglia di proteine altamente conservate a livello cellulare (Feder & Hofmann, 1990; Morimoto *et al.*, 1990; Welch, 1993), espresse in risposta a diversi tipi di stressori, biotici ed abiotici in grado di provocare alterazioni strutturali e funzionali delle proteine cellulari. Le Hsp infatti hanno il compito di garantire il corretto ripiegamento delle proteine nella loro struttura e di facilitarne il trasporto all'interno dei compartimenti cellulari; hanno, inoltre, un ruolo fondamentale nell'interazione tra gli ormoni steroidei e i loro recettori (Welch, 1993) e inducono termo tolleranza contro forti stress termici (Mosser & Bools, 1998). La scoperta delle Hsp è spesso attribuita a Ritossa che, nel 1962, le rinviene in cellule salivari del moscerino della frutta, *Drosophila busckii*, in conseguenza di uno shock termico. In seguito a questa scoperta numerosi studiosi si interessarono alle Hsp, evidenziando l'espressione di queste proteine anche nel tessuto nervoso, nei tubuli del Malpighi e nelle ali della mosca (Tissieres *et al.*, 1974), nei fibroblasti dell'embrione di pollo (Kelly e Schlesinger, 1978), in *Escherichia coli* (Lemeux *et al.*, 1978; Yamamori *et al.*, 1978), nei lieviti (McAlister & Finkelstein, 1980) e nelle piante (Barnett *et al.*, 1980).

Dall'mRNA delle Hsp70, è stato possibile risalire ai geni e alle sequenze nucleotidiche codificanti tali proteine; si è scoperto che queste hanno una composizione aminoacidica che per larga parte è costante e uguale nei diversi organismi esaminati: ad esempio l'Hsp70 di *E. Coli* possiede fino al 57% di aminoacidi in comune con l'Hsp70 umana (Gupta e Golding, 1993).

Le Hsp vengono classificate in base al loro peso molecolare (kilodalton, kDa), determinato mediante elettroforesi. Ne risulta una distinzione delle Hsp in tre famiglie principali:

- **Hsp 70**, di peso compreso tra 68-73 kDa: assistono la sintesi della catena polipeptidica e garantiscono il corretto ripiegamento della struttura proteica, agiscono come chaperon molecolari e mediano alla riparazione o alla degradazione di proteine alterate o denaturate.

- **Hsp90**, di peso compreso tra 85-90 kDa: svolgono un ruolo di sostegno tra alcuni componenti del citoscheletro e gli enzimi ed i recettori per gli ormoni steroidei.
- **Hsp a basso peso molecolare**, di peso compreso tra 16-47 kDa: hanno diverse funzioni che sono specie-specifiche ed è stato proposto che esse agiscano da chaperon molecolari e impediscano l'aggregazione proteica irreversibile.

Nei pesci, come nei mammiferi, le Hsp sono normalmente presenti nelle cellule nella forma costitutiva (Hsc), con il compito di regolare il metabolismo proteico e l'omeostasi cellulare (Fink & Goto, 1998), e nella forma inducibile (Hsp), la cui espressione a livello cellulare è evidenziabile in conseguenza di uno stress acuto (Morimoto *et al.*, 1990; Yamashita *et al.*, 2004). Diversamente dalle altre le Hsp a basso peso molecolare sembrano non avere una funzione costitutiva, in quanto sono indotte solamente dopo un evento stressante (Ciocca *et al.*, 1993). Sebbene queste proteine abbiano un'emivita relativamente molto breve (6-9 h in drosofila) il loro livello rimane elevato nell'organismo anche molto tempo dopo l'allontanamento dello stressore. E' per questo motivo che si è ipotizzato un ruolo importante delle Hsp nell'adattamento a lungo termine degli animali all'ambiente (Parsell & Lindquist, 1993; Morimoto & Santoro, 1998).

### 1.3.1 Regolazione ed espressione delle Hsp

Si ritiene che l'espressione delle Hsp avvenga in conseguenza del legame di un fattore per la trascrizione dell'Hsp attivato (HSF), con particolari regioni promoter chiamate HSE (heat shock element) situate vicino ai geni codificanti per l'Hsp. La maggior parte di questi geni non contiene introni, per cui l'mRNA può essere immediatamente tradotto in proteine entro pochi minuti dall'esposizione allo stressore. Esistono in natura diversi HSF, ma solo un tipo, l'HSF1, regola i geni per l'Hsp (Baler *et al.*, 1993). L'HSF1 è un monomero o un eterodimero complessato con l'Hsp70 nel citosol delle cellule non stressate (Baler *et al.*, 1992; Rabindran *et al.*, 1994). Lo stressore provoca la trasformazione dell'HSF1 dalla sua forma inattiva alla forma attiva, con conseguente sintesi della proteina Hsp70. Tuttavia non è chiaro il meccanismo attraverso il quale lo stress "attivi" l'HSF1 né come la cellula possa percepire il segnale di stress.

Morimoto e collaboratori (1996) hanno proposto il modello della proteotossicità, basato sull'evidenza sperimentale che proteine estranee o denaturate risultano essere potenti

induttori di sintesi delle Hsp. Secondo questo modello un agente stressante provocherebbe la denaturazione di determinate proteine cellulari e le Hsp70 interverrebbero nei meccanismi preposti alla loro riparazione. La conseguenza sarebbe una diminuzione della disponibilità citosolica delle Hsp70 tale da indurre il rilascio delle Hsp70 complessate con l'HSF1. Una volta libero l'HSF1 si trasferirebbe nel nucleo dove muterebbe dallo stato monomero allo stato trimerico a sua volta in grado di legarsi alle zone promoter del gene per l'Hsp. Qui rimarrebbe legato ma in forma inattiva: solo la fosforilazione indotta dallo stress attiverebbe il fattore HSF1 e quindi la sintesi di Hsp70. Questo processo sarebbe in grado di autoregolarsi, in quanto un'elevata disponibilità di Hsp70 favorirebbe un loro legame con l'HSF1 e un successivo distacco di quest'ultimo dalla zona promoter, interrompendo quindi la sintesi di Hsp.

Sono state formulate diverse ipotesi inerenti i meccanismi di trasduzione del segnale indotto dallo stress ed in grado di regolare la sintesi delle Hsp. Voellmy, nel 1996, ipotizzò un ruolo importante della variazione nei potenziali redox della cellula, quale elemento di regolazione nella produzione di Hsp. Calderwood *et al.*, nel 1993 indicarono l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare e la stimolazione di alcuni enzimi (fosfolipasi C e A2) come secondi messaggeri importanti nella trasduzione del segnale. Bensaude nel 1996 ipotizzò che cambiamenti fisici della membrana plasmatica (elasticità e fluidità) potessero essere coinvolti nella sintesi di Hsp. Nonostante vi siano numerose ipotesi, il meccanismo attraverso il quale la cellula "riconosce" lo stato di stress, e traduce tale segnale in reazioni che portano alla sintesi proteica, non è ancora del tutto chiaro.

### **1.3.2 Hsp nei pesci**

Sanders (1993), in una sua recensione, indica la presenza di queste proteine in molti organismi acquatici, anche filogeneticamente molto distanti, quali alghe, protozoi, cnidari, rotiferi, nematodi, molluschi, artropodi, echinodermi e pesci. Numerosi dati suggeriscono il possibile utilizzo delle Hsp quali indicatori biologici di stress nei pesci, ciononostante il rapporto tra evento stressante e produzione di Hsp risulta molto variabile e dipendente da numerosi fattori, quali ad esempio: la natura dell'agente stressante, il tipo di tessuto (Smith *et al.*, 1999; Rabergh *et al.*, 2000), la famiglia di Hsp considerata (Smith *et al.*, 1999), la specie in esame (Basu *et al.*, 2001), lo stadio di sviluppo (Santacruz *et al.*, 1997) e il periodo stagionale (Fader *et al.*, 1994).

L'Hsp più studiata nei pesci è l'Hsp70. Le linee cellulari principali nelle quali è stato possibile evidenziare l'espressione di Hsp, successivamente all'esposizione a diversi stressori, sono: epatociti, cellule renali, gonadiche, embrionali, cellule delle pinne caudali, epiteliali ed ovariche. Gli studi poi, condotti sull'intero animale sottoposto a stress hanno evidenziato la presenza di diverse classi di Hsp in branchie, fegato, cuore, eritrociti, muscolo scheletrico, cervello, porzione anteriore del rene. Anche l'Hsc70, è stata trovata in diversi tessuti: fegato, cuore, branchie e muscolo scheletrico di cellule non stressate (Boone & Vijayan, 2002), ma il suo ruolo nella risposta cellulare allo stress è meno chiaro.

La sequenza genomica dell'Hsp70 costitutiva (Hsc70) è stata codificata in *Rivulus marmoratus* (Park *et al.*, 2001) e in trota iridea (Zafarullah *et al.*, 1992). Come nei mammiferi, il gene codificante per l'Hsc70 nei pesci contiene otto introni. Lim e Brenner (1999) identificarono nel genoma del pesce palla (*Fugu rubripes*) 5 geni codificanti per l'Hsp70 inducibile privi di introni. Questi geni, molto simili tra loro (94% di omologie a livello aminoacidico) presentavano, a monte, delle regioni analoghe, suggerendo l'ipotesi di un loro controllo comune. Differenze evidenziate a livello delle regioni promoter inducono però a ritenere che esista anche un controllo di tipo tessuto-specifico o stressore-specifico.

La struttura completa del gene per l'Hsp70 è stata ricavata dall'analisi del DNA di trota iridea (Kothary *et al.*, 1984), *Oryzias latipes* (Arai *et al.*, 1995), *Danio rerio* (Lele *et al.*, 1997), pesce palla (Lim & Brenner, 1999) e tilapia (Molina *et al.*, 2000). Il gene codificante per l'Hsp70 nel pesce presenta una zona promoter costituita da tre copie dell'HSE (CNNGAANN TTCNNG; Bienz & Pelham, 1987). L'HSE è in grado di legare l'HSF in modo tale da avviare la sintesi di Hsp. Il gene codificante l'Hsp70 non contiene introni: in questo modo l'RNA messaggero (mRNA) può essere rapidamente tradotto nella proteina, entro pochi minuti dall'esposizione all'agente stressante.

Non risulta ancora molto chiaro il meccanismo di regolazione dell'espressione genica dell'Hsp. Alcuni studi hanno evidenziato che la sintesi di Hsp è ridotta in presenza di bassi livelli di ATP nella cellula (Currie *et al.*, 1999). L'utilizzo di inibitori della trascrizione quali l'actinomicina D ha fornito elementi tali da far ritenere il processo di trascrizione come fondamentale per il controllo sulla sintesi della proteina (Heikkila *et al.*, 1992; Currie & Tufts 1997; Fink & Goto, 1998). Sembra inoltre che un fattore HSF1 simile a quello dei mammiferi sia coinvolto nell'induzione dell'espressione dell'mRNA per l'Hsp70 in trota iridea (Airaksinen *et al.*, 1998). Nel 2000 Rabergh *et al.* sono riusciti a clonare questo

fattore di trascrizione in *Danio rerio* e *Lepomis macrochirus* scoprendo l'esistenza di diversi fattori di trascrizione in una stessa specie ed in specie diverse. In un altro studio sulla trota iridea si è dimostrato l'esistenza, in questa specie, di due distinti geni per HSF1 coespressi in numerosi tessuti: l'HSF1a e l'HSF1b. Questi fattori sono in grado di legarsi tra loro in varie combinazioni formando diversi eterotrimeri, responsabili ognuno di una diversa risposta tissutale allo shock termico (Airaksinen *et al.*, 1998).

### 1.3.3 Fattori che inducono la produzione di Hsp70.

**Fattori abiotici.** Diversi studi hanno dimostrato che lo stress termico è il principale fattore abiotico in grado di provocare un aumento della sintesi di Hsp70, inducibili e costitutive, in linee cellulari (Kotary & Candido, 1982), colture cellulari primarie (Koban *et al.*, 1987; Curie *et al.*, 1999; Sathya *et al.*, 2001) e tessuti animali (Dubeau *et al.*, 1998; Ackermann *et al.*, 2000) di diverse specie ittiche quali: trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*); (Zafarullah *et al.*, 1992), salmone atlantico (*Salmo salar*); (Pan *et al.*, 2000), salmone reale (*Oncorhynchus tshawytscha*; Heikkila *et al.*, 1992), *Fundulus heteroclitus* (Koban *et al.*, 1991), pesce gatto (*Ictalurus punctatus*); (Koban *et al.*, 1987), sogliola limanda (*Pleuronectes americanus*); (Brown *et al.*, 1992). Recentemente è stato dimostrato che la sintesi di Hsp70 può essere indotta anche da stress di tipo osmotico, nel salmone atlantico (Smith *et al.*, 1999), e dall'esposizione delle cellule a contaminanti ambientali quali ad esempio gli idrocarburi aromatici policiclici (Vijayan *et al.*, 1998), i pesticidi (Hassanein *et al.*, 1999), l'arsenico e numerosi metalli pesanti come il rame, lo zinco ed il mercurio (Sanders *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1996; Duffy *et al.*, 1999).

**Fattori biotici.** Meno noti sono gli effetti dei fattori biotici sull'espressione delle Hsp. Kagawa *et al.*, (1999) riporta che i livelli di Hsp70 aumentano significativamente nel cervello di pesce rosso (*Carassius auratus*) allevato in presenza di un predatore.

Nei mammiferi è chiaro come le Hsp siano coinvolte nella risposta immunitaria conseguente all'esposizione ad un agente patogeno (Young, 1990). Cho *et al.*, (1997) per primi osservarono un aumento della sintesi di Hsp90 in cellule di pesce esposte al virus dell'IHNV ("haematopoietic necrosis virus"). Forsyt *et al.* (1997) evidenziarono un aumento della sintesi dell'Hsp70 in tessuto epatico e renale di salmone argentato infetto con *Renibacterium salmoninarum*, responsabile della malattia batterica renale cronica nei salmonidi. Ackerman e Iwama (2001) osservarono un aumento della sintesi di Hsp70 in

fegato e rene di trota iridea infettata con *Vibrio anguillarum*. Al contrario Deane e Woo (2005) evidenziarono una forte diminuzione della espressione di Hsp70 e Hsc70 in rene e fegato di *Rhabdosargus sarba* durante una vibriosi.

Esistono molteplici spiegazioni riguardanti il possibile rapporto tra il sistema immunitario e l'espressione delle Hsp nei pesci. Alcuni agenti patogeni, probabilmente rilasciando sostanze citolitiche, provocano un danneggiamento delle diverse componenti cellulari tale da indurre la sintesi di Hsp. Si è scoperto che anche cellule del sistema immunitario, quali i macrofagi e i granulociti, possono rilasciare sostanze come peptidi cationici, lisozima e citochine, che sono potenti induttori della sintesi di Hsp (Jacquier-Sarlin, 1994). Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che molte cellule del sistema immunitario riconoscono i peptidi legati alle cellule tumorali quando questi sono complessati con l'Hsp70 (Blachere *et al.*, 1993). Le Hsp, inoltre, sembrano essere parte integrante del complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (MCH-II); si ritiene quindi che tali proteine abbiano un ruolo fondamentale nella fase di presentazione dell'antigene (Bachelt, 1998). Alle Hsp è attribuita anche la funzione di sostenere e proteggere le cellule fagocitiche, sia riparandone eventuali danni, sia proteggendole dall'autolisi o dall'apoptosi, causata dai processi di auto-ossidazione ad opera delle cellule del sistema immunitario (Maridonneau-Parini, 1993; Polla *et al.*, 1995).

#### **1.3.4 Hsp e sistema endocrino**

Esistono numerose interazioni tra le Hsp e gli ormoni coinvolti nei processi fisiologici correlati con la risposta allo stress (cortisolo ed adrenalina), la crescita (GH, T4, IGF-1) e l'osmoregolazione (prolattina e cortisolo). Sembra, inoltre, che tali ormoni esercitino un importante ruolo nella regolazione della sintesi delle Hsp nei pesci (Deane *et al.*, 1999; Iwama *et al.*, 1999; Sathiyaa *et al.*, 2001).

Il cortisolo esercita sicuramente un ruolo nella sintesi delle Hsp, anche se i meccanismi di azione non sono del tutto chiari, anzi, in alcuni casi sembra addirittura avere effetti contrapposti. Alcuni studi hanno dimostrato che elevati livelli di cortisolo possono inibire la sintesi di Hsp30 in branchie di *Oncorhynchus clarki* (Ackerman *et al.*, 2000), di Hsp70 in epatociti e branchie di trota iridea (Basu *et al.*, 2001), di Hsp70 in branchie di tilapia del Mozambico e di RNA messaggero per l'Hsp90 in colture primarie di epatociti di trota iridea (Sathiyaa *et al.*, 2001). Al contrario, un'altra ricerca ha evidenziato che uno stress

cronico, accompagnato ad alti livelli di cortisolo plasmatico, è in grado di stimolare la sintesi di Hsc70 ed Hsc90 in epatociti di trota iridea (Vijayan, *et al.*, 2003). Questo meccanismo, probabilmente, è alla base di una strategia adattativa dell'organismo, sviluppatasi nel tentativo di aumentare la tolleranza ad una condizione di stress periodica. Basu *et al.* (2003), hanno evidenziato la presenza di un legame funzionale e strutturale tra l'Hsp70 ed il recettore per gli ormoni steroidei in trota iridea. Sono stati condotti numerosi studi per comprendere la natura del complesso cortisolo-recettore glucocorticoide-Hsp. Pratt e Welsh, nel 1994 dimostrarono che la funzione, l'assemblaggio ed il trasporto del recettore per i glucocorticoidi dipendevano dall'associazione tra l'Hsp56, l'Hsp70 e l'Hsp90. Da questi studi è risultato che l'Hsp70 e l'Hsp90 agiscono in modo coordinato nei meccanismi di protezione del recettore dell'ormone steroideo, l'Hsp70 nel mantenimento della struttura recettoriale, l'Hsp90, secondo Whitesell e Cook (1996) protegge il recettore dalla sua degradazione; l'Hsp56, invece, ha un ruolo importante nel trasporto del complesso recettoriale attivato all'interno del nucleo. In assenza delle Hsp il recettore per gli steroidi è in grado comunque di legare l'ormone specifico, ma in presenza di Hsp tale capacità e l'emivita del recettore stesso sono maggiori ed è più rapido il trasporto del complesso ormone-recettore all'interno del nucleo della cellula (Pratt & Welsh, 1994; Smith, 1998).

La sensibilità di una cellula e di un tessuto ad un segnale ormonale dipende dalla stabilità del complesso recettoriale dell'ormone, dall'affinità del ligando per il recettore e dal numero di recettori specifici per l'ormone in questione (Yaoita & Brown, 1990). Elevati livelli di cortisolo nel pesce autoregolano il numero di recettori per i glicocorticoidi (Pottinger, 1990). Livelli eccessivamente alti di cortisolo invece inibiscono la sintesi di Hsp70 ed incoraggiano la dissociazione di tali proteine dal complesso recettoriale, forse allo scopo di proteggere l'organismo dagli effetti nocivi dei corticosteroidi stessi (Munk *et al.* 1984) o forse per aumentare la quota di Hsp70 circolante, che viene resa così disponibile per il mantenimento dell'omeostasi cellulare (Basu *et al.*, 2002). Dopo che il cortisolo si è legato al recettore, infatti, l'Hsp70 viene spiazzata dal complesso recettoriale (Pratt, 1993), e così libera può agire ed autolimitare la propria sintesi attraverso un feedback negativo (Morimoto *et al.*, 1992). Questo modello ipotetico, proposto da Basu *et al.* (2002), richiede ulteriori studi e validazioni. Anche durante lo sviluppo dell'organismo sono state osservate variazioni nella concentrazione dei recettori steroidei e nella loro affinità per l'ormone, evidenziando come la sensibilità dei tessuti vari in rapporto ai diversi

stadi di vita dell'animale (Shrimpton & McCormick, 2002). La densità dei recettori per i glicocorticoidi, presenti a livello dei neuroni olfattori nel salmone rosso (*Onchoryncus nerka*) sessualmente maturo, è decisamente maggiore che nel pesce immaturo (Carruth *et al.*, 2000).

Altri ormoni sembrano condizionare l'espressione delle Hsp nei pesci. Deane *et al.* (1999), osservarono che la somministrazione esogena di GH e prolattina provocava una diminuzione dei livelli di mRNA per l'Hsp70 (42% e 54% rispettivamente) e della sintesi di Hsp70 (76% e 64% rispettivamente) in *Rhabdosargus sarba*. Studi successivi hanno dimostrato che la sulpiride (un prolattina-stimolante) determina una inibizione della sintesi di Hsp70, mentre la bromocriptina (un prolattina-inibente) induce la sintesi di Hsp70 in *Rhabdosargus sarba*, suggerendo l'ipotesi di un possibile controllo da parte della prolattina sui livelli di Hsp70 nel pesce (Deane *et al.*, 2000). Inoltre, considerando che i ratti ipofisectomizzati non mostrano l'espressione del gene codificante per l'Hsp70 in risposta ad uno stress termico e che la somministrazione di ACTH agli stessi ratti induce l'espressione dell'Hsp70 a livello di surrenale (Blake *et al.*, 1991), è possibile ipotizzare l'esistenza di un rapporto funzionale tra l'espressione dell'Hsp70 e l'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale.

### **1.3.5 Ruolo delle Hsp durante lo sviluppo**

Studi comparativi su organismi modello, come *Xenopus* o *Drosophila*, indicano che le Hsp, durante l'embriogenesi, hanno probabilmente un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'organismo, piuttosto che nel mantenimento della struttura proteica (Morange, 1997).

Deane e Woo, nel 2003, studiarono il profilo ontogenetico delle Hsp70 e Hsp90 in larve di *Sparus sarba*. Essi evidenziarono un aumento dell'RNA messaggero per l'Hsp70 solo dopo 14 "days post hatch" (dph) e un forte aumento tra 1-7 dph dell'espressione dell'Hsp90. Probabilmente, nelle prime fasi di sviluppo, l'Hsp70 ha un ruolo meno importante rispetto l'Hsp90. Il parallelismo tra l'aumento della sintesi di Hsp90 e l'aumento della concentrazione del cortisolo, avvalorata l'ipotesi che questa proteina, anche in queste prime fasi di sviluppo, sia fondamentale nel proteggere il recettore del glucocorticoide dalla degradazione. Risulta tuttavia evidente il ruolo fondamentale delle Hsp70, costitutiva ed inducibile, in organismi sottoposti a stress di vario tipo. Studi sui primi stadi di sviluppo embrionale in *Brachydanio rerio*, hanno dimostrato che due geni

codificanti per l'Hsp70 (Hsp70-4 e Hsp70-7) non erano espressi in individui mantenuti alla temperatura di controllo di 28,5°C, mentre lo erano in esemplari sottoposti a stress termico ad una temperatura di 37°C (Krone *et al.*, 1997). Lele *et al.* (1997), dimostrarono che, in *B. rerio*, i livelli basali di Hsp70 durante l'embriogenesi rimangono bassi, ma aumentano significativamente quando gli animali sono sottoposti a vari tipi di stress. Santacruz *et al.* (1997), scoprirono che l'Hsc70 nell'embrione di *B. rerio* è di derivazione materna. Essi, inoltre, studiarono nella stessa specie, l'espressione del gene codificante per l'Hsc70 nell'embrione in via di sviluppo e scoprirono che tale gene era presente, e che la sintesi di Hsc70 aumentava in seguito all'esposizione ad uno stress, in modo particolare durante la somatogenesi e la neurogenesi.

## 1.4 “RODLET CELLS”

Per oltre un secolo, istologi e patologi operanti nel campo della morfologia dei pesci, hanno cercato di determinare l'origine e la funzione di cellule dall'aspetto enigmatico: le cosiddette “rodlet cells” (RCs). Caratteristiche distintive di questa tipologia cellulare sono una peculiare parete cellulare e cospicue inclusioni citoplasmatiche di forma clavata o bastoncellare, chiamate “rodlet” (bacchetta), da cui prendono il nome. Il primo a descriverle fu Thélohan nel 1892, il quale le ritenne in tutto e per tutto dei parassiti. Pochi anni dopo Laguesse (1895) suggerì che queste cellule fossero uno stadio di un parassita appartenente al gruppo degli sporozoi, a causa della spessa parete e delle inclusioni citoplasmatiche simili a quelle che caratterizzano questo gruppo parassitario, tanto che diede loro il nome di *Rhabdospora thelohani*. Le RCs furono in seguito ritrovate e descritte in un'ampia gamma di tessuti di diverse specie di teleostei, sia marini che d'acqua dolce (Leino, 1974, 1982; Morrison & Odense, 1978; Barber *et al.*, 1979; Dezfuli *et al.*, 1998, 2000, 2002, 2003a, b). I tessuti che più spesso sono interessati dalla presenza di RCs sono quelli che presentano componenti epiteliali, ad esempio: cute (Iger & Abraham, 1997), branchie (Leino, 1974; Barber *et al.*, 1979; Dezfuli *et al.*, 2003a), intestino (Paterson & Desser, 1981; Dezfuli *et al.*, 1998, 2003b), tubuli renali (Leino, 1996; Kramer & Potter, 2002) ed endotelio (Smith *et al.*, 1995a, b; Koponen & Myers, 2000; Manera *et al.*, 2001). La maggior parte delle pubblicazioni hanno come oggetto le RCs nella loro fase matura, ma sono state descritte in alcuni casi anche forme immature di queste cellule (Iger & Abraham, 1997; Dezfuli *et al.*, 1998; Kramer & Potter, 2002). Nella loro fase immatura le RCs hanno forma ovale, un nucleo di grandi dimensioni eucromatico, abbondante reticolo endoplasmatico ruvido e mitocondri piccoli e allungati. Con la maturazione, nella cellula si inspessisce la capsula, di natura fibrillare, sottostante la membrana plasmatica (Dezfuli *et al.*, 1998, 2003b).

### 1.4.1 Ipotesi sulla natura delle “rodlet cells”

A partire dalla loro scoperta, l'ipotesi che le RCs avessero natura parassitaria fu mantenuta per molto tempo da parecchi autori e gli argomenti a favore di questa ipotesi furono molteplici. Innanzitutto il loro numero sembrava variare moltissimo da individuo a individuo e, spesso, in alcuni esemplari di una stessa specie erano addirittura assenti; la loro presenza era riscontrabile in tessuti diversi, anche di una stessa specie; da un punto di

vista morfologico, la presenza di una spessa parete e di inclusioni simili a quelle degli sporozoiiti sembravano completare il quadro. Mayberry *et al.* (1979) classificarono le RCs come parassiti appartenenti agli Apicomplexa, basando le proprie teorie su osservazioni dell'ultrastruttura al microscopio elettronico. Poco dopo, però, Paterson & Dessler (1981), sulla base di osservazioni ultrastrutturali personali, smentirono questa ipotesi; essi, infatti, non trovarono evidenza del tipico vacuolo che circonda esternamente le cellule parassitarie, quando queste si insediano nella cellula ospite; inoltre, non solo le RCs non erano ancora state mai osservate in ambito intracellulare (insolito per un appartenente agli Apicomplexa), ma era stata chiaramente evidenziata la presenza di giunzioni complesse tra le RCs e le cellule confinanti. La teoria di Mayberry si basava anche sulla convinzione che la zona apicale delle RCs fosse un vero e proprio complesso apicale, struttura che caratterizza i membri degli Apicomplexa, pur non essendo presenti due componenti fondamentali di questo complesso: l'anello polare e il conoide. In tutte le indagini ultrastrutturali condotte negli anni successivi, queste componenti non sono mai state evidenziate, rendendo, quindi, improbabile ogni identificazione con la struttura parassitica. Da osservazioni effettuate sia in microscopia elettronica che in microscopia ottica risultava, inoltre, che l'orientamento delle RCs fosse sempre direzionato verso la parte luminale o apicale degli epitelii, mentre la migrazione tipica di un organismo parassita è opposta, dall'epitelio verso gli strati più profondi e sistemici (Fujioka & Aikawa, 2002).

Le teorie sull'origine esogena delle RCs iniziarono, quindi, a vacillare; per un certo periodo si ipotizzò anche che la loro origine fosse endogena, ma che le inclusioni (le "rodlets") fossero di origine parassitaria (Barber & Mills Westermann, 1986; Fishelson & Becker, 1999). Nel 1986, sulla base di esperimenti di ibridazione *in situ* e marcatura enzimatica, Barber & Mills Westermann conclusero che il nucleo delle RCs fosse di origine endogena, ma che le "rodlet", contenendo DNA in un'insolita conformazione, fossero un elemento invasivo, senza, però, fornire ulteriori spiegazioni sui meccanismi di formazione di queste cellule.

Investigazioni più recenti evidenziano la presenza di una correlazione positiva tra l'aumento del numero di RCs e la presenza di infezioni da parassiti, sia protozoi che metazoi, nei pesci (Leino, 1996; Reite, 1997; Dezfuli *et al.*, 1998, 2000, 2003a, 2004; Palenzuela *et al.*, 1999; Koponen & Myers, 2000). Se le RCs fossero esse stesse dei parassiti, non si spiegherebbe il motivo di un loro aumento in seguito ad infezioni ad opera di altri parassiti, soprattutto se si considera che, spesso, tale aumento è più evidente nella

zona di attacco del parassita stesso (Dezfuli *et al.*, 1998, 2000, 2003a). L'ipotesi sulla natura parassitica della RCs lascia, quindi, un elevato numero di questioni irrisolte, alle quali è possibile aggiungere, brevemente: la totale assenza di un ciclo sessuale che ricordi quello degli Apicomplexa, la presenza di una capsula filamentosa e non di una vera e propria ciste, l'assenza di alcuna specificità tissutale come sito d'infezione e la distribuzione eccezionalmente ampia di queste cellule in pesci che vivono in condizioni ambientali estremamente variabili.

Sono molteplici, invece, gli aspetti che rendono più plausibile l'ipotesi di un'origine endogena delle RCs. Innanzitutto, l'ampia distribuzione di queste cellule in molti tessuti ed in diverse specie di pesci non è una caratteristica degli Apicomplexa (Flood *et al.* 1975), inoltre, anche le caratteristiche morfologiche delle RCs sono incompatibili con quelle del gruppo di parassiti. Nonostante l'elevata casistica dei pesci studiati, non è mai stato riscontrato alcun caso di processo infiammatorio o distruzione del tessuto circostante, anche in zone ad elevata densità di presenza di RCs, come nell'intestino e nelle branchie (Manera & Dezfuli, 2004). Queste cellule sembrano, invece, avere un comportamento che le rende più simili alle cellule calciformi; esse infatti si originano principalmente nella regione basale o intermedia dell'epitelio, per poi migrare verso la superficie ove scaricano il loro contenuto. RCs sono state descritte anche in pesci osservati pochi istanti dopo la schiusa o allo stadio di embrione, anche in individui allevati per generazioni in ambienti controllati e privi di agenti patogeni (Calzada *et al.*, 1998; Kramer & Potter, 2003). Alcuni studiosi ipotizzano che le RCs abbiano, nei teleostei, il ruolo di cellule infiammatorie ed alcuni dati sembrano avvalorare tale ipotesi (Leino, 1974, 1996; Iger & Abraham, 1997). Studi effettuati da Dezfuli e Manera, su pesci prelevati in natura o provenienti da allevamenti, sembrano avvalorare tale ipotesi, ipotizzando uno stretto legame tra le RCs e altre cellule infiammatorie presenti nei pesci, quali i granulociti eosinofili (EGCs) (Dezfuli *et al.*, 1998, 2000, 2003a; Manera *et al.*, 2001).

#### **1.4.2 RCs come elementi del sistema immunitario**

Vi sono diverse evidenze che fanno pensare alle RCs come ad elementi del sistema immunitario e, più precisamente, del sistema immunitario non specifico, definito anche "innato" o umorale, che costituisce la prima linea difensiva nei confronti di possibili elementi patogeni (Leino, 1996; Reite, 1997; Dezfuli *et al.*, 1998, 2000, 2003a, b; Manera

*et al.*, 2001). Già a partire dagli anni '50 diversi autori ritennero che le RCs fossero dei leucociti appartenenti al gruppo dei granulociti (Catton, 1951; Weinreb & Bilstad, 1955; Cenini, 1984). Imagawa *et al.* (1990) distinsero queste cellule dalle cellule mucipare e dai macrofagi grazie ad un'analisi istochimica sulle lectine in tessuti di carpa (*Cyprinus carpa*). Nel 1967 Chaicharn & Bullock misero per la prima volta in relazione le RCs con la presenza di parassiti; essi segnalavano la presenza delle RCs nel canale digerente di due catostomidi, appartenenti a specie diverse, infestati da acantocefali. Successivamente, Smith *et al.* (1995a) osservarono numerose RCs nel tessuto vascolare di diversi tessuti nello scalare (*Pterophyllum scalare* Lichtenstein, 1823); essi identificarono e descrissero queste cellule anche nel lume dei vasi, ancorate, tramite proiezioni citoplasmatiche, alle cellule endoteliali. Gli autori ritennero che le RCs si originassero da cellule indifferenziate endogene, provenienti dal lume del tessuto vascolare periferico, e conclusero che il loro differenziamento in stadio maturo fosse indotto da esposizione a condizioni ambientali stressanti o a livelli di tossicità subletale. Smith *et al.*, (1995b) tentarono anche di identificare, negli spazi extravascolari, i presunti precursori delle RCs, basandosi su alcuni aspetti morfologici e sulla vicinanza di queste cellule alle RCs in via di maturazione. Osservarono due diversi morfotipi: una forma caratterizzata da nuclei eucromatici e contenenti numerose vescicole di piccole dimensioni, l'altra forma caratterizzata da ampi vacuoli elettrondensi, il cui contenuto ricorda la porzione apicale delle "rodlet".

Nel 1982 Leino utilizzò tecniche di microscopia elettronica e citochimica per identificare la composizione delle "rodlet". Scoprì che, con ogni probabilità, erano costituite da un nucleo centrale di natura proteica e povero in carboidrati e da una zona periferica ricca sia in proteine che in carboidrati, presumibilmente in forma di glicoproteine. Pensò, quindi, ad una parte centrale di natura enzimatica rivestita da un guscio di glicoproteine con funzioni protettive (Leino, 1982). Anni dopo questa teoria fu in parte confermata dalla scoperta di attività perossidasi nel nucleo delle "rodlet", in RCs esaminate in epidermide di carpa (*C. carpio*) e trota iridea (*O. mykiss*) sottoposte a stress (Iger & Abraham, 1997); la parte più esterna delle "rodlet", invece, denotava la presenza di fosfatasi alcalina. Gli autori suggerirono che un tale corredo enzimatico, una volta espulso all'esterno, potesse costituire una buona difesa nei confronti di attacchi da parte di organismi estranei. Leino (1996) studiò l'interazione tra RC e presenza di organismi patogeni nel persico sole (*Lepomis macrochirus*) infettato da mixosporidi e ipotizzò che i parassiti potessero essere eliminati grazie alla secrezione, a livello epiteliale, di sostanze

enzimatiche di natura proteica nei tubuli renali; vide, infatti, che in alcuni casi di copresenza delle RCs e del parassita all'interno del tubulo, quest'ultimo appariva danneggiato. Leino suggerì anche che la proliferazione delle RCs nell'epitelio fosse stimolata dalla lesione del tessuto stesso.

L'ipotesi che le RCs giochino un ruolo importante o, perlomeno, di supporto nei meccanismi di risposta infiammatoria nei teleostei è stata oggetto di numerose ricerche negli ultimi anni. Si è visto che anguille (*Anguilla anguilla*) infettate con acantocefali e/o con trematodi digenei presentavano un maggior numero di RCs rispetto ad esemplari mantenuti sani, inoltre, il maggior numero di RCs veniva registrato proprio nella zona di attacco del parassita (Dezfuli *et al.*, 1998); anche nella sanguinerola (*Phoxinus phoxinus*) infettata col nematode *Raphidascaris acus* (Dezfuli *et al.*, 2000) sono state osservate numerose RCs, associate a granulociti eosinofili (EGCs), associate alla reazione focale granulomatosa tipica della zona colpita dal parassita. Sulla relazione tra RCs e EGCs ed il loro coinvolgimento nella rete che provoca la risposta infiammatoria sono stati pubblicati alcuni lavori. Si è visto che esemplari di *Abramis abramis* (L.), con infezioni branchiali da copepode *Ergasilus sieboldi*, presentavano un numero di RCs significativamente più elevato nella zona della branchia ospitante il parassita, che non nelle zone distanti dal sito d'attacco, fornendo una prova ulteriore del coinvolgimento delle RCs nei meccanismi di difesa e nella risposta infiammatoria (Dezfuli *et al.*, 2003a). Un'ulteriore prova del legame tra RCs e risposta infiammatoria deriva da un esperimento effettuato da Manera *et al.* (2001); in pesci rossi (*Carassius auratus*) trattati con dexametasone (un corticosteroide sintetico con proprietà antinfiammatorie) le RCs risultavano influenzate dagli effetti del farmaco ed assumevano un comportamento analogo, nei confronti del corticosteroide, a quello dei normali leucociti (Manera *et al.*, 2001).

### **1.4.3 Utilizzo delle RCs come “biomarkers”**

Un aumento del numero di RCs, in diversi tessuti, nei teleostei sembra essere legato ad un ampio spettro di condizioni stressanti, quali: esposizione a metalli pesanti (cadmio, rame, piombo e mercurio) (Iger & Abraham, 1997; Manera & Dezfuli, 2004; Giari *et al.* 2007, 2008), erbicidi (Manera & Dezfuli, 2004; Dezfuli *et al.*, 2006) e diverse tipologie di infezione da parassiti (Dezfuli *et al.* 2007b, c; Mazon *et al.* 2007). Iger & Abraham (1997) esposero carpe e trote a stressori quali: cadmio, rame, piombo e mercurio, osservando la

presenza di RCs nell'epidermide dei pesci esposti ma non in quella degli animali di controllo. Gli autori proposero che queste cellule potrebbero, quindi, avere un potenziale ruolo di indicatore di situazioni di stress, complementare a quello di indicatori classici quali il cortisolo plasmatico. In un altro studio, esemplari di cefalo, *Leuciscus cephalus* (L.), esposti a diverse dosi di erbicida (Stam<sup>®</sup> M-4) presentavano una diminuzione del numero di RCs presenti nel bulbo arterioso e, allo stesso tempo, un aumento delle stesse cellule nelle branchie in correlazione alla concentrazione dell'erbicida; inoltre, soprattutto nell'intestino, diverse RCs sembravano interessate da vari gradi di degenerazione (Dezfuli *et al.*, 2003b). Leino (1974) osservò che il sovraffollamento e i repentini cambi di salinità potevano causare un aumento del numero di RCs, pur tuttavia egli non fornì dati quantitativi a conferma delle proprie osservazioni. Diversi autori considerano l'uso delle RCs un "biomarker" utile per verificare la presunta esposizione dei pesci a fattori stressanti e potrebbero, quindi, costituire un valido aiuto nel determinare situazioni di stress nei pesci allevati in acquacoltura.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo progetto di lavoro è stato valutare la possibilità di utilizzare le “heat shock protein” 70 (Hsp70) e le “rodlet cells” (RCs) come parametri idonei alla valutazione dello stato di stress nei pesci, in particolar modo in alcune specie ittiche comunemente allevate.

Nella prima parte del lavoro è stata valutata l'espressione delle Hsp70 inducibili e la localizzazione della stessa proteina, sia nella forma inducibile che costitutiva, in larve e avannotti di spigola (*Dicentrarchus labrax*) sottoposti a stress termico. L'esperimento è stato condotto utilizzando individui a partire dai primi stadi larvali e fino all'età di 74 giorni dalla schiusa (dph). E' stata valutata anche, in parallelo, l'espressione e localizzazione delle Hsp70 in individui di spigola triploidi (coetanei) allevati nelle stesse condizioni e sottoposti allo stesso tipo di shock termico. L'utilizzo dei triploidi in acquacoltura è un'ipotesi da tempo presa in considerazione per molteplici aspetti: i triploidi, essendo per natura sterili, al raggiungimento della maturità sessuale tendono a direzionare maggiori risorse verso l'accrescimento corporeo, non dovendo investire nello sviluppo gonadico; inoltre, il sempre più ampio utilizzo di gabbie galleggianti per l'allevamento ittico, pone il problema del rischio di fughe di individui sottoposti a selezione artificiale che potrebbero “inquinare” il genotipo dei conspecifici selvatici; utilizzare pesci sterili porterebbe, quindi, ad un contenimento di questo rischio (Colombo *et al.*, 1995). Uno dei maggiori ostacoli all'utilizzo dei triploidi, oltre che le non trascurabili difficoltà per produrli, deriva dalla possibilità (suffragata da diversi studi) che essi siano più vulnerabili nei confronti di determinate condizioni stressanti (Ojolic *et al.*, 1995; Jhingan *et al.*, 2003). Nel nostro progetto si è voluto quindi analizzare la presenza di eventuali differenze, nell'espressione e nella localizzazione delle Hsp70, tra diploidi e triploidi.

In altri due esperimenti è stata valutata sia l'espressione che la localizzazione delle Hsp70 in pesci sottoposti a stress da trasporto, una forma molto comune di stress nelle pratiche di allevamento. In un primo esperimento sono stati sottoposti a stress da trasporto individui di spigola a diversi stadi di sviluppo (larve, post-larve, avannotti e adulti); in un secondo esperimento analogo, sono stati sottoposti a stress da trasporto individui adulti di carpa (*C. carpio*) e trota iridea (*O. mykiss*).

Nella seconda parte del lavoro è stata valutata la possibilità di utilizzare le RCs come indicatori nei confronti di stress molto comuni nell'allevamento, quali il sovraffollamento e il confinamento. Sono state utilizzate spigole adulte sottoposte a due diverse densità di confinamento ( $20 \text{ Kg/m}^3$  e  $80 \text{ Kg/ m}^3$ ) e per due diversi intervalli temporali (2 ore e 24 ore); al termine dell'esperimento è stato valutato il numero di RCs presenti nelle branchie alle diverse condizioni di stress. E' stata inoltre effettuata un'analisi ultrastrutturale delle RCs al microscopio elettronico a trasmissione.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 HSP70

#### 3.1.1 Espressione dell'mRNA per la forma inducibile delle Hsp70 e localizzazione immunoistochimica di Hsp70 e Hsc70 in spigole diploidi e triploidi sottoposte a stress termico

**Produzione e allevamento.** Nel gennaio 2006 sono stati prodotti presso l'impianto ittico sperimentale "Pellestrina" (Veneto Agricoltura) due lotti di spigola (*Dicentrarchus labrax*) tramite fecondazione artificiale. Si sono ottenuti oociti da due diverse femmine e un pool di sperma da alcuni maschi; tutti i riproduttori sono stati precedentemente stimolati con ormone LH-RH. Uno dei due lotti è stato sottoposto ad un processo di triploidizzazione mediante esposizione degli oociti fecondati a shock freddo (0°C per 20 min), per provocare la ritenzione del 2° polocita (Colombo *et al.*, 1995). L'effettiva triploidizzazione è stata poi verificata, su campioni di larve, mediante metodo citofluorimetrico (Libertini *et al.*, 2004) presso i laboratori dell'Istituto di Biologia del Mare (CNR) di Venezia. Le uova fecondate sono state poi immerse in appositi schiuditori del volume di 80 l ed ad una temperatura di 15°C; la schiusa delle uova è avvenuta in circa 36 ore per entrambe le ploidie. Sono poi state seguite le normali procedure previste dal protocollo d'allevamento, che prevedono un innalzamento graduale della temperatura fino ad un valore di 18°C e la somministrazione di cibo vivo a base di *Artemia salina* dall'ottavo giorno. A 6 giorni dalla schiusa, "days post hatch" (dph), le larve sono state trasferite in vasche da 500 litri.

**Stress termico.** A partire da 0 dph ed ogni due giorni fino al 10° giorno e, successivamente, a 30, 45, 60, 74 dph, un pool di larve veniva prelevato dalla vasca di allevamento e sottoposto a stress termico. Le larve venivano poste in un contenitore termostato del volume di circa 50 litri con temperatura iniziale uguale a quella della vasca di allevamento; la temperatura veniva quindi aumentata gradualmente di 10°C (tempo medio impiegato: 80 min) rispetto a quella iniziale e mantenuta tale per 60 min. Al termine dell'intervallo di tempo, le larve venivano rapidamente sacrificate tramite un eccesso di anestetico (MS-222, Sandoz, Italy) e raffreddate mediante aggiunta di acqua

marina ad una temperatura di circa 4°C; a questo seguiva immediatamente il prelievo delle larve per le analisi successive. Come gruppo di controllo, un equivalente numero di larve provenienti dalla stessa vasca di allevamento, veniva prelevato e trasferito in un'altra vasca mantenuta, però, alla stessa temperatura di provenienza e per un intervallo di tempo identico a quello trascorso dagli individui sottoposti a stress termico. Trascorso tale periodo le larve venivano sacrificate con la stessa modalità descritta precedentemente.

**Prelievi.** Per l'analisi biomolecolare (RT-PCR) sono stati prelevati e fissati in RNA Later Reagent (Ambion, USA) pool, composti da almeno 10 larve, sia del gruppo di controllo che del gruppo sottoposto a stress; l'analisi è stata effettuata solo per gli individui di 0, 2, 4, 6 e 10 dph.

I campioni di larve per l'immunoistochimica, almeno 10 per gruppo, sono state fissate in paraformaldeide al 4% allestita in soluzione salina PBS (phosphate buffered saline) 0.1M a pH 7.4 per almeno 2 ore a 4°C, successivamente risciacquate in PBS e conservate in alcol etilico al 70%.

## **RT-PCR**

Nei presenti lavori è stata eseguita una RT-PCR (Reverse Transcription PCR), cioè è stata utilizzata quale fonte di informazione il DNA complementare (cDNA) anziché il DNA cellulare e la trascrittasi inversa anziché la DNA polimerasi. Il cDNA è stato ottenuto a partire dall'mRNA estratto dai tessuti o, a seconda delle dimensioni, dagli animali *in toto*.

L'estrazione dell'RNA totale (messaggero, ribosomiale e trasportatore) è stata effettuata utilizzando il TRIZOL Reagent (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Questo reagente è costituito da una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato che permette di mantenere l'integrità dell'RNA mentre distrugge le cellule e gli altri componenti cellulari. La metodica è molto utilizzata in biologia molecolare in quanto permette di isolare, da piccole quantità di tessuti (50-100 mg) e cellule ( $5 \times 10^6$ ), molecole di RNA separandole da eventuali contaminanti quali le proteine ed il DNA cellulare.

Ad ogni campione è stato aggiunto 1ml di TRIZOL Reagent; il tutto è stato omogenato utilizzando una provetta con pestello. I campioni omogeneizzati sono stati incubati in un contenitore di vetro ad una temperatura di 10-30°C per permettere una completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Successivamente sono stati aggiunti 0.2 ml di

cloroformio e, dopo 15 secondi di agitazione, il tutto è stato lasciato ad incubare ad una temperatura di 15-30°C per 3 minuti. I campioni sono stati poi sottoposti a centrifugazione a 12000 giri per 15 minuti alla temperatura di 2-8°C. Questo procedimento ha permesso la separazione della miscela in tre fasi: un sedimento costituito dalla fase organica, di color rosso, una fase intermedia ed una fase soprastante acquosa contenente in sospensione l'RNA. La fase acquosa è stata trasferita in una provetta e sono stati aggiunti 0.5 ml di alcool isopropilico allo scopo di provocare la precipitazione dell'RNA. I campioni sono stati incubati ad una temperatura di 15-30°C per 15 minuti e successivamente centrifugati a 12000 giri per 10 minuti alla temperatura di 2-8°C. Il precipitato di RNA, visibile macroscopicamente sotto forma di materiale gelatinoso, si è raccolto sul fondo della provetta. Dopo aver rimosso il surnatante, il pellet di RNA è stato risospeso aggiungendo 1ml di etanolo al 75%. La provetta è stata agitata su vortex e centrifugata a 7500 giri per 5 minuti alla temperatura di 2-8°C. Al termine della procedura si è lasciato asciugare all'aria il pellet di RNA per 25-30 minuti. Successivamente l'RNA è stato risospeso e sciolto in acqua distillata RNAasi-free.

#### REAGENTI:

- TRIZOL Reagent
- Cloroformio
- Alcool isopropilico
- Etanolo al 75%
- Acqua RNAasi-free

La sintesi di cDNA è avvenuta successivamente alla fase di isolamento dell'mRNA dall'RNA totale. Tale isolamento è stato effettuato sfruttando la capacità degli Oligo(dt)20, cioè degli oligopolimeri di timina, di identificare e legare la catena poli(A) caratteristica e specifica dell'mRNA. Dopo aver isolato l'mRNA è stato possibile sintetizzare il filamento di cDNA utilizzando la trascrittasi inversa Superscript II RNase H- (Invitrogen, Life technologies, UK). Questo enzima, altamente specifico, ha permesso la sintesi di numerosi filamenti di cDNA, i quali sono stati impiegati come stampo di partenza per l'analisi della RT-PCR.

## REAGENTI:

- RNA totale;
- Primers: Control Sense Primer (10 $\mu$ M) e Antisense Control Primer (10  $\mu$ M);
- I desossinucleotidi trifosfato (adenina, citosina, guanina, timina), che vengono incorporati nei nuovi filamenti di cDNA;
- Oligo(dt)20 ;
- Tampone 10X RT;
- MgCl<sub>2</sub> (25mM);
- DTT (ditiotreitolo 0.1M);
- RNasi OUTTM, inibitore della ribonucleasi;
- Superscript II RNase H- : 1  $\mu$ l;
- RNasi H di E.Coli (2U/ $\mu$ l):1  $\mu$ l;

Per una buona resa della sintesi di cDNA, la quantità minima di RNA totale deve essere nel range di 1ng-5 $\mu$ g. L'RNA messaggero è stato retrotrascritto in un filamento singolo di cDNA utilizzando l'enzima Superscript II RNase H-. La retrotrascrizione è stata ottenuta attraverso i seguenti passaggi: sono stati miscelati in ghiaccio, in una provetta sterile, 5 $\mu$ g di RNA, 1 $\mu$ l di Oligo(dt)20, 1 $\mu$ l di una miscela di desossinucleotidi trifosfato ed acqua RNasi-free fino a raggiungere il volume complessivo di 12 $\mu$ l. La miscela è stata incubata per 5 minuti alla temperatura di 65°C e successivamente è stata lasciata raffreddare in ghiaccio per 1 minuto. Sono stati, in seguito, aggiunti il tampone 10X RT (2 $\mu$ l), l'MgCl<sub>2</sub> (4 $\mu$ l), la DTT (2  $\mu$ l), l'RNasi OUTTM (1  $\mu$ l) e l'enzima Superscript II RNase H-. La miscela così costituita è stata leggermente centrifugata e lasciata incubare 50 minuti a 50°C e, successivamente, alla temperatura di 85°C per 5 minuti. Per aumentare la sensibilità della PCR è stato degradato l'mRNA aggiungendo 1  $\mu$ l di RNasi H e lasciando incubare a 37°C per 20 minuti. Infine sono stati utilizzati 2  $\mu$ l di tale aliquota per la RT-PCR.

Sono stati effettuati 35 cicli successivi per l'amplificazione del gene desiderato. Ad ogni ciclo le fasi di denaturazione, di annealing e di elongation, della durata ciascuna di 45 secondi, sono state effettuate alla temperatura rispettivamente di 95, 55 e 72°C. Per l'amplificazione sono stati utilizzati una coppia di oligonucleotidi antiparalleli specifici utilizzati come primers nella reazione di amplificazione:

1) HSP70 ( forward) - GTCTGGACAAAGGCAAGAGC

2) HSP70 (reverse) - CACAAAGTGGTTGACCATGC

Entrambi si legano all'estremità 5' del gene del cDNA codificante per l'Hsp70 e sono costruiti sulla base della sequenza di mRNA dell'Hsp70 della spigola. Per garantire una buona qualità dell'mRNA e per determinare l'efficienza della reazione di retrotrascrizione per ogni campione è stato amplificato un frammento di  $\beta$ -actina. I prodotti della RT-PCR sono stati successivamente sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio al 2% ed evidenziati sotto luce ultravioletta.

## **IMMUNOISTOCHEMICA**

I campioni conservati in etanolo 70% sono stati prima inclusi in paraffina tramite un processore automatico e successivamente tagliati al microtomo ad uno spessore di 4  $\mu$ m. Per garantire una migliore adesione delle sezioni, i vetrini sono stati precedentemente trattati con TESPA (SIGMA, UK). Al termine del processo di idratazione, effettuato tramite una scala discendente di concentrazioni di etanolo, i campioni sono stati trattati per 20 minuti in perossido di idrogeno diluito al 3% in alcool metilico; questo per inibire l'attività della perossidasi endogena eventualmente presente. Per prevenire legami aspecifici dell'anticorpo primario è stata effettuata una saturazione dei siti antigenici non specifici incubando le sezioni in una soluzione diluita 1:5 di siero di coniglio o di topo (Dako, Italia). Gli anticorpi (Ab) primari, di seguito elencati, sono stati posti ad incubare sulle sezioni per 24 ore ad una temperatura di 4°C.

### **▪ Ab PRIMARIO anti-Hsc70 (costitutiva)**

Per localizzare l'Hsc70, è stato utilizzato un anticorpo policlonale anti-Hsc70 (diluizione 1:2000) prodotto nel coniglio dopo stimolazione antigenica ottenuta mediante

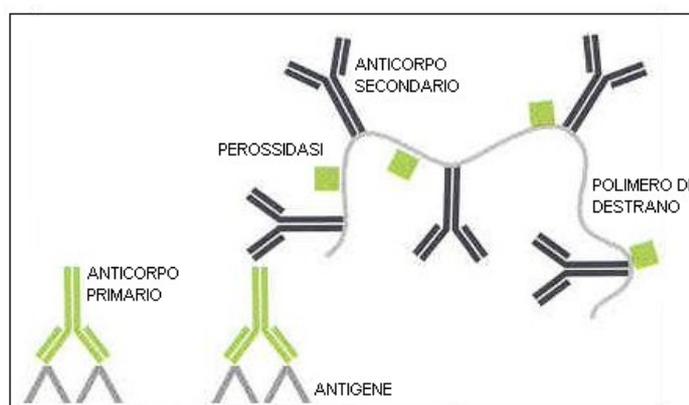
somministrazione di un peptide sintetico, formato da 13 aminoacidi strutturalmente simile a quello dell'Hsc70 umana (Stressgen Biotechnologies, USA).

- **Ab PRIMARIO anti-Hsp70 (inducibile)**

Per localizzare l'Hsp70 è stato utilizzato un anticorpo monoclonale anti-Hsp70 (diluizione 1:200) prodotto nel topo dopo stimolazione antigenica ottenuta mediante inoculazione della proteina Hsp70 purificata isolata nell'uomo (Stressgen Biotechnologies, USA).

Per visualizzare l'avvenuto legame tra Ab primario e antigene (Ag) è stato utilizzato il metodo EnVision:

**Metodo EnVision:** Questo sistema utilizza per l'amplificazione del segnale un polimero di destrano a cui sono legate numerose molecole di enzima perossidasi e di un anticorpo secondario (Ab2) in grado di riconoscere e legare l'anticorpo primario (Ab1). In questo modo si ottiene un singolo complesso Ag-Ab1-Ab2 a cui sono legate più molecole di perossidasi, in grado di sviluppare una reazione colorimetrica maggiore (fig. 1).



**Fig. 1:** Diverse componenti del sistema di rivelazione EnVision

Come tecnica di visualizzazione finale, si favorisce la reazione di un composto cromogeno, la diaminobenzidina (DAB), con le perossidasi presenti sull'Ab secondario in presenza di un substrato: il perossido di idrogeno. Nelle zone in cui è avvenuta la reazione il preparato assume una colorazione marrone.

Il protocollo utilizzato è riassunto qui di seguito:

- Aggiunta anticorpo primario, circa 100µl a sezione, lasciato incubare 24 ore a 4°C in camera umidificata.
- 3 lavaggi in PBS di 5 minuti ciascuno.
- Aggiunta del complesso EnVision, lasciato incubare per 30 minuti.
- 3 lavaggi in PBS di 5 minuti ciascuno.
- Colorazione in torretta aggiungendo a 62.5 ml di tampone PBS puro, 60 mg di DAB, 77 µl di perossido di idrogeno al 30% e lasciando incubare per 5-10 minuti monitorando la reazione.
- Lavaggio in acqua corrente per 5 minuti.
- Differenziazione in ematossilina di Harris per 10 min allo scopo di contrastare i nuclei.
- Disidratazione, chiarificazione e montaggio dei vetrini con balsamo Eukitt.

**Controlli di specificità.** Per verificare l'effettiva specificità del riconoscimento Ag-Ab sono stati effettuati routinariamente alcuni controlli negativi, quali ad esempio:

- Sostituzione dell'anticorpo primario con PBS.
- Sostituzione dell'anticorpo primario con siero di coniglio.
- Sostituzione dell'anticorpo secondario con PBS.

I risultati dei controlli hanno sempre dato esito negativo.

### **3.1.2 Analisi RT-PCR qualitativa e quantitativa di Hsp70 e localizzazione immunoistochimica di Hsc70 e Hsp70 in spigole sottoposte a stress da trasporto**

**Procedura sperimentale e raccolta dei campioni.** Per questo esperimento sono stati utilizzati campioni di larve e spigole adulte provenienti rispettivamente dall'impianto ittico sperimentale "Pellestrina" (Venezia) e dall'allevamento "Biotopo Valle Bonello" (Rovigo).

Larve, post-larve e giovanili di spigola di 25, 40 e 80 giorni dalla schiusa ("days post hatch", abbrev. dph) sono state prelevate, in date diverse tra febbraio e aprile del 2005, e trasportate in un contenitore del volume di 5 litri, riempito con la stessa acqua della vasca di partenza e provvisto di aeratore. Il trasporto ha avuto una durata complessiva di 3 ore e si è concluso con l'arrivo dei soggetti presso il Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie di Legnaro (Sperivet). All'arrivo i campioni sono stati rapidamente sacrificati utilizzando una dose letale di anestetico MS222 (Sandoz, Italia). Lo stesso numero di animali utilizzati per il trasporto veniva prelevato e sacrificato immediatamente alla partenza con lo stesso metodo, allo scopo di costituire un gruppo di controllo.

Sette individui adulti di spigola del peso di  $223 \pm 47$  g (media  $\pm$  deviazione standard) sono stati prelevati da una vasca esterna nel novembre del 2004 e trasportati in contenitori provvisti di aeratore ad una densità inferiore ai  $10 \text{ Kg/m}^3$ . Il trasporto presso il dipartimento di Sperivet è durato 1.5 ore. All'arrivo, ai pesci è stato immediatamente effettuato un prelievo di sangue dall'arco branchiale, successivamente sono stati sacrificati con un eccesso di anestetico MS222 e si è effettuato il prelievo dei tessuti: fegato, cervello, muscolo, branchie, rene, gonadi, cuore, milza e cute. Lo stesso protocollo è stato seguito su 7 individui (peso  $214 \pm 20$  g) utilizzati come gruppo di controllo direttamente sul luogo del campionamento.

Per verificare la presenza o l'assenza di un'effettiva condizione di stress, rispettivamente negli animali stressati e nei controlli, è stato effettuato il dosaggio del cortisolo corporeo, negli stadi larvali e giovanili, e plasmatico negli adulti.

#### **DOSAGGI ORMONALI**

Per il dosaggio ormonale sia sugli stadi giovanili che sugli adulti è stata utilizzata la metodica del *radioimmunoassay* (RIA) su micropiastra.

**Preparazione dei campioni.** Per gli stadi larvali e giovanili il dosaggio del cortisolo è stato effettuato *in toto* su pool di larve di 25 dph (pool di 6 larve), 40 dph (pool di 2 larve) e su 100 milligrammi di sminuzzato di larva di 80 giorni. Per l'estrazione del cortisolo i campioni sono stati preventivamente omogenati in un mortaio con azoto liquido ed il ricavato è stato ripreso con 500 µl di tampone RIA. Nelle spigole adulte il dosaggio del cortisolo è stato effettuato su 100 µl di plasma sanguigno ripreso con 500 µl di tampone RIA. In entrambi i casi il cortisolo è stato estratto mediante aggiunta di 8 ml di etere dietilico, agitazione dei campioni per 10 minuti e centrifugazione a 1500 rpm per 5 min. Le provette da estrazione sono state successivamente congelate a -20°C per permettere una agevole separazione del surnatante (dietero) liquido dalla fase acquosa sottostante congelata. Il surnatante è stato trasferito in altre provette di vetro coniche e portato a secco sotto corrente d'azoto. Dopo un risciacquo con ulteriore aggiunta di un ml di etere dietilico i campioni sono stati riportati a secco. Il residuo secco è stato ripreso con 1 ml di tampone RIA e agitato per 10 minuti.

Composizione del tampone RIA:

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O                    21.85 g/L
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O                        4.38 g/L
- NaCl                                        9 g/L
- BSA (albumina di siero bovino)    0.1 %

**Preparazione micro piastra.** Questo metodo in fase solida prevede l'utilizzo di micropiastre in polistirene da 96 pozzetti (PACKARD, optiplate 96 well) sulle quali viene fissato l'anticorpo secondario che, mediante legame covalente o per adsorbimento, si lega alle pareti di ogni pozzetto. L'anticorpo secondario utilizzato è un Anti-Rabbit, una anti- γ-globulina di coniglio prodotto nella capra, utilizzato alla diluizione di 1:600. Sono stati caricati 200µl di antisiero in ognuno dei 96 pozzetti, dopodichè la piastra è stata messa ad incubare a 4°C per una notte. Dopo aver eliminato con dei lavaggi la quota di anticorpo non adsorbito alle pareti dei pozzetti, la piastra è stata asciugata e conservata in congelatore a -20°C. Un giorno prima dell'utilizzo è stato effettuato il "coating", che consiste nell'aggiunta dell'anticorpo primario anti-cortisolo (Biogenesys A907/R1Y), prodotto nel coniglio, alla diluizione di 1:20000. Il tracciante radioattivo

utilizzato è l'1,2,6,7-H<sub>3</sub> Cortisolo (NET 396001). La soluzione madre è stata diluita per ottenere una soluzione da 6000CPM/10µl.

**Allestimento della curva di taratura.** La curva di taratura si ottiene dosando quantità note di cortisolo non marcato a concentrazioni crescenti. Il cortisolo utilizzato nella costruzione della curva è l'Hydrocortisone SIGMA H-4001, alla concentrazione di 100ng/ml di etanolo (SOL C).

40 µl SOL C (100 ng/ml) + 960 µl tampone RIA	→	<b>standard C7</b>	concentrazione 200 pg/50 µl
300 µl C7	+ 300 µl tampone RIA	→	<b>standard C6</b> concentrazione 100 pg/50 µl
300 µl C6	+ 300 µl tampone RIA	→	<b>standard C5</b> concentrazione 50 pg/50 µl
300 µl C5	+ 300 µl tampone RIA	→	<b>standard C4</b> concentrazione 25 pg/50 µl
300 µl C4	+ 300 µl tampone RIA	→	<b>standard C3</b> concentrazione 12.5 pg/50 µl
300 µl C3	+ 300 µl tampone RIA	→	<b>standard C2</b> concentrazione 6.25 pg/50 µl
300 µl C2	+ 300 µl tampone RIA	→	<b>standard C1</b> concentrazione 3.125 pg/50 µl

Nella preparazione della piastra vengono allestiti alcuni pozzetti di controllo allo scopo di stimare l'affidabilità e l'accuratezza del dosaggio. In questi pozzetti vengono valutati parametri quali: l'attività totale (AT), il legame non specifico con l'anticorpo (NSB), il controllo del "coating" (Co) ed il dosaggio di una quantità nota di cortisolo (Ctrl).

- **AT:** in questo pozzetto viene introdotto solo il tracciante radioattivo e non vengono effettuati risciacqui, per cui viene stimata la radioattività totale del cortisolo marcato.
- **L'NSB:** in questo pozzetto non è presente l'anticorpo specifico per il cortisolo, ma solo il tampone RIA ed il tracciante radioattivo. Serve quindi a stimare la componente di legame aspecifico.
- **Il Co:** in questo pozzetto sono presenti l'anticorpo primario, il secondario, il tampone RIA ed il tracciante radioattivo. Essendo l'unico antigene presente, l'antigene marcato occuperà tutti i siti di legame dell'anticorpo esprimendo la radioattività massima misurabile dal sistema.

- Il **Ctrl**: in questo pozzetto sono presenti l'anticorpo primario, il secondario, il tampone RIA, il tracciante ed estratto di plasma bovino con concentrazione nota di cortisolo.

In ogni pozzetto sono stati caricati 10, 20 o 50 µl di campione estratto diluiti con tampone RIA, in modo da raggiungere un volume complessivo di 200µl, e immediatamente dopo, sono stati aggiunti 10µl per pozzetto di tracciante radioattivo.

La piastra così caricata è stata lentamente agitata per 3 minuti e lasciata incubare per 24 ore a 4°C. Successivamente, aspirata la fase liquida, sono stati effettuati 4 lavaggi della piastra con 200µl di tampone RIA per pozzetto. In tab.1 sono indicati i volumi di incubazione delle diverse sostanze nell'allestimento della piastra. Sono stati infine aggiunti ad ogni pozzetto 200µl di microscintillante (Microscint 20, Packard) e la piastra è stata sigillata con l'apposita pellicola termosaldabile e inserita nel β-counter per il conteggio della radioattività. Il dosaggio è stata eseguito in triplo.

**Tab.1 Schema di caricamento della piastra**

	<b>AT</b>	<b>NBS</b>	<b>Co</b>	<b>Curva</b>	<b>Controllo</b>	<b>Campioni</b>
<b>Tampone RIA</b>	-	200 µl	200 µl	150 µl	150 µl	Variabile
<b>Standard Cortisolo</b>	-	-	-	50 µl	-	-
<b>Campione</b>	-	-	-	-	-	Variabile
<b>CTRL</b>	-	-	-	-	50 µl	-
<b>Tracciante *</b>	10µl	10 µl	10µl	10 µl	10 µl	10 µl
<b>TOT</b>	10 µl	210 µl	210 µl	210 µl	210 µl	210 µl

- **AT**: 10 µl di tracciante radioattivo;
- **NBS**: 10 µl di tracciante radioattivo + 200 µl di tampone RIA;
- **Co**: 10 µl di tracciante radioattivo + 200 µl di tampone RIA;
- **Controllo (CTRL)**: 200 µl di estratto + 10 µl di tracciante radioattivo;
- **Standards della curva (C1-C7)**: 50 µl (C1-C7) + 150 µl tampone RIA + 10 µl di tracciante;
- **Campioni (14)**: quantità variabile di estratto e tampone RIA in rapporto alla diluizione desiderata. Estratto + tampone RIA + 10 µl di tracciante = 210 µl

## ANALISI RT-PCR QUALITATIVA E QUANTITATIVA

**Analisi RT-PCR qualitativa.** Il cDNA utilizzato per l'analisi è stato ottenuto a partire dall'mRNA estratto da un pool di 100 mg, rispettivamente di larve di 25, 40 dph ed avannotti di 80 dph e da 100 mg di ognuno dei seguenti tessuti prelevati dai branzini adulti: fegato, cervello, muscolo, branchie, reni, gonadi, cuore, milza e cute. La metodica utilizzata è la stessa esposta precedentemente nella sezione RT-PCR del paragrafo 2.1.1.

**Analisi RT-PCR quantitativa.** Per determinare eventuali differenze di espressione relativa del gene per le Hsp70 inducibili, tra gli animali del controllo e quelli trasportati, è stata effettuata un'analisi Real-Time PCR.

Per l'analisi dell'espressione è stato utilizzato lo strumento "ABI 7500 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems), provvisto del programma di raccolta e analisi dei dati "ABI 7500 System SDS Software". L'analisi prevede l'utilizzo di un fluoroforo, il SYBR *Green*, presente in una miscela disponibile in commercio, che ha la proprietà di emettere fluorescenza solo quando si intercala al DNA a doppio filamento. Durante la reazione di PCR l'enzima AmpliTaq amplifica la sequenza bersaglio creando diversi segmenti di DNA e il SYBR *Green* si lega a ciascuno di questi segmenti. Ne consegue che l'intensità della fluorescenza aumenta in proporzione al numero di molecole di DNA sintetizzate. Nella stessa miscela sono contenuti l'enzima polimerasi AmpliTaq *Gold*, che catalizza la reazione di copiatura, i dNTPs, il MgCl<sub>2</sub>, un secondo fluoroforo (ROX) che viene utilizzato dallo strumento come riferimento interno. L'esperimento è stato condotto nelle seguenti condizioni di PCR: una fase di attivazione della polimerasi a 95°C per 10 minuti, 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 40 cicli a 60°C per 60 secondi.

Ciascun campione è stato analizzato in triplicato ed è stato inserito un controllo negativo contenente acqua al posto del cDNA stampo. Come gene di riferimento per la quantificazione relativa del gene target è stata utilizzato il gene della  $\beta$ -actina. Il metodo di calcolo utilizzato è quello del  $\Delta\Delta Ct$ . Al termine della reazione lo strumento fornisce, per il gene target (Hsp70) e per il gene di riferimento ( $\beta$ -actina) di ciascun campione, il valore Ct. Il Ct rappresenta il valore numerico del ciclo di amplificazione al quale la fluorescenza registrata dallo strumento oltrepassa una certa soglia. Di questi valori viene calcolato il  $\Delta$ , ovvero la differenza, tra il Ct del gene target e il Ct del gene endogeno ( $\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{end}}$ ). Sottraendo al valore del  $\Delta Ct$  dei vari campioni il  $\Delta Ct$  di un campione che viene assunto come calibratore dell'esperimento, si ottengono i valori di

$\Delta\Delta Ct$ . Infine, mediante l'equazione  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  si ottiene l'espressione del gene target, normalizzata rispetto ad un gene endogeno di riferimento, ed espressa relativamente ad un campione assunto come calibratore, il cui valore si assume uguale a 1. Per verificare che l'efficienza di amplificazione del gene target e del gene di riferimento siano simili è stato effettuato un esperimento preliminare di validazione, cioè si è valutato come varia il  $\Delta Ct$  al variare della diluizione del campione. Si esegue pertanto un esperimento di Real-Time utilizzando diluizioni scalari di uno dei campioni e si traccia un grafico coi valori del Log della diluizione verso i valori di  $\Delta Ct$  calcolati per ciascuna diluizione. Si ottiene una retta, il cui valore della pendenza deve risultare inferiore a 0,1 per ritenere l'esperimento validato.

### **LOCALIZZAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA DI Hsc70 E Hsp70**

Le larve, gli avannotti ed i campioni di tessuto prelevati dalle spigole adulte sono stati fissati mediante immersione in paraformaldeide al 4% allestita in soluzione salina PBS (phosphate buffered saline), 0.1M , a pH 7.4 per 24 ore a 4°C. Successivamente i preparati sono stati lavati in acqua corrente per eliminare l'eccesso di fissativo e disidratati per immersione in soluzioni a concentrazioni crescenti di etanolo. Ogni preparato è stato poi chiarificato in xilolo ed incluso in paraffina. Il blocchetto di paraffina è stato sezionato al microtomo in sezioni uniformi di circa 4  $\mu m$ . La metodologia utilizzata è la stessa già descritta nel paragrafo 2.1.1 nella sezione "IMMUNOISTOCHEMICA".

### **3.1.3 Localizzazione immunoistochimica di Hsp70 costitutive e inducibili in carpa (*Cyprinus carpio*) e trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) sottoposte a stress da trasporto**

Questo studio è stato effettuato su due diverse specie ittiche: la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e la carpa comune (*Cyprinus carpio*).

Tutti i campioni provengono dall'allevamento "Durigon" in località Santa Cristina (Treviso). Per il campionamento, eseguito nel mese di dicembre 2005, sono state prelevate dalle vasche di allevamento 20 trote (10 controlli + 10 stressati) e 14 carpe (7 controlli +

7 stressati). Le trote e le carpe del gruppo di controllo sono state preventivamente stordite con storditore elettrico e sacrificate, tramite rescissione del midollo spinale, direttamente presso il sito di campionamento. I rimanenti sono stati trasportati in appositi contenitori, riempiti con acqua prelevata dalla loro vasca di allevamento e muniti di aeratore, per un periodo di 1,5 ore fino al Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie. Al termine del viaggio sono stati sacrificati con la stessa modalità utilizzata per il gruppo di controllo.

Sia per i controlli che per gli stressati, da ciascuna individuo è stato prelevato un campione di sangue per il dosaggio del cortisolo, mentre per l'indagine immunoistochimica sono stati prelevati da 4 trote (2 stressati + 2 controlli) e da 4 carpe (2 controlli + 2 stressati) campioni dei seguenti organi: branchia, intestino, muscolo, cute, rene.

La metodologia utilizzata, sia per il dosaggio ormonale che per l'analisi immunoistochimica, è la medesima descritta nelle rispettive sezioni al paragrafo 2.1.1.

## **3.2 RODLET CELLS**

### **3.2.1 Influenza dello stress da sovraffollamento e confinamento sul numero di “RCs” nella spigola**

**Disegno sperimentale.** La prova sperimentale è stata effettuata nel giugno del 2004 presso l'impianto ittico “Centro Ittico Bonello” (Porto Tolle (RO), Italia).

Cinquanta esemplari di spigola (peso  $451 \pm 11$ g, media  $\pm$  E.S.) sono stati rapidamente pescati da una vasca esterna e distribuiti casualmente in quattro vasche, 10 per vasca, provviste di ossigenazione e abbondante ricircolo d'acqua: in 2 vasche di maggiori dimensioni i pesci sono stati confinati ad una densità di  $20 \text{ Kg/m}^3$ , mentre nelle altre 2 vasche, più piccole, la densità era di  $80 \text{ Kg/m}^3$ . Per tutta la durata dell'esperimento (24 ore) la concentrazione di ossigeno è rimasta compresa nell'intervallo di 9.2-10.5 ppm e 6.8-9.0 ppm nelle vasche a bassa densità e ad alta densità, rispettivamente; la temperatura, per tutte le vasche, si è mantenuta nell'intervallo di  $23.25^\circ\text{C}$ . Un gruppo di 10 individui è stato sottoposto ad anestesia, tramite MS222, e campionato immediatamente dopo la pesca, in modo da costituire un gruppo di controllo.

Dopo 2 ore, da una vasca per ognuna delle due densità, i pesci sono stati rapidamente pescati, anestetizzati e campionati come verrà descritto in seguito. Ventiquattro ore più tardi sono stati pescati e campionati anche i pesci rimanenti nelle altre 2 vasche.

**Prelievi e processazione dei campioni.** Immediatamente dopo l'anestesia ai pesci è stato prelevato un campione di sangue dalle branchie per il dosaggio del cortisolo (vedi paragrafo 2.1.2, sezione “DOSAGGI ORMONALI”); dopo il prelievo i pesci sono stati sacrificati tramite rapida rescissione del midollo spinale. Per ogni gruppo sperimentale, da 5 individui scelti a caso, è stata prelevata una porzione di branchia e rapidamente fissata in paraformaldeide al 4%; alcune altre porzioni più piccole di branchia sono state raccolte e fissate in glutaraldeide al 2.5% in tampone Sørensen 0.2 M (Ph 7.4) per la microscopia elettronica.

Per la microscopia ottica i campioni sono stati ripetutamente sciacquati in tampone PBS per eliminare il fissativo, disidratati attraverso una scala ascendente di alcool etilico, inclusi in paraffina e tagliati al microtomo ad uno spessore di  $4 \mu\text{m}$ . Per meglio evidenziare

le RCs i tessuti sono stati colorati con colorazione tricromica di Masson. Su una sezione di branchia per ogni pesce campionato, sono state scelte casualmente ed acquisite, al microscopio ottico (Olympus Vanox AH-3, Giappone) e tramite un sistema di analisi d'immagine (Olympus DP-soft), 10 aree di 65.000  $\mu\text{m}^2$  ognuna. Per standardizzare il più possibile, da un punto di vista morfologico, le zone di tessuto campionate, sono state prese in considerazione solo aree contenenti porzioni di lamella primaria. Per ridurre al minimo eventuali condizionamenti nella scelta dell'area, questa avveniva mantenendo la zona leggermente fuori fuoco, in modo da non poter chiaramente distinguere le RCs, e regolando la messa a fuoco solo prima dell'acquisizione. E' stato quindi contato il numero totale di RCs presenti in ogni area campionata. Sono state prese in considerazione e contate solo cellule chiaramente distinguibili come RCs e che presentavano determinate caratteristiche, ad esempio: nucleo alla base, spessa parete cellulare, presenza di "rodlet" nel citoplasma. Per verificare la presenza di eventuali componenti soggettive nella valutazione del numero di RCs, il conteggio è stato effettuato in modo indipendente da 2 diversi operatori; i dati sono stati poi confrontati tra loro tramite un test t di Student per campioni dipendenti.

**Microscopia elettronica.** I campioni sono stati processati per poter essere inclusi in resina Durcupan<sup>®</sup> ACM (Fluka); di seguito il protocollo utilizzato: i tessuti sono stati ripetutamente sciacquati in tampone Sørensen 0.1 M e post-fissati in tetrossido di osmio all'1% in tampone 0.2 M per 1 ora a 4°C; successivamente disidratati in concentrazioni crescenti di etanolo: 50, 70, 90 e 100. I campioni disidratati sono stati inclusi in Epon-Araldite e sezionati con ultramicrotomo (Reichert Jung Ultracut E), in modo da ottenere sezioni semifini (1  $\mu\text{m}$ ) successivamente colorate con blu di toluidina ed esaminate al microscopio (Olympus Vanox AH-3, Giappone). Dalle sezioni semifini sono state selezionate delle aree da cui si sono ottenute sezioni ultrafini (70 nm), poi collocate su griglie di rame e colorate con acetato di uranile e citrato di piombo. Le sezioni sono, infine, state esaminate e fotografate al microscopio elettronico (JEOL-JEM-T8, Giappone).

## **ANALISI DEI DATI**

I dati inerenti l'espressione relativa del messaggero per le Hsp70, su spigole sottoposte a stress da trasporto, sono stati analizzati utilizzando tecniche non parametriche: il test U di Mann/Whitney nei confronti tra due serie di variabili indipendenti; l'ANOVA di Kruskal-Wallis quando è stato necessario confrontare più variabili.

I valori di concentrazione del cortisolo plasmatico, negli individui sottoposti a stress e nei controlli, sono stati confrontati tramite test t di Student a due vie per campioni indipendenti.

Il numero di RCs presenti nelle dieci aree di tessuto campionate per ogni individuo è stato espresso come numero medio di RCs rapportato alla superficie campionata (65.000  $\mu\text{m}^2$ ). I dati sono stati prima trasformati in radice quadrata e poi confrontati con ANOVA a una via parametrica.

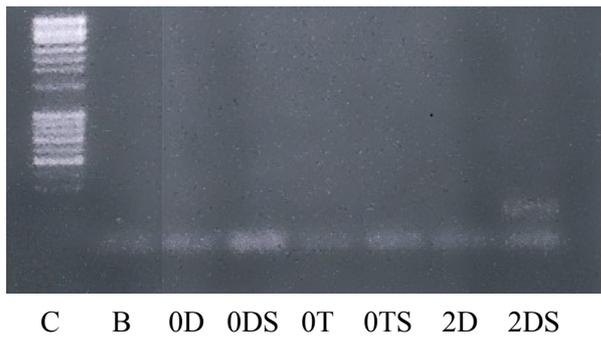
In tutte le analisi, differenze tra le variabili associate a probabilità  $p < 0.05$  sono state accettate come significative.

## 4. RISULTATI

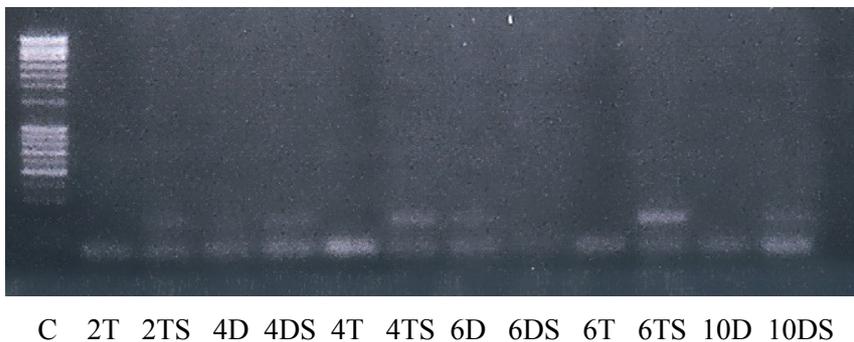
### 4.1 Hsp 70

#### 4.1.1 Espressione dell'mRNA per la forma inducibile delle Hsp70 e localizzazione immunostochimica di Hsp70 e Hsc70 in spigole diploidi e triploidi sottoposte a stress termico

**Espressione dell'mRNA per la forma inducibile delle Hsp70.** L'analisi mediante RT-PCR qualitativa ha evidenziato la presenza del messaggero in diversi campioni, già nei primissimi stadi dopo la schiusa. A 2 dph, sia nei diploidi che nei triploidi, la presenza del messaggero compare solo negli individui sottoposti a shock termico (Fig. 2). A 4 dph la situazione è analoga, anche se una debole banda compare anche nei diploidi del gruppo di controllo; negli individui a 6 dph, invece, l'mRNA per le Hsp70 compare solo nei diploidi di controllo e nei triploidi stressati. Per lo stadio a 10 dph il materiale prelevato dal gruppo dei triploidi è risultato insufficiente per effettuare l'analisi PCR, mentre nei diploidi il messaggero è stato riscontrato solo nel gruppo sottoposto a shock termico (Fig. 3).



**Fig. 2:** Espressione dell'mRNA codificante per la forma inducibile delle Hsp70 mediante metodica RT-PCR. C: calibratore, B: blank. Larve a 0 dph diploidi: controllo (0D) e stressate (0DS), larve a 0 dph triploidi: controllo (0T) e stressate (0TS); larve a 2 dph diploidi: controllo (2D) e stressate (2DS).



**Fig. 3:** Espressione dell'mRNA codificante per la forma inducibile di Hsp70 mediante metodica RT-PCR. C: calibratore. Larve a 2 dph triploidi: controllo (2T) e stressate (2TS); larve a 4 dph diploidi: controllo (4D) e stressate (4DS), larve a 4 dph triploidi: controllo (4T) e stressate (4TS); larve a 6 dph diploidi: controllo (6D) e stressate (6DS), larve a 6 dph triploidi: controllo (6T) e stressate (6TS), larve a 10 dph diploidi: controllo (10D) e stressate (10DS).

**Localizzazione immunistoichimica di Hsc70 e Hsp70.** Positività alla forma costitutiva delle Hsp70 è stata riscontrata in diversi tessuti nei campioni esaminati, fin dai primi stadi di sviluppo larvale. Non sembrano esservi evidenti differenze, dipendenti dalla ploidia, nella presenza e localizzazione della proteina; la forma costitutiva della proteina sembra, inoltre, essere ugualmente espressa sia negli animali sottoposti a stress termico che negli individui di controllo (Tab. 1 e 2).

Nelle larve a 2 dph la proteina è chiaramente espressa nel tessuto epiteliale della cute, nella mucosa del faringe e dell'apparato digerente; anche le fibre della muscolatura scheletrica in via di formazione e l'epitelio di rivestimento del sacco del tuorlo presentano una leggera positività. A 6 e 10 dph nuovi organi e tessuti iniziano a differenziarsi; tra questi, positività alla presenza delle Hsc70 è stata evidenziata nelle cellule del fegato e nella muscolatura striata cardiaca. Sono invece totalmente negativi il tessuto nervoso, sia a livello di encefalo che di midollo spinale, le cartilagini ed il tessuto connettivo denso.

Negli stadi più avanzati dello sviluppo larvale, a 30-45 dph, la positività si estende ad organi prima non completamente formati quali le branchie; inoltre, a livello di epitelio intestinale, a questi stadi risulta ben formata e visibile la struttura dell'orletto a spazzola degli enterociti, che risulta essere fortemente positiva. L'intero apparato digerente, dal faringe fino alla parte distale dell'intestino, nel complesso denota una costante positività nella propria componente epiteliale. Anche il fegato presenta zone ad evidente positività, mentre il pancreas risulta negativo. Nelle post-larve di 60 e 74 dph il quadro generale non cambia; positivi gli epiteli della cute, del faringe, stomaco e intestino. I risultati dell'analisi immunistoichimica sono riassunti in tabella 1 e 2.

Positività all'anticorpo anti-Hsp70 non è stata evidenziata in alcun campione esaminato, diploide o triploide, sia negli individui stressati che nei controlli.

**Tab. 1:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in larve di spigola diploidi e triploidi sottoposte a shock termico.

Tessuto	2 dph				6 dph				10 dph			
	Diploidi		Triploidi		Diploidi		Triploidi		Diploidi		Triploidi	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
<b>Encefalo</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Branchie</b>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<b>Faringe</b>	+	+	+	+	+	++	++	++	++	-	+	+
<b>Intestino</b>	+	+	+	++	++	+++	++	+	+/-	+	+	+
<b>Fegato</b>	*	*	*	*	+/-	++	+	+	+	+	+/-	+
<b>Rene</b>	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
<b>Pancreas</b>	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cute</b>	+	+	+/-	++	++	++	++	++	+	+	++	++
<b>Muscolo scheletrico</b>	+	+	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
<b>Sacco del tuorlo</b>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	*	*	*	*

Colorazione: -, negativa; +/-, debole, ma superiore al livello di base; +, moderata; ++, marcata; +++, forte.

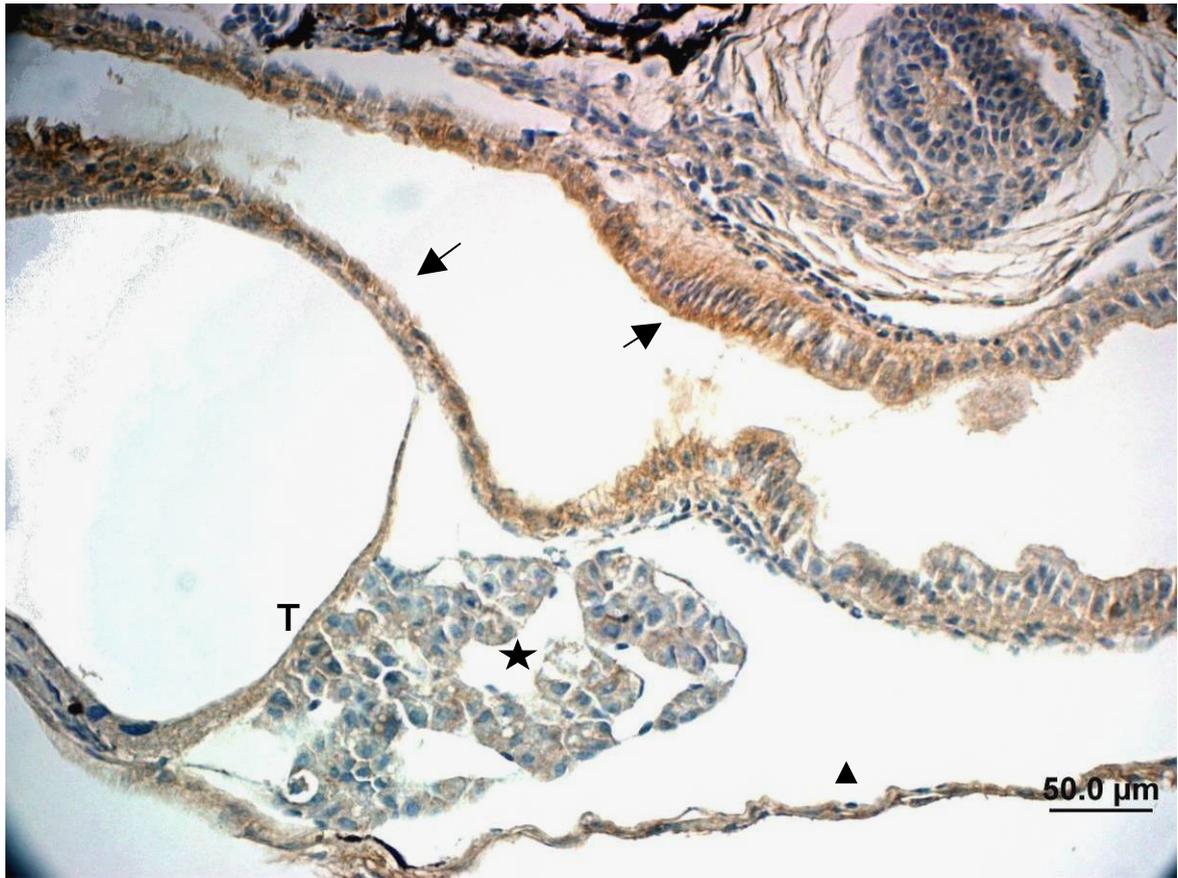
\*: Tessuto non completamente sviluppato o presente a questo stadio.

**Tab. 2:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in post-larve e avannotti di spigola diploidi e triploidi sottoposte a shock termico.

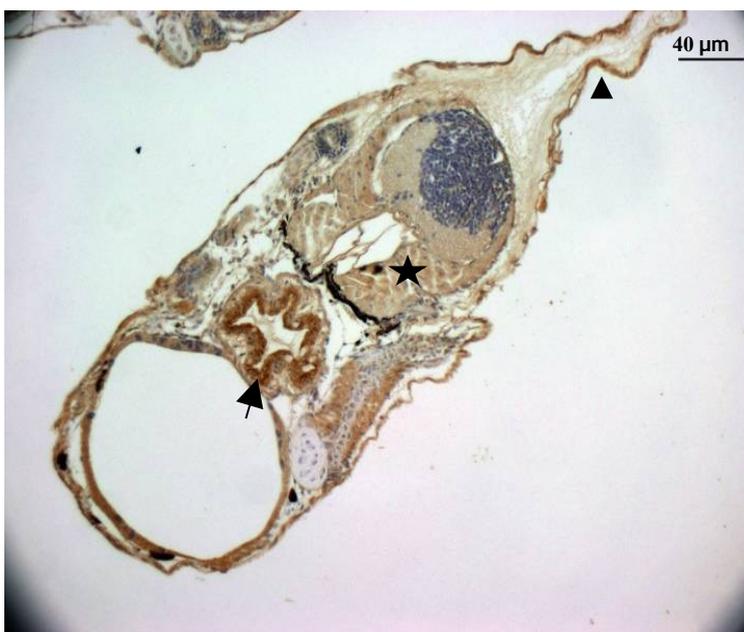
Tessuto	30-45 dph				60 dph				74 dph			
	Diploidi		Triploidi		Diploidi		Triploidi		Diploidi		Triploidi	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
<b>Encefalo</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Branchie</b>	+/-	+/-	++	+/-	+	+	+++	+++	++	++	+/-	+/-
<b>Intestino</b>	+	+/-	++	+	+	+/-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Faringe</b>	++	++	++	++	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-
<b>Fegato</b>	-	+/-	-	+	++	++	++	++	+	+	+/-	+/-
<b>Rene</b>	-	-	-	-	+	++	++	++	++	*	-	+/-
<b>Pancreas</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cute</b>	++	+++	+++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++
<b>Muscolo scheletrico</b>	-	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-

Colorazione: -, negativa; +/-, debole, ma superiore al livello di base; +, moderata; ++, marcata; +++, forte.

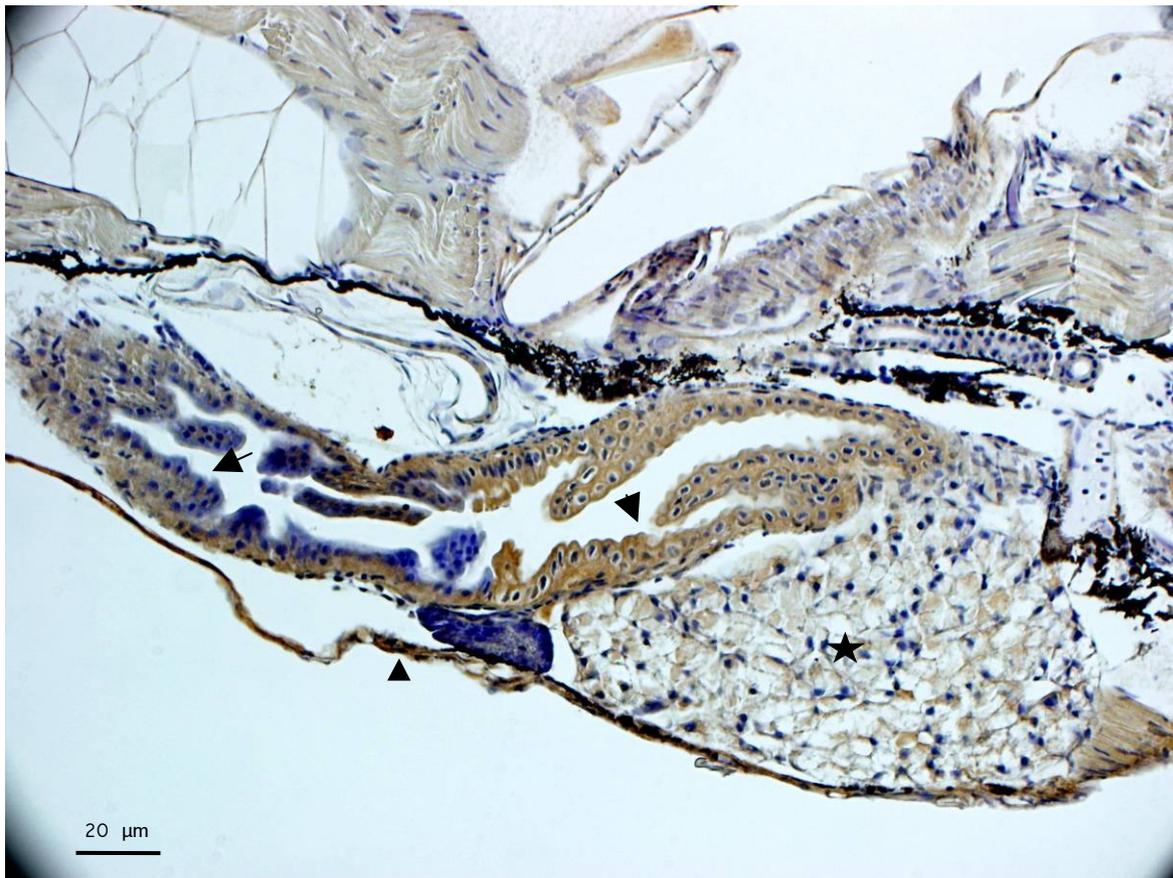
\*: Tessuto non completamente sviluppato o presente a questo stadio.



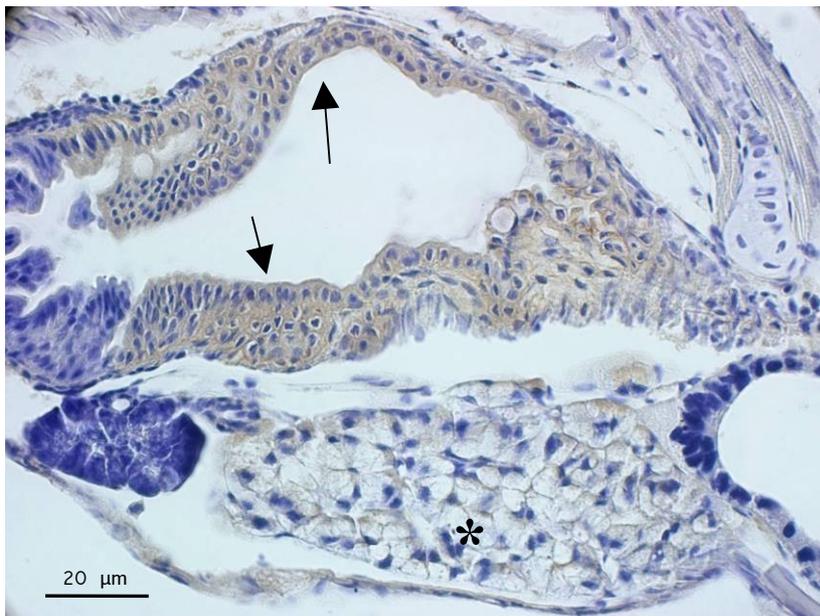
**Fig. 4:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in larva di spigola diploide a 6 dph; gruppo di controllo. Sezione longitudinale; è fortemente positiva all'anticorpo la mucosa del tubo digerente (freccia), diverse cellule del fegato (stella) e la cute (triangolo). Positiva anche la membrana di rivestimento del sacco vitellino (T).



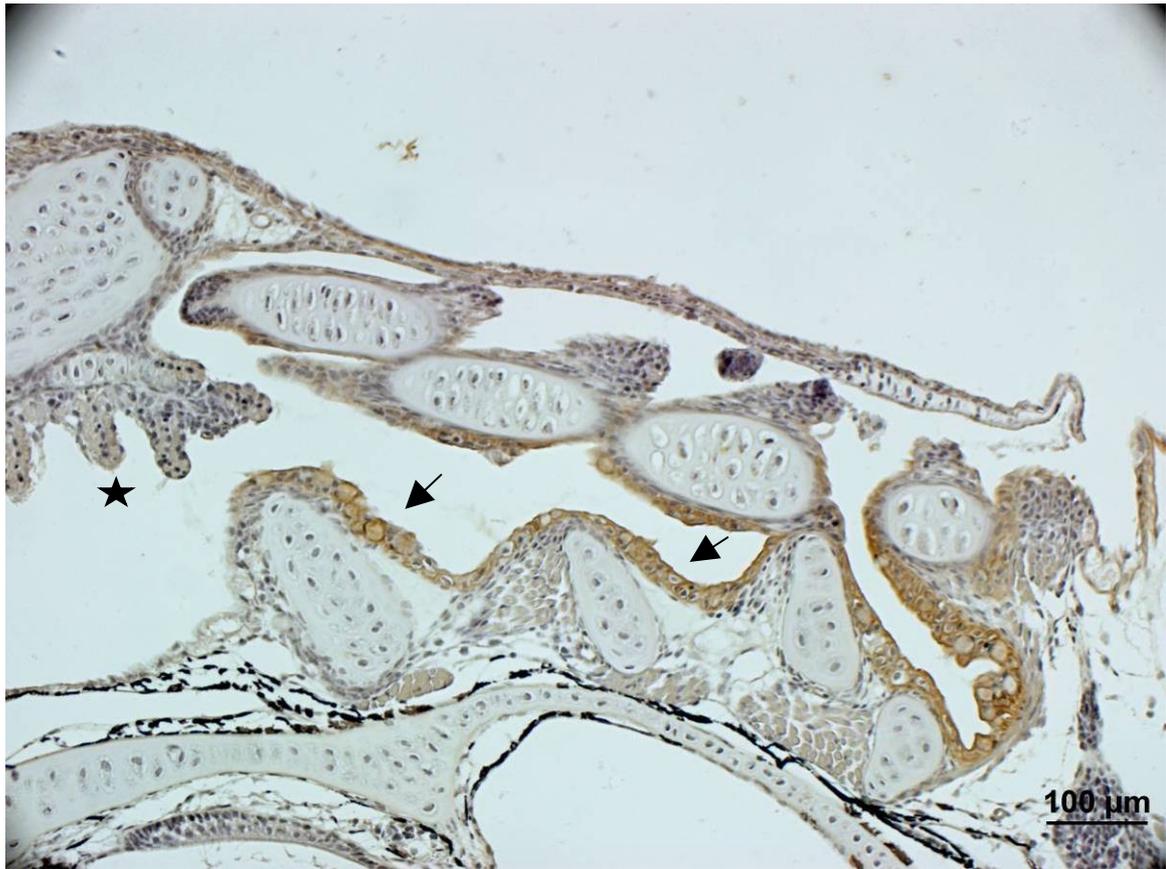
**Fig.5:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in larva di spigola diploide a 6 dph; individuo sottoposto a shock termico. Sezione trasversale; fortemente positiva la mucosa intestinale (freccia), la membrana di rivestimento del tuorlo (T), la cute (triangolo) e la muscolatura striata scheletrica (stella).



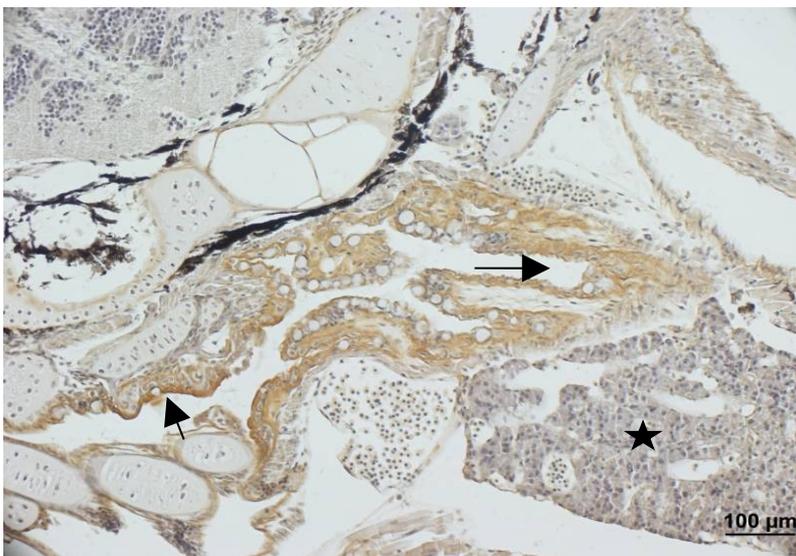
**Fig. 6:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in larva di spigola triploide a 10 dph; gruppo di controllo. Positive all'anticorpo la mucosa del digerente (freccie), il fegato (stella) e la cute (triangolo).



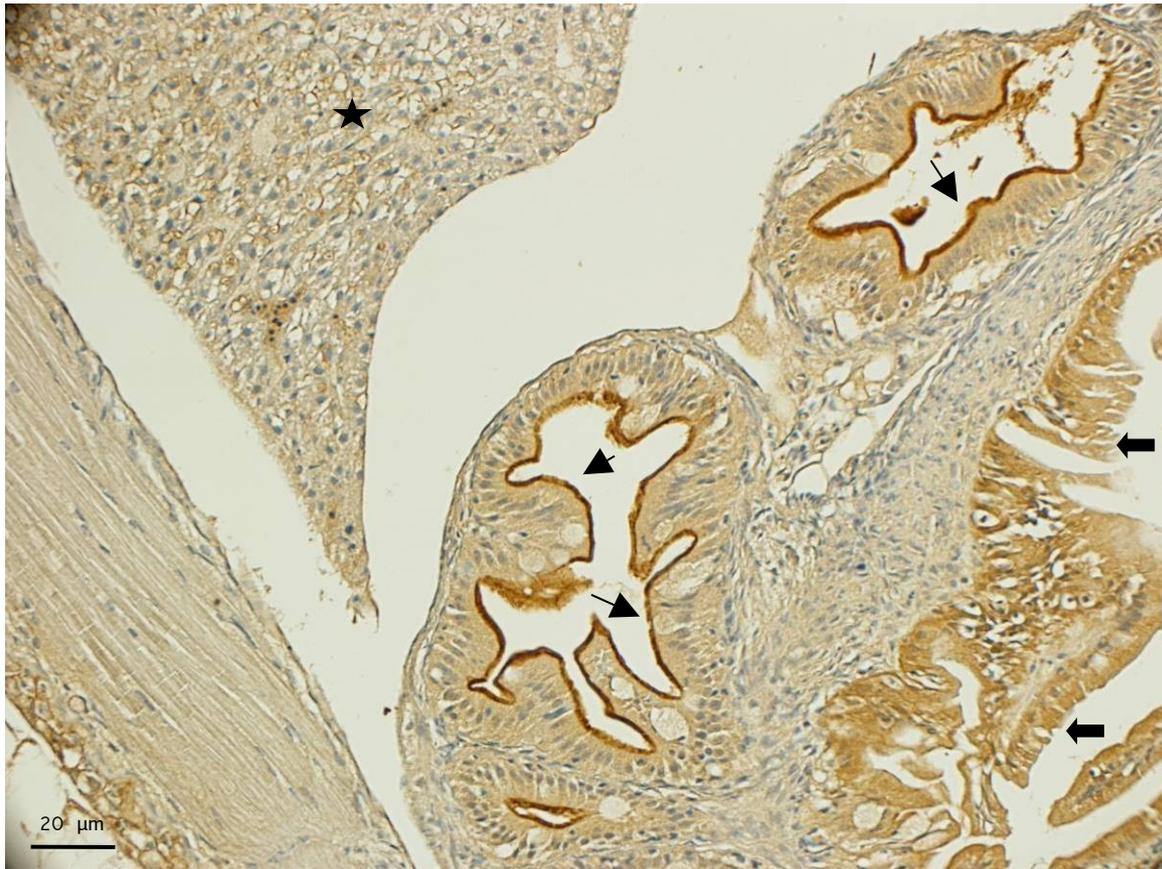
**Fig. 7:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in larva di spigola triploide a 10 dph; individuo sottoposto a shock termico. Sezione longitudinale; positiva la mucosa intestinale (freccie) e il fegato (asterisco).



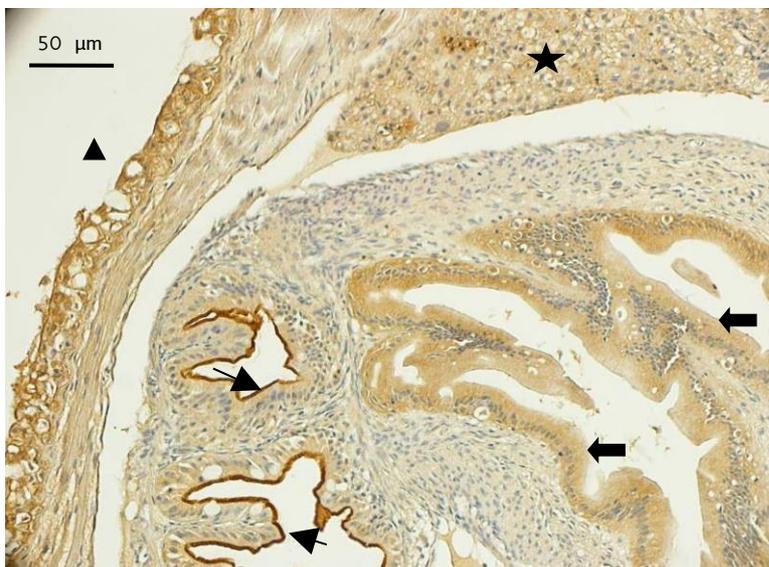
**Fig. 8:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in larva di spigola diploide a 30 dph; gruppo di controllo. Sezione longitudinale; ben evidente la mucosa del faringe, positiva all'anticorpo (freccie). Sulla sinistra è visibile l'abbozzo delle branchie (stella).



**Fig. 9:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in larva di spigola diploide a 30 dph; individuo sottoposto a shock termico. Sezione longitudinale; fortemente positiva la mucosa del faringe (freccie), debolmente positivo il fegato (stella).



**Fig. 10:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in larva di spigola triploide a 60 dph; gruppo di controllo. Sezione longitudinale; sulla destra è visibile la mucosa gastrica, caratterizzata da evidente positività in tutta la componente epiteliale (freccie in grassetto). Più al centro si notano sezioni trasversali della parte distale dell'intestino, in cui è visibile la zona dei microvilli ad elevata positività (freccie). Nella parte in alto a sinistra il fegato risulta positivo (stella).



**Fig. 11:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in larva di spigola triploide a 60 dph; individuo sottoposto a shock termico. Positivo il fegato (stella), la mucosa gastrica (freccie in grassetto), la cute (triangolo). Fortemente positivo l'orletto a spazzola nell'intestino prossimale (freccie).

#### **4.1.2 Analisi RT-PCR qualitativa e quantitativa e localizzazione immunostochimica di Hsp70 in spigole sottoposte a stress da trasporto**

**Dosaggio del cortisolo mediante RIA.** Per quanto riguarda le analisi dei livelli di cortisolo, sullo stadio larvale a 25 dph non è stato possibile effettuare un confronto statistico tra il gruppo di controllo e gli individui sottoposti a stress da trasporto, in quanto il materiale prelevato è risultato insufficiente alla creazione di un numero di “pool” statisticamente rilevante. Negli altri stadi, 40 e 80 dph, l’analisi ha rilevato un incremento altamente significativo nel livello di cortisolo tra i gruppi di controllo e quelli trasportati, indicando l’attivazione di una risposta fisiologica allo stress da trasporto. Anche il cortisolo dosato nel plasma degli adulti registra un aumento statisticamente significativo, confermando, anche in questo caso, l’effettiva insorgenza di stress negli animali trasportati. I risultati dell’analisi sono riassunti in tabella 4.

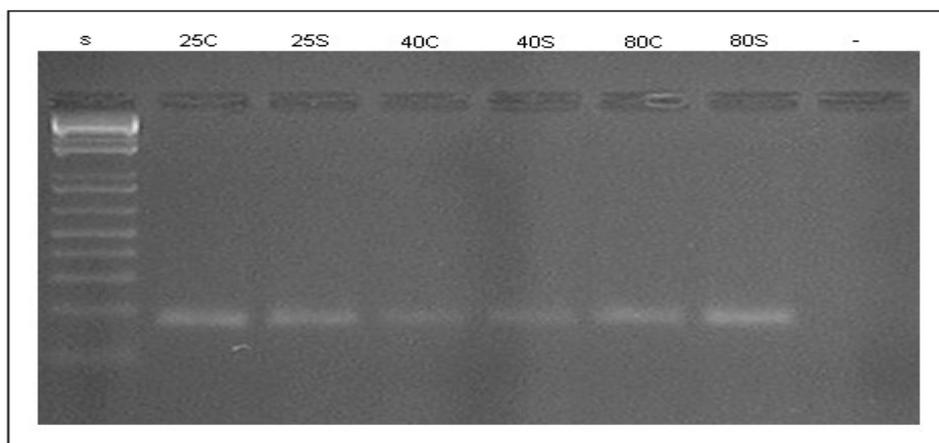
**Analisi RT-PCR qualitativa e quantitativa.** L’analisi qualitativa mediante RT-PCR ha rilevato l’attivazione del gene per la forma inducibile delle Hsp70 in tutti gli stadi iniziali di sviluppo della spigola: 25, 40 e 80 dph. L’espressione dell’mRNA è evidente sia negli individui di controllo che in quelli sottoposti a stress da trasporto, sebbene in questi ultimi l’espressione sembra essere maggiore (Fig. 12). Per quanto riguarda gli adulti l’espressione del messaggero per le Hsp70 è stata riscontrata nei seguenti tessuti: fegato (L), cervello (B), muscolo (M), branchie (G), rene (K), gonadi (Go), cuore (H), milza (S) e cute (Sk). Anche in questo caso l’espressione si evidenzia sia negli animali del gruppo di controllo (Fig. 13) che in quelli sottoposti a stress da trasporto (Fig. 14).

Per verificare la presenza di eventuali differenze nella produzione di mRNA tra i due gruppi, è stata effettuata un’analisi quantitativa del messaggero mediante Real-Time PCR. Dai risultati si evidenzia, come tendenza generale, una maggiore espressione del gene per le Hsp70 inducibili negli individui stressati, sebbene tali differenze siano statisticamente significative solo nei giovanili di 80 dph (test U di Mann/Whitney,  $p < 0,05$ ) e nel muscolo e cute degli adulti (ANOVA di Kruscal-Wallis,  $p < 0,05$ ) (Fig. 15).

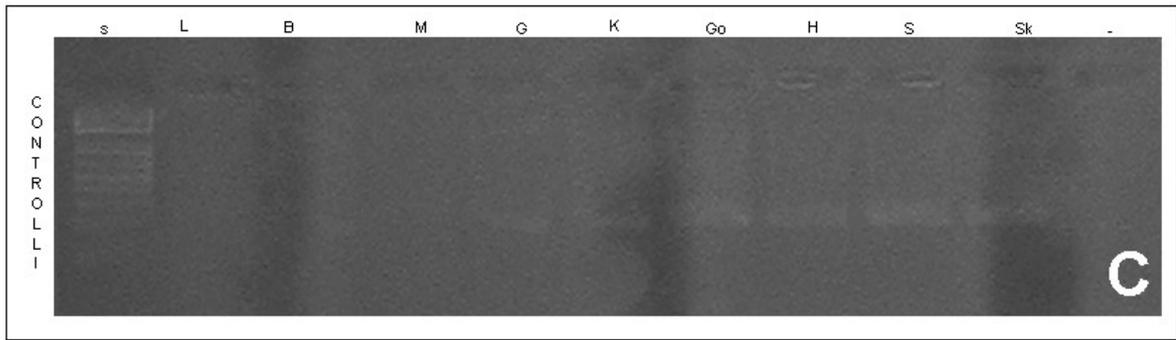
**Tab. 4.** Livelli di cortisolo presenti in “pool” di larve e avannotti e nel plasma di adulti di spigola sottoposti a stress da trasporto. Dati espressi come media  $\pm$  D.S.

		Peso corporeo (g)	n	Cortisolo (ng/g)	P
Larve 25 dph	Controllo	0.029 $\pm$ 0.002	2*	8.24 $\pm$ 1.3	--
	Stressato	0.028 $\pm$ 0.007	2*	44.1 $\pm$ 18.1	
Larve 40 dph	Controllo	0.05 $\pm$ 0.018	6**	35.8 $\pm$ 12.9	P<0.001
	Stressato	0.039 $\pm$ 0.01	6**	131.8 $\pm$ 17.1	
Avannotti 80 dph	Controllo	0.27 $\pm$ 0.05	7	12.9 $\pm$ 6.3	P<0.001
	Stressato	0.25 $\pm$ 0.04	8	60.2 $\pm$ 22.6	
		Peso corporeo (g)	n	Cortisolo (ng/ml)	P
Adulti	Controllo	223.6 $\pm$ 47.0	7	67.5 $\pm$ 30.8	P<0.001
	Stressato	214 $\pm$ 20.1	7	179.2 $\pm$ 44.1	

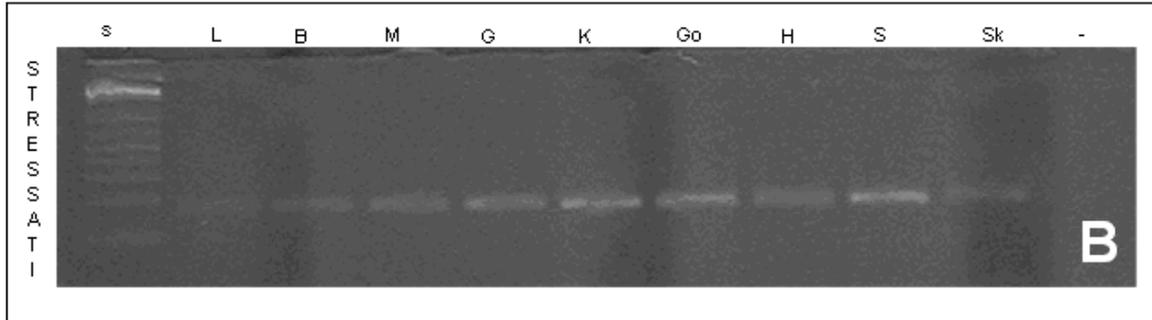
\* pool di 6 larve. \*\* pool di 2 larve.



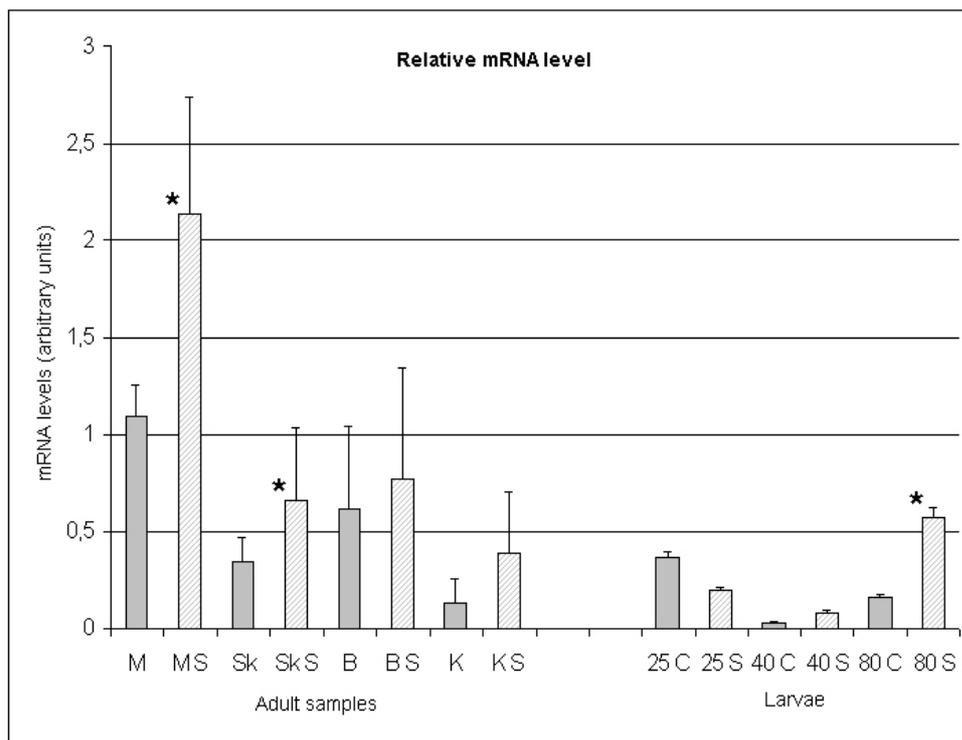
**Fig. 12:** Espressione dell’ mRNA codificante per la forma inducibile di Hsp70 mediante metodica RT-PCR in campioni di spigola; individui di 25, 40 e 80 dph sottoposti a stress da trasporto (S) e gruppi di controllo (C). Il simbolo (-) indica il controllo negativo, (s) indica le bande standard di riferimento.



**Fig. 13:** Espressione dell'mRNA codificante per la forma inducibile di Hsp70 mediante metodica RT-PCR in campioni di spigola adulta non stressata: fegato (L), cervello (B), muscolo (M), branchie (G), rene (K), gonadi (Go), cuore (H), milza (S) e cute (Sk).



**Fig. 14:** Espressione dell'mRNA codificante per la forma inducibile di Hsp70 mediante metodica RT-PCR in campioni di spigola adulta stressata: fegato (L), cervello (B), muscolo (M), branchie (G), rene (K), gonadi (Go), cuore (H), milza (S) e cute (Sk).



**Fig. 15:** Livelli relativi di mRNA per le Hsp70 inducibili in tessuti di adulto (grafico a sinistra) e in larve e giovanili (grafico a destra) di spigola: muscolo (M), cute (Sk), encefalo (B), rene (K). La lettera S indica i tessuti di individui sottoposti a stress da trasporto. Larve di 25, 40 e 80 dph del gruppo di controllo (C) e stressate (S). Il muscolo è stato utilizzato come calibratore; i valori si riferiscono alla media  $\pm$  D.S.; (\*) indica differenze tra i valori significativi,  $p < 0.05$ .

**Localizzazione immunoistochimica di Hsp70 costitutive e inducibili.** In genere, la forma costitutiva delle Hsp70 è stata localizzata in diversi tessuti, sia negli animali del gruppo di controllo che in quelli sottoposti a stress da trasporto, nei diversi stadi di sviluppo (Tab. 3). Durante lo stadio larvale, immunopositività è stata riscontrata nella muscolatura cardiaca, così come a livello di epitelio della cute, del faringe, esofago, intestino e branchie (Fig. 16, 17). Nell'epitelio intestinale risulta particolarmente positiva la zona dell'orletto a spazzola degli enterociti. Nelle branchie risultano positive alcune cellule epiteliali distribuite prevalentemente in corrispondenza delle lamelle secondarie. Nessuna positività è stata evidenziata a livello di muscolatura striata scheletrica.

Nello stadio post-larvale e giovanile risultano nuovamente positivi gli epiteli di cute, faringe, esofago, intestino e branchie, così come la muscolatura striata cardiaca. Ancora una volta risulta fortemente colorata la zona dell'orletto a spazzola dell'epitelio intestinale. Negativi pancreas, fegato e muscolatura striata scheletrica (Fig. 18).

Negli adulti, una decisa positività all'anticorpo è stata evidenziata nella muscolatura cardiaca e, nuovamente, negli epiteli di cute, intestino (orletto a spazzola) e lamelle branchiali secondarie (Fig. 19).

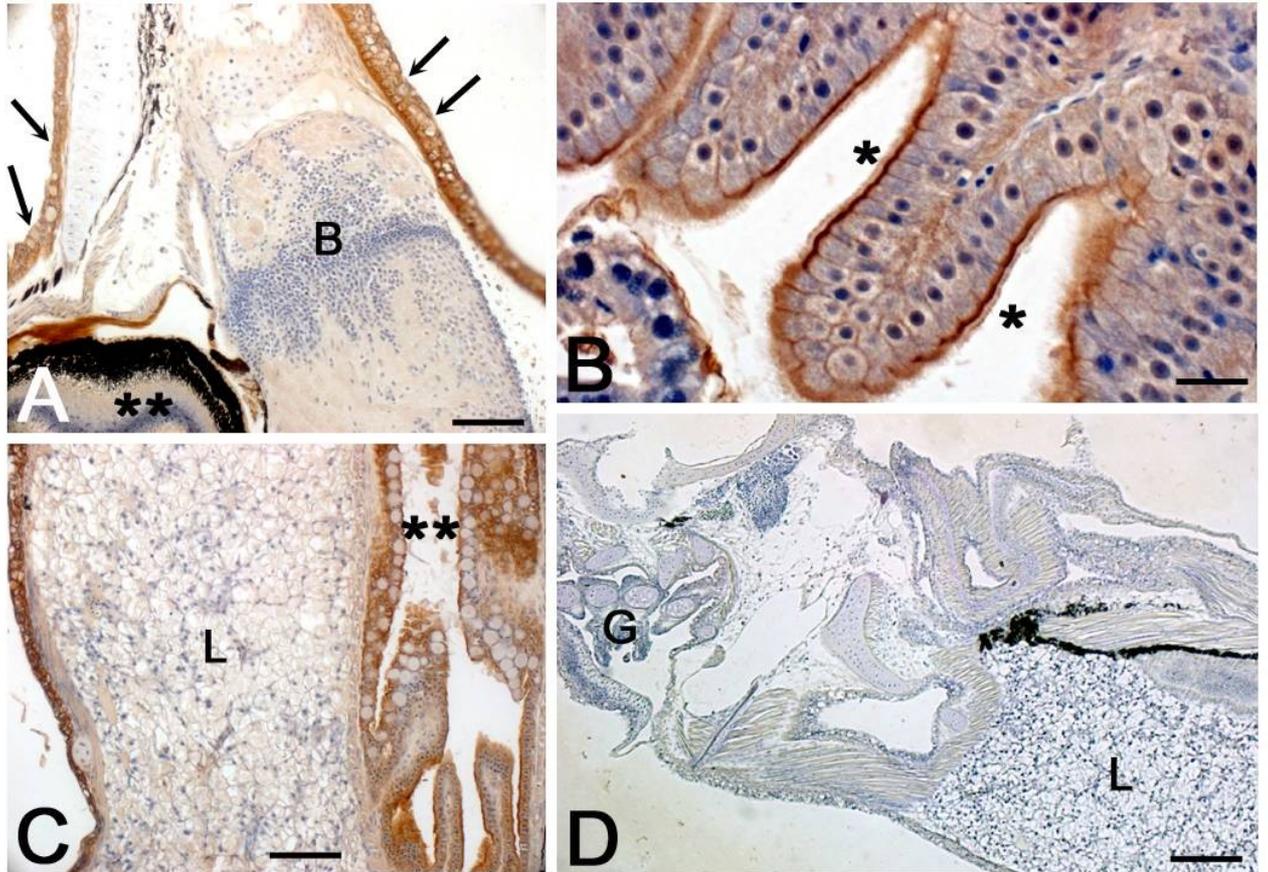
Positività alla forma inducibile delle Hsp70 non è stata riscontrata in alcuno degli stadi larvali o giovanili, ad eccezione di una debole positività nella muscolatura scheletrica degli individui ad 80 dph (Fig. 80-D).

Negli adulti, invece, una sensibile positività è stata evidenziata a livello di muscolatura scheletrica, ma solo nella parte costituita da fibre rosse; la zona costituita da fibre bianche risulta invece negativa (Fig. 19).

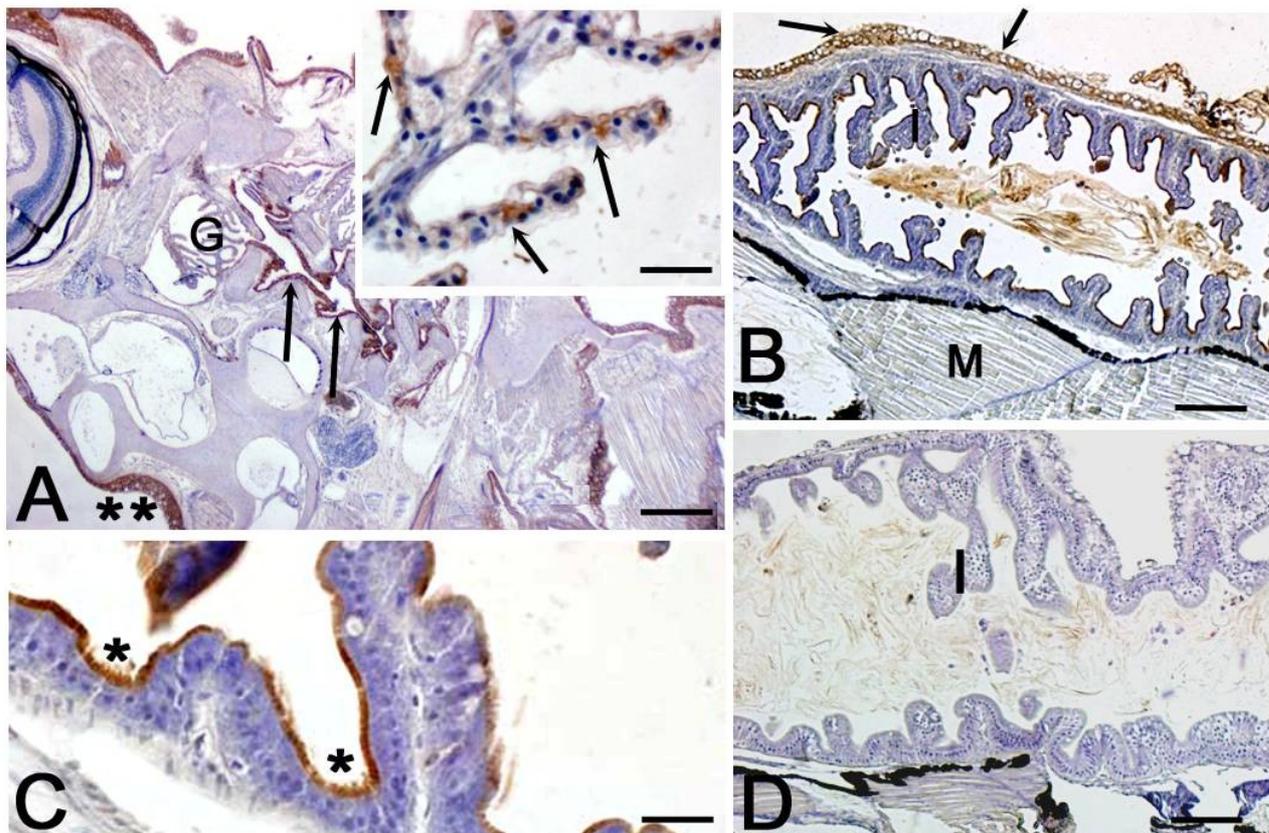
**Tab. 3.** Localizzazione immunistochemica di Hsc70 in spigole sottoposte a stress da trasporto.

TESSUTI	LARVE		AVANNOTTI		ADULTI	
	Controllo	Stressati	Controllo	Stressati	Controllo	Stressati
Epitelio intestinale	++	++	+++	++	++	++
Fegato	-/+	-	-	-	+	-
Pancreas	-	-	-	-	-	-
Muscolo scheletrico	-	-	-	-	-	-
Cuore	*	*	*	*	++	++
Epitelio branchiale	+	+	+	+	++	++
Epitelio renale	-	-	-	-	-	-
Cute	+++	+++	+++	+++	+++	+++

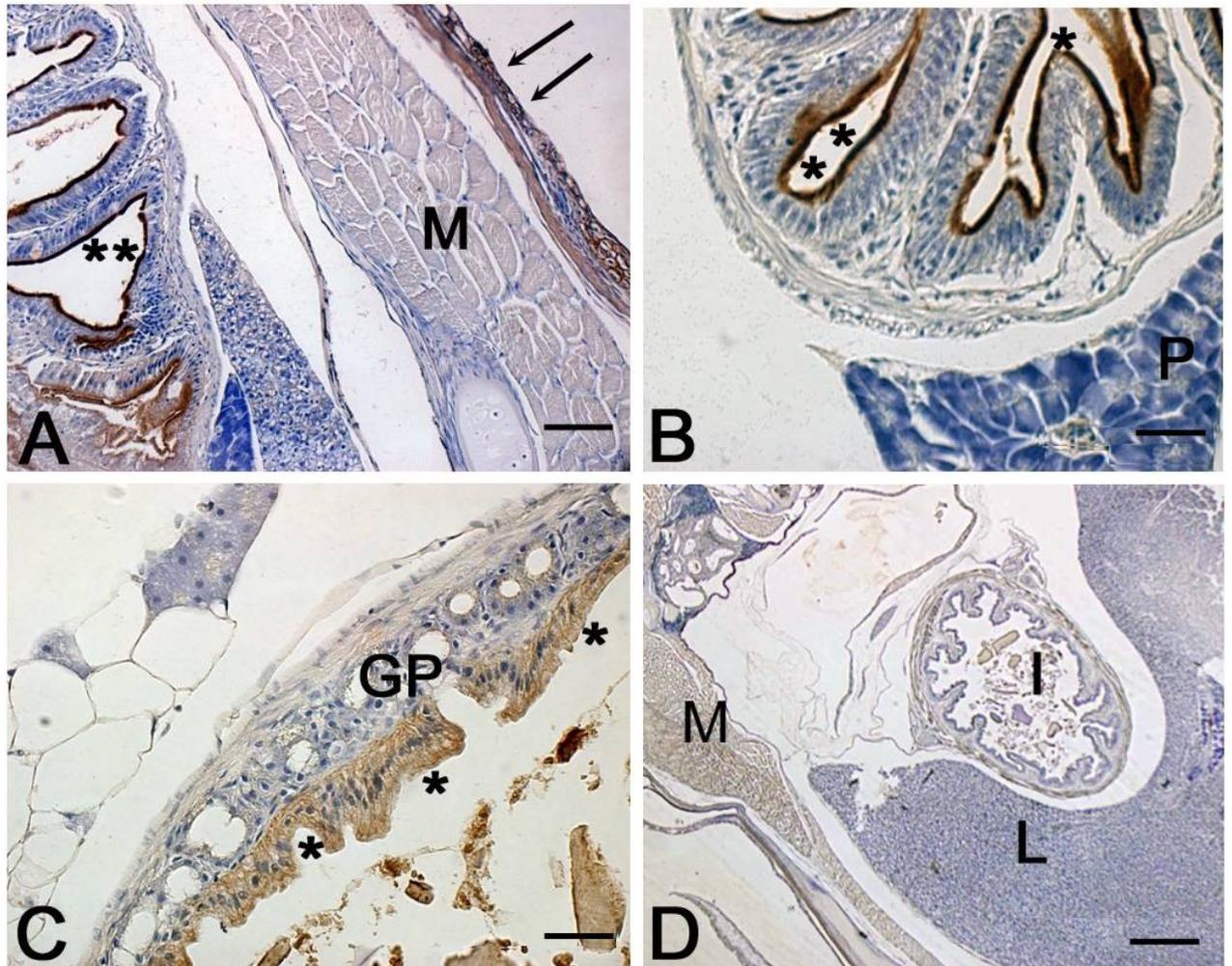
Legenda: + leggermente superiore alla colorazione di fondo; ++ moderatamente colorati; + ++ nettamente colorati; - non colorati; \*: tessuti non evidenziati nella sezione esaminata a questo stadio.



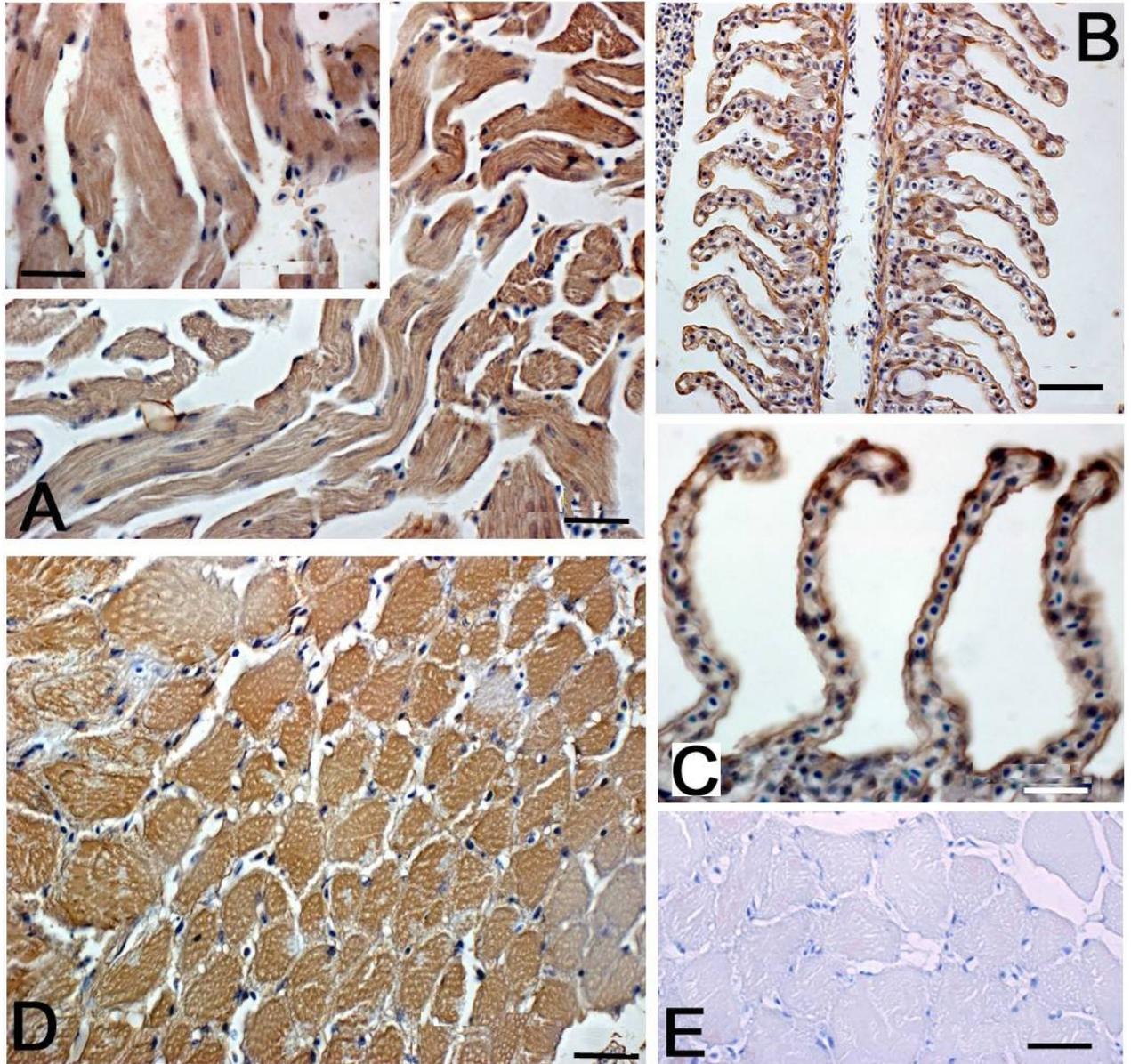
**Fig. 16:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in larve di spigola a 25 dph. **A,B,C:** gruppo di controllo; **D:** sottoposte a stress. Tutte le sezioni sono state contrastate con ematossilina. **A)** L'immunoreattività è presente nella cute (frecce), mentre cervello (B) ed occhio (asterischi) risultano essere negativi. **B)** L'orletto a spazzola dell'epitelio intestinale evidenzia immunopositività (asterischi). **C)** La sezione evidenzia una immunoreattività positiva nell'epitelio esofageo (asterischi) mentre le cellule caliciformi mucipare risultano essere negative. Anche il parenchima epatico è negativo (L). **D)** Localizzazione immunoistochimica delle Hsp70 (inducibile) in larve stressate di spigola a 25 dph. La sezione è contrastata con ematossilina. Tutti i tessuti risultano essere immunonegativi all'anticorpo anti-Hsp70. Barre: 40  $\mu\text{m}$  (A-C); 20  $\mu\text{m}$  (B); 100  $\mu\text{m}$  (D).



**Fig. 17:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 e Hsp70 in larve di spigola a 40 dph. A: gruppo di controllo; B,C,D: sottoposte a stress. Tutte le sezioni sono state contrastate con ematossilina. A) L'immunoreattività è presente nell'epitelio della cute (asterischi) e del faringe (frece). G: branchie. Insetto: particolare a maggiore ingrandimento dell'epitelio branchiale con cellule immunopositive (frece). B) Immunoreattività presente nella cute (frece) e nell'intestino (I). La muscolatura laterale (M) è immunonegativa. C) Particolare della mucosa intestinale con forte immunopositività nella zona dell'orletto a spazzola degli enterociti (asterischi). D) Localizzazione di Hsp70 (inducibili): tutti i tessuti sono immunonegativi; I: intestino. Barre: 200  $\mu\text{m}$  (A), 100  $\mu\text{m}$  (B-D), 10  $\mu\text{m}$  (C, inserto in A).



**Fig. 18:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 e Hsp70 in avannotti di spigola a 80 dph. A,B: gruppo di controllo; C,D: sottoposti a stress. Tutte le sezioni sono state contrastate con ematossilina. **A)** Immunoreattività evidente nell'epitelio dell'intestino (asterischi), mentre la muscolatura del tronco (M) è negativa. Immunopositiva anche la cute (freccie). **B)** Enterociti dell'intestino con immunopositività localizzata nell'orletto a spazzola (asterischi). Pancreas (P) negativo. **C)** Immunopositività a livello di epitelio della mucosa gastrica (asterischi), ma negative le fossette gastriche (GP). **D)** Immunolocalizzazione di Hsp70 (inducibili). Tutti i tessuti sono negativi, sebbene la muscolatura scheletrica (M) presenti una debole immunocolorazione. I: intestino; L: fegato. Barre: 40  $\mu$ m (A), 10  $\mu$ m (B), 20  $\mu$ m (C), 40  $\mu$ m (D).



**Fig. 19:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 e Hsp70 in adulti di spigola. C: individuo di controllo; A, B, D, E: individui stressati. Tutte le sezioni sono state contrastate con ematossilina. **A)** Muscolatura cardiaca immunopositiva alle Hsc70. L'inserto riporta, per confronto, lo stesso tessuto in un animale di controllo, anch'esso immunopositivo. **B-C)** Nelle branchie degli animali stressati e di controllo, rispettivamente, l'immunoreattività è presente a livello di epitelio dei filamenti primari e secondari. **D)** Sezione trasversale di muscolatura rossa, immunopositiva all'anticorpo per le Hsp70. **E)** Sezione trasversale di muscolatura bianca, immunonegativa all'anticorpo per le Hsp70. Barre: 20  $\mu$ m (A, inserto in A, B, D-E), 10  $\mu$ m (C).

#### 4.1.3 Localizzazione immunoistochimica di Hsp70 costitutive e inducibili in carpa (*Cyprinus carpio*) e trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) sottoposte a stress da trasporto

I valori di concentrazione plasmatica del cortisolo, per entrambe le specie, evidenziano differenze altamente significative tra i controlli e gli individui sottoposti a stress da trasporto (test t di Student,  $p < 0.05$ ). Nella carpa i valori del cortisolo nei controlli si attestano su valori di  $80.7 \pm 42.6$  ng/ml, mentre negli individui trasportati raggiungono i  $396 \pm 192$  ng/ml; nella trota, invece, l'ormone varia da  $4.8 \pm 4$  ng/ml a  $138.7 \pm 48.2$  ng/ml rispettivamente nei controlli e negli stressati. I risultati ottenuti tramite analisi immunoistochimica per le due specie sono riassunti in tabella 5.

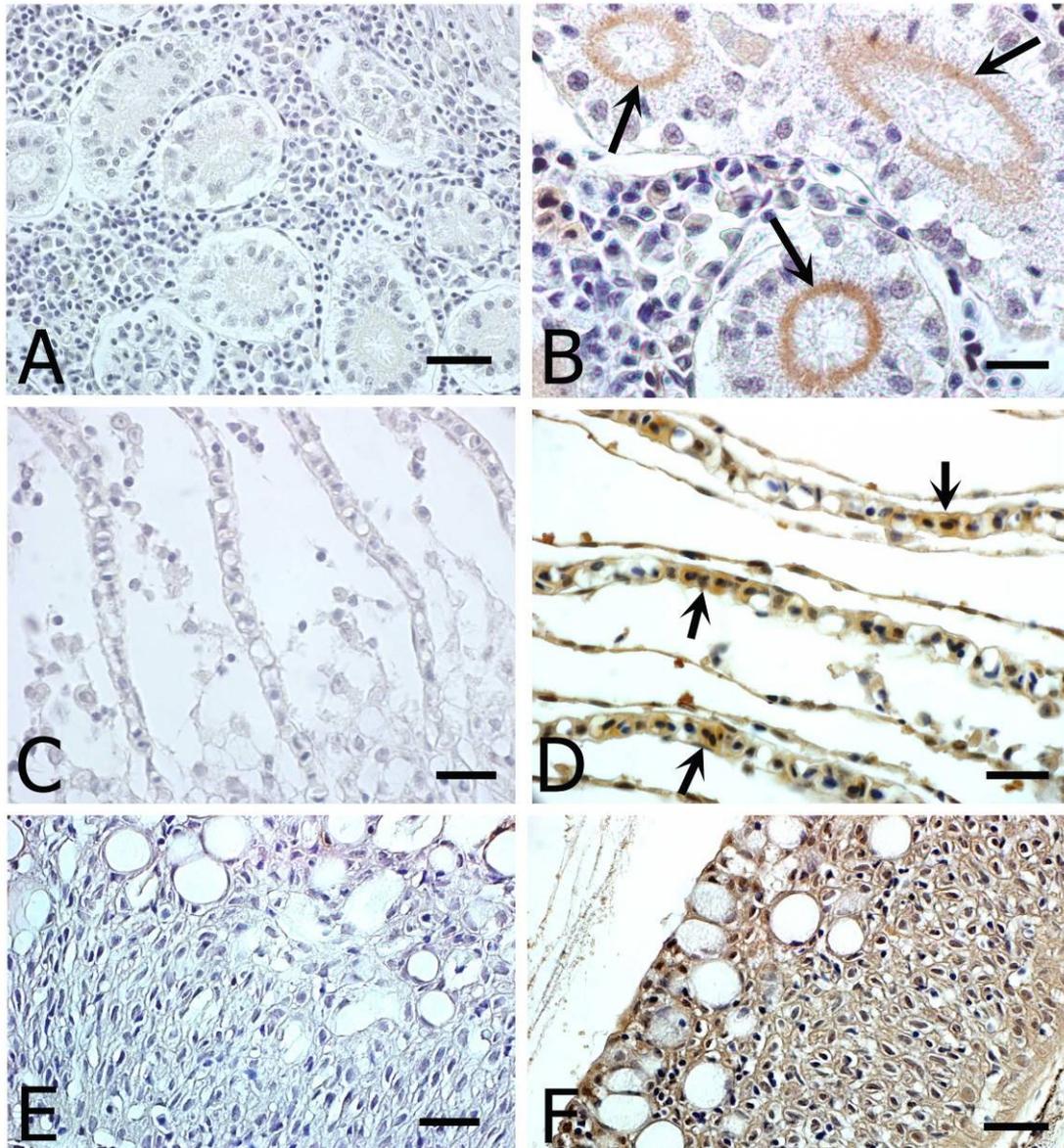
**Carpa.** Nella carpa, immunopositività alle Hsc70 è stata riscontrata solamente nella muscolatura rossa scheletrica, dove si evidenzia una debole colorazione sia negli individui di controllo che in quelli sottoposti a stress (tabella 5). La muscolatura rossa risulta leggermente immunopositiva anche all'anticorpo anti-Hsp70 (inducibile) negli individui di controllo, mentre i rimanenti tessuti risultano negativi (tabella 5). Negli individui sottoposti a stress da trasporto, positività alle Hsp70 è stata evidenziata nel citoplasma apicale e nell'orletto a spazzola delle cellule epiteliali dei tubuli renali, nell'epitelio branchiale e nell'epidermide della cute (fig. 20).

**Trota iridea.** Immunoreattività all'anticorpo anti Hsc70 è stata riscontrata sia nel gruppo di controllo che negli animali trasportati; i tessuti che risultano essere positivi sono: l'epitelio delle lamelle branchiali primarie e secondarie, della cute e della mucosa intestinale. Una debole immunoreattività compare anche nelle fibre muscolari rosse del gruppo di controllo. Nelle branchie, la positività riscontrata, sembra occupare una porzione di epitelio maggiore negli individui stressati. Positività alla forma inducibile delle Hsp70 non è stata riscontrata in alcun tessuto (fig. 21).

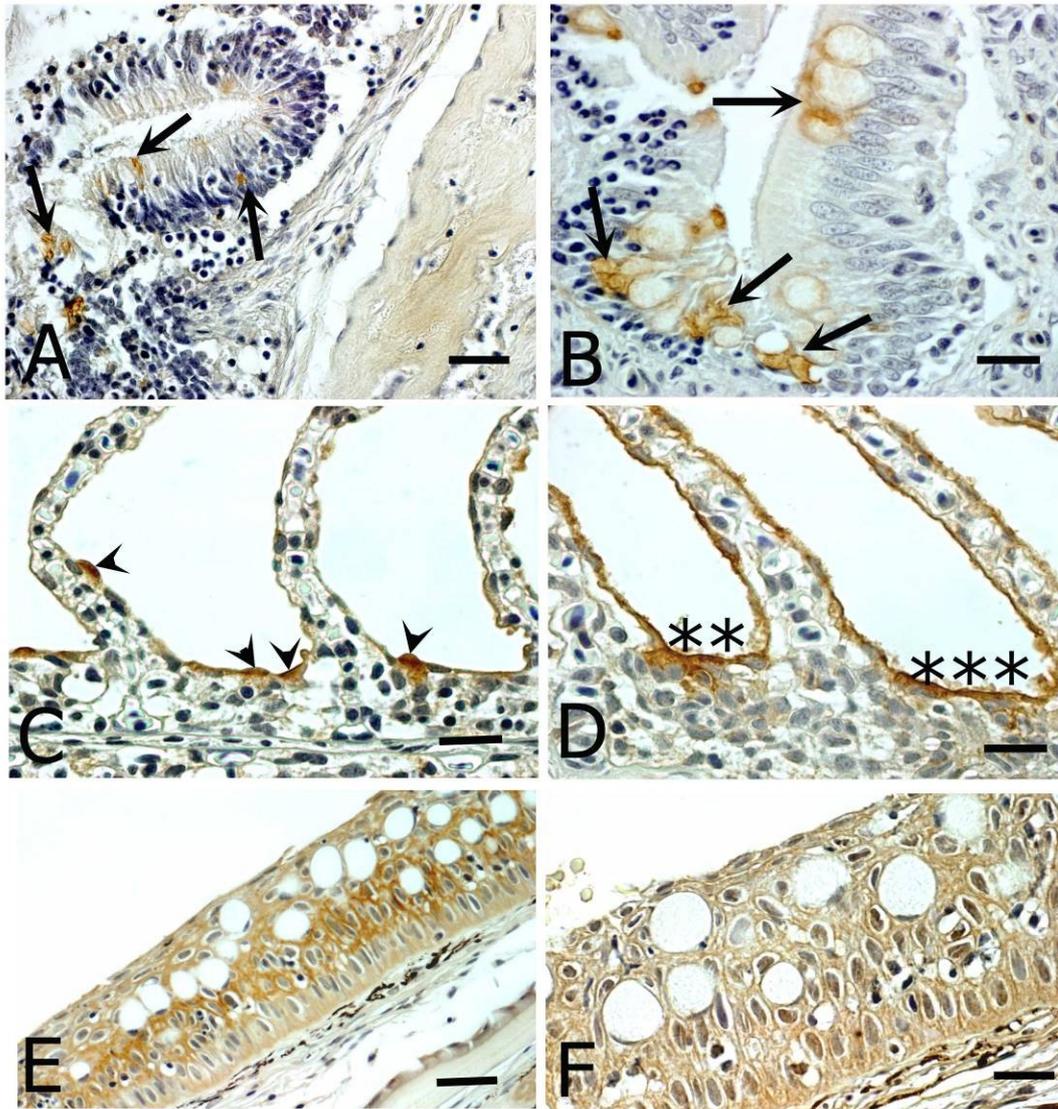
Tabella 5. Localizzazione immunistochemica di Hsc70 e Hsp70 in carpa e trota sottoposte a stress da trasporto.

Tessuto	Carpa				Trota			
	Hsc70		Hsp70		Hsc70		Hsp70	
	Controllo	Stressato	Controllo	Stressato	Controllo	Stressato	Controllo	Stressato
Muscolo scheletrico	+R	+/-R	+R	-R	+/-R	-R	-R	-R
Encefalo	-	-	-	-	-	-	-	-
Epitelio intestinale	-	-	-	-	+	++	-	-
Epitelio tubuli renali	-	-	-	+	*	*	*	*
Branchie	-	-	-	+	++	+++	-	-
Cute	-	-	-	++	++	++	-	-
Fegato	-	-	-	-	-	-	-	-
Pancreas	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: + leggermente superiore alla colorazione di fondo; ++ moderatamente colorati; +++ nettamente colorati; - non colorati; \*: tessuti non evidenziati nella sezione esaminata a questo stadio. R: muscolo rosso, B: muscolo bianco.



**Fig. 20:** Localizzazione immunohistochimica di Hsp70 in adulti di carpa. **A, C, E:** gruppo di controllo. **B, D, F:** animali sottoposti a stress da trasporto. Tutte le sezioni sono state contrastate con ematossilina. **A)** Parenchima renale con sezioni trasversali di alcuni tubuli renali, negativi all'anticorpo. **B)** Cellule dell'epitelio dei tubuli renali positive alle Hsp70 negli individui stressati (freccie). **C)** Epitelio delle branchie, negativo. **D)** Epitelio branchiale nella zona delle lamelle secondarie, positivo negli stressati (freccie). **E)** Epidermide negativa. **F)** Cellule epiteliali della cute positive negli individui stressati. Barre: **A,** 20  $\mu\text{m}$ ; **B,** 10  $\mu\text{m}$ ; **C-D,** 12.5  $\mu\text{m}$ ; **E-F,** 20  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 21:** Localizzazione immunoistochimica di Hsc70 in adulti di trota. A, C, E: gruppo di controllo. B, D, F: animali sottoposti a stress. Tutte le sezioni sono state contrastate con ematossilina. A) Epitelio intestinale con alcune cellule positive (freccie). B) Negli stressati, le cellule epiteliali denotano una moderata positività, a livello delle cellule mucipare (freccie). C-D) Una marcata positività caratterizza le cellule epiteliali delle branchie, sia a livello di lamelle primarie che secondarie; negli individui stressati (D) la porzione di epitelio immunopositiva sembra maggiore (asterischi) che nei controlli (freccie). E-F) Nella cute di entrambi i gruppi, controlli e stressati, è evidente una diffusa immunopositività. Barre: A, 20  $\mu\text{m}$ ; B, 12,5  $\mu\text{m}$ ; C-D, 10  $\mu\text{m}$ ; E, 25  $\mu\text{m}$ ; F, 20  $\mu\text{m}$ .

## **4.2 Rodlet cells**

### **4.2.1 Influenza dello stress da sovraffollamento e confinamento sul numero di “rodlet cells” nella spigola**

**Dosaggio del cortisolo mediante RIA.** I dati sul cortisolo plasmatico ottenuti mediante dosaggio RIA hanno evidenziato differenze significative, nei livelli dell'ormone, tra il gruppo di controllo e i gruppi nelle diverse condizioni di stress. In particolare, il cortisolo aumenta di quattro volte il proprio valore, rispetto al controllo, in tutti gli animali ad eccezione di quelli mantenuti a bassa densità (20 Kg/m<sup>3</sup>) per 24 ore. I risultati sono riassunti in tabella 6.

**Microscopia ottica e numero di RCs nelle branchie.** Il conteggio delle RCs effettuato da due diversi operatori non ha prodotto differenze significative (test t di Student,  $p < 0,05$ ), indicando una buona oggettività del metodo. Le RCs aumentano in modo significativo, rispetto al controllo, nei pesci appartenenti a tutte le diverse condizioni sperimentali (test ANOVA a una via,  $p < 0,05$ ); inoltre, dopo 2 ore di confinamento, le RCs aumentano maggiormente negli individui posti a densità più elevata rispetto a quelli a bassa densità (test *post-hoc*,  $p < 0,05$ ). Nelle 24 ore successive, si assiste ad un ulteriore aumento delle RCs rispetto al numero presente nelle prime 2 ore e, ancora una volta, negli individui posti ad elevata densità l'aumento si rivela significativamente maggiore (test *post-hoc*,  $p < 0,05$ ). I risultati sono riassunti in tabella 6.

E' interessante sottolineare che in diverse branchie analizzate, appartenenti agli individui in condizioni stressanti, le RCs, oltre che essere visibilmente in numero maggiore, tendono ad aggregarsi in gruppi numerosi o “cluster” particolarmente abbondanti nelle anse tra due lamelle secondarie adiacenti (Fig. 22-B, 23-A). Gruppi numerosi si osservano anche alla base delle lamelle primarie, ove le lamelle secondarie sono assenti (Fig. 22-C). Queste formazioni non sono state evidenziate nelle branchie del gruppo di controllo.

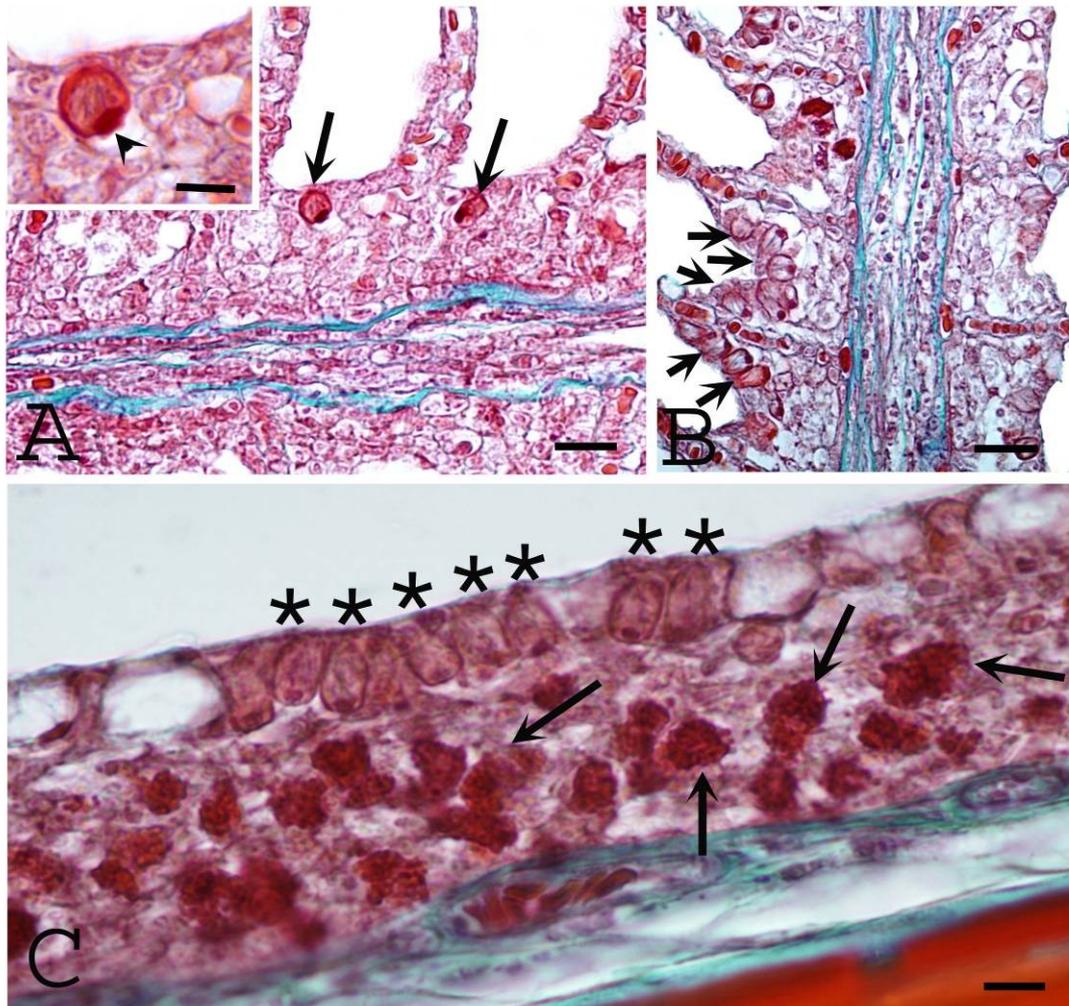
**Microscopia elettronica e ultrastruttura.** La presenza delle RCs è stata osservata, negli animali di controllo, sia nelle lamelle primarie che nell'epitelio delle lamelle secondarie. In entrambi i casi esse appaiono isolate e, con frequenza, si collocano tra due cellule del cloro adiacenti nello spazio tra le lamelle secondarie (Fig. 24-a). Appaiono a diversi stadi di maturazione; nello stadio pienamente maturo presentano forma ovale e sono caratterizzate da una spessa parete fibrillare sottostante il plasmalemma. Il nucleo è eccentrico in posizione basale e contenente un anello periferico di eterocromatina, mentre la componente citoplasmatica apicale è ricca di vescicole e inclusioni derivanti dal RER, le cosiddette “rodlets”. Le “rodlets” hanno forma clavata e sono caratterizzate da un alone chiaro più esterno e da una parte centrale più densa (Fig. 24-b); si estendono per buona parte della lunghezza della cellula. La zona apicale della cellula contiene la maggior parte degli organelli, in modo particolare i mitocondri, che appaiono numerosi ed allungati. In sezione longitudinale le RCs appaiono affusolate nella parte apicale; ciò risulta ancora più evidente quando esse raggiungono lo spazio luminale (Fig. 24-c), ove si ancorano tramite giunzioni aderenti alle cellule epiteliali confinanti. Quando raggiungono questa posizione, nella parte apicale la parete fibrillare si assottiglia e la cellula protrude verso lo spazio luminale (Fig. 24-d).

Nelle branchie degli individui stressati sono stati osservati diversi aggregati di “rodlet cells”, soprattutto alla base delle lamelle secondarie (Fig. 25-a). In alcuni casi sono state osservate RCs nell'atto di estrudere nello spazio interstiziale le loro tipiche inclusioni (rodlets) (Fig. 25-d). In diversi casi sono stati osservati in vicinanza delle RCs diversi granulociti eosinofili (ECG) (Fig. 26-a). Spesso si osservano alla base dei cluster alcune RCs ad uno stadio più immaturo, caratterizzate da una forma più circolare e da parete più fine; il nucleo è molto ampio e il citoplasma è quasi interamente occupate da reticolo endoplasmatico ruvido (Fig. 26-b). In alcuni cluster è possibile evidenziare e descrivere diverse fasi dell'attività secretoria delle RCs: 1) cellule in cui inizia la disgregazione della membrana plasmatica nella zona apicale (Fig. 26-b); 2) cellule in piena fase di escrezione del citoplasma apicale (Fig. 26-c); 3) cellule che hanno completamente riversato il loro contenuto nello spazio interstiziale (Fig. 26-d).

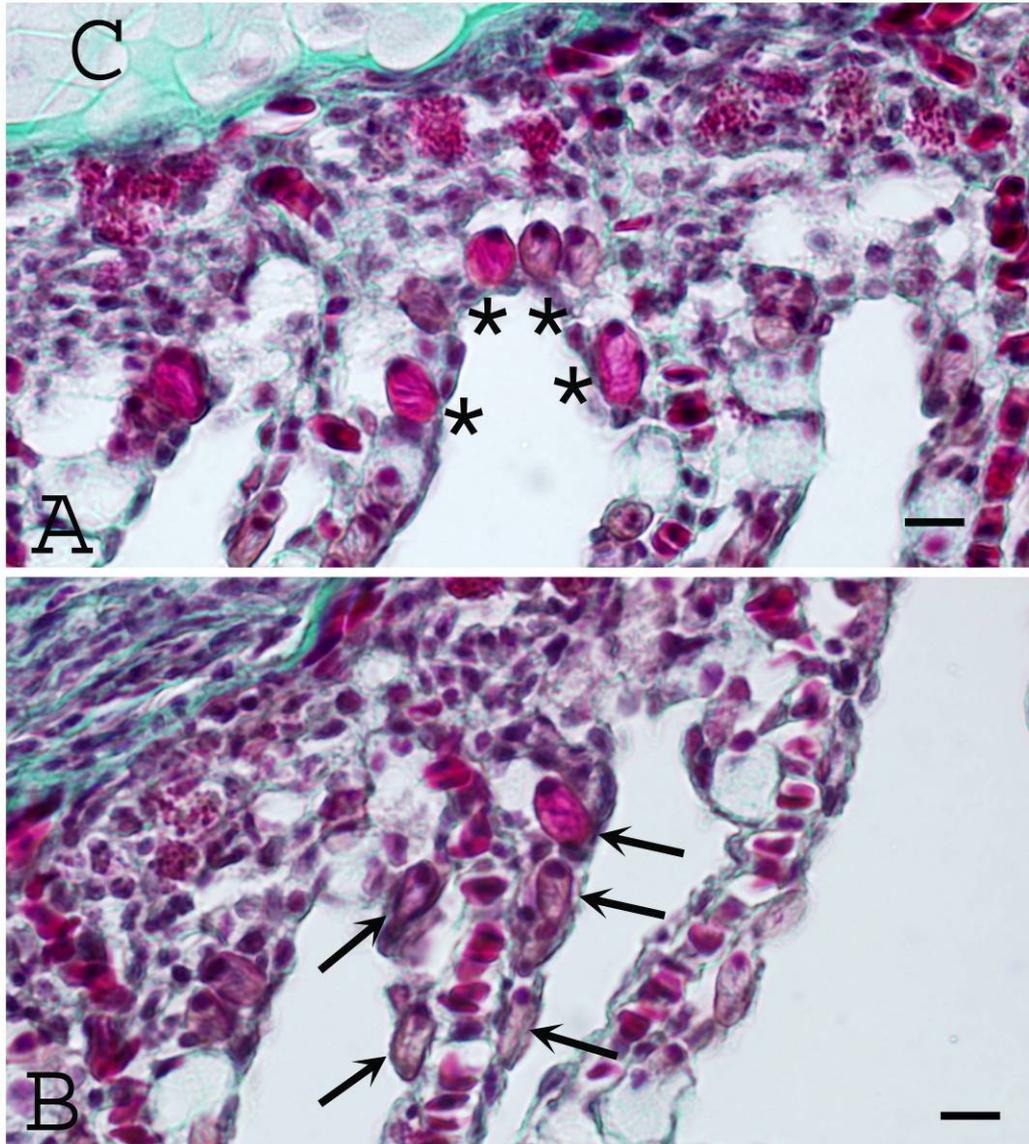
**Tabella 6.** Media  $\pm$  D.S. dei livelli di cortisolo e del numero di “rodlet cells” nei diversi gruppi sperimentali.

	Controllo	T2D20	T2D80	T24D20	T24D80
Cortisolo ng/ml	174 $\pm$ 44.1 <sup>a</sup>	627 $\pm$ 295 <sup>b</sup>	601 $\pm$ 191 <sup>b</sup>	451 $\pm$ 253 <sup>a,b</sup>	679 $\pm$ 265 <sup>b</sup>
N° RCs	2.40 $\pm$ 2.37 <sup>a</sup>	3.8 $\pm$ 3.24 <sup>b</sup>	6.36 $\pm$ 5.22 <sup>c</sup>	5.98 $\pm$ 4.25 <sup>c</sup>	9.22 $\pm$ 7.37 <sup>d</sup>

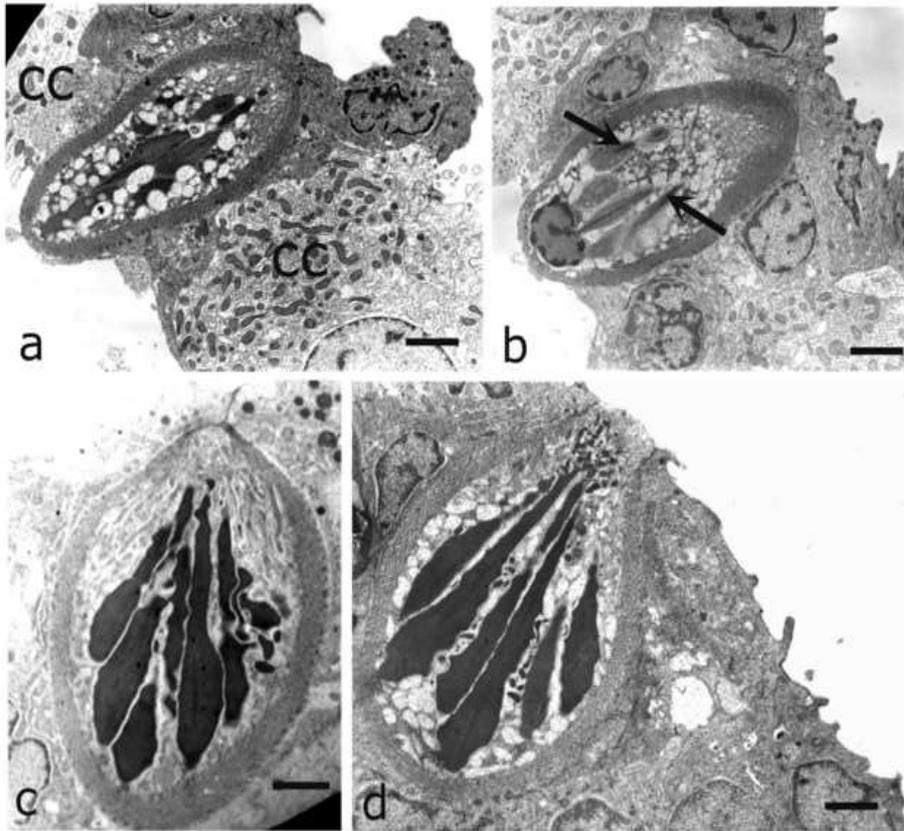
Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze significative nei valori delle medie (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Il numero di RCs in ogni gruppo è espresso come la media del numero di “rodlet cells” presenti in 10 diverse aree (con estensione di 65,000  $\mu\text{m}^2$ ) scelte a caso in un campione di branchia per ogni pesce (N=5).



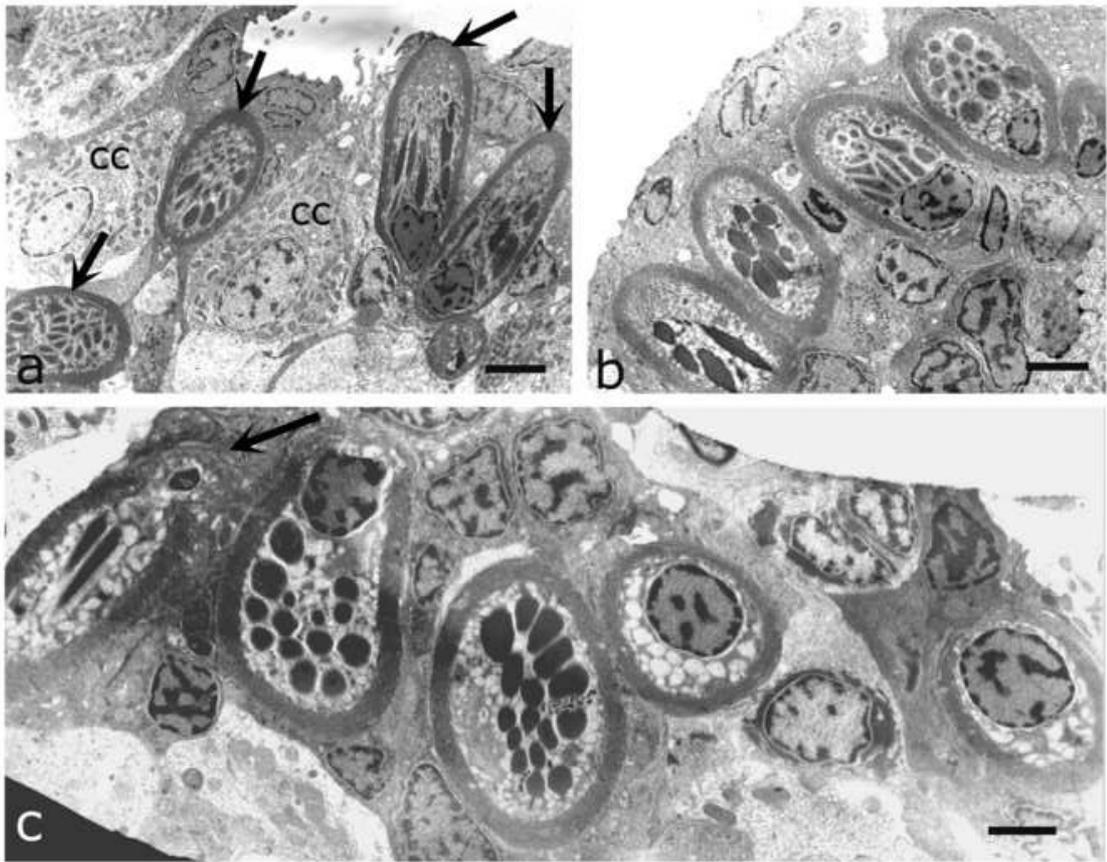
**Fig. 22:** Sezioni di branchia di spigola. **A:** animale di controllo; **B-C:** animale confinato rispettivamente per 2 e 24 ore ad alta densità. Colorazione tricromica di Masson. **A)** Solo poche RCs chiaramente visibili (freccie) tra le lamelle secondarie. **B)** Gruppi di RCs (freccie) nello spazio che separa due lamelle secondarie adiacenti. **C)** Gruppi di RCs (asterischi) distribuite lungo l'epitelio di una lamella primaria. Visibili anche numerosi granulociti eosinofili (freccie). Barre: A 20  $\mu\text{m}$ ; B, 20  $\mu\text{m}$ ; C, 10  $\mu\text{m}$ .



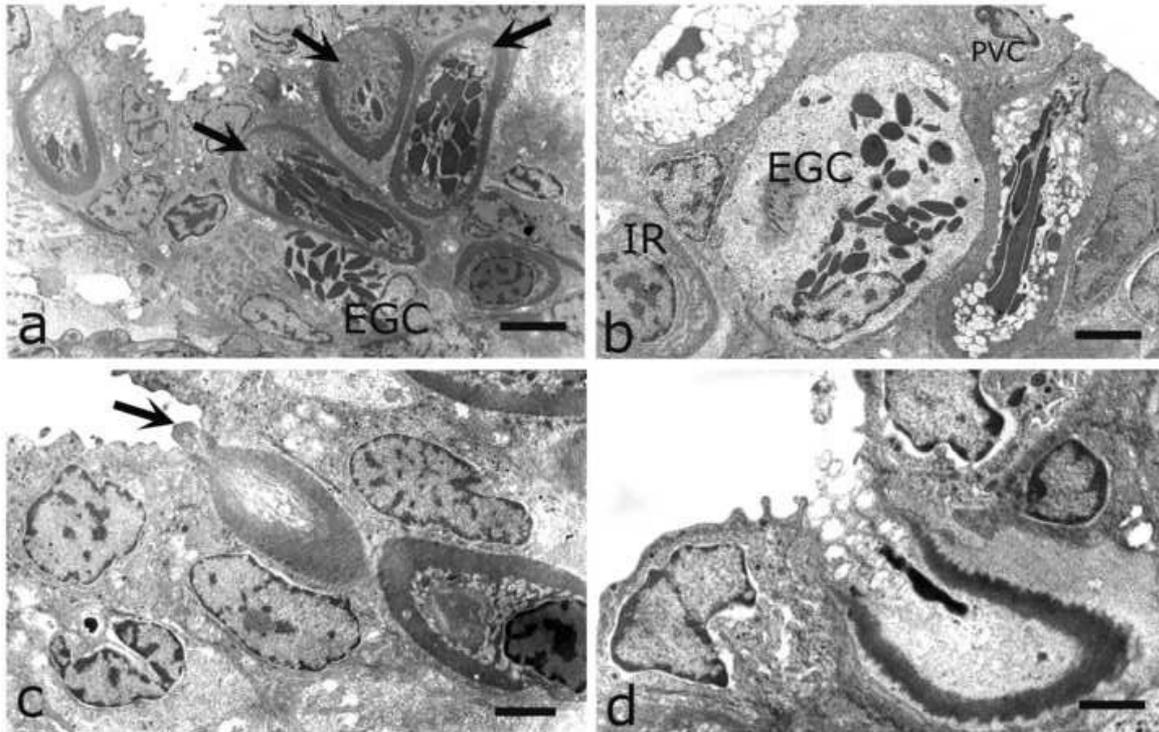
**Fig. 23:** Sezioni di branchia di spigola. Colorazione tricromica di Masson. **A-B:** animali stressati dopo 24 ore di confinamento ad alta densità. **A)** Gruppi di RCs distribuiti tra le lamelle primarie e le lamelle secondarie (asterischi). **C:** cartilagine. **B)** Diverse RCs situate lungo una lamella secondaria, tali da suggerire una loro migrazione dalla lamella primaria alla lamella secondaria. Barre: A, 10  $\mu\text{m}$ ; B, 10  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 24:** Fotografia al microscopio elettronico di RCs in branchie di spigola. Animali del gruppo di controllo. **a)** RC con “rodlet” e abbondanti vescicole citoplasmatiche situata tra due cellule a cloruro (CC) alla base della lamella secondaria; (barra: 2.5  $\mu\text{m}$ ). **b)** RC situata alla base di una lamella secondaria con spessa parete fibrillare e nucleo alla base; nel citoplasma: “rodlets” con nuclei elettrondensi (freccie); (barra: 2.5  $\mu\text{m}$ ). **c)** RC con ampie “rodlet” a forma di clava situata sulla lamella primaria (barra: 1  $\mu\text{m}$ ). **d)** RC a contatto con l’epitelio della lamella primaria in procinto di secernere il contenuto (barra: 1  $\mu\text{m}$ ).



**Fig. 25:** Fotografia al microscopio elettronico di RCs in branchie di spigola. Animali confinati ad elevata densità ( $80 \text{ Kh/m}^3$ ) per 2 ore. **a)** Numerose RCs alla base della lamella secondaria. Visibile la parete fibrillare che circonda ogni cellula (frecce) ed alcune cellule a cloruro (CC), (barra:  $4 \mu\text{m}$ ). **b)** Gruppo di RCs a livello di lamella primaria (barra:  $4 \mu\text{m}$ ). **c)** “cluster” di RCs nella lamella primaria; una RC è in procinto di espellere il proprio contenuto nello spazio interstiziale (barra:  $3 \mu\text{m}$ ).



**Fig. 26:** Fotografia al microscopio elettronico di RCs in branchie di spigola. Animali confinati ad elevata densità ( $80 \text{ Kh/m}^3$ ) per 2 ore. **a)** Diverse RCs alla base della lamella secondaria. Presenza di un granulocita eosinofilo (EGC) adiacente, (barra:  $5 \mu\text{m}$ ). **b)** RCs a diversi stadi di maturazione nella lamella primaria; presenza di una RC immatura (IR) caratterizzata da nucleo condensato e abbondante ret. endoplasmatico ruvido. La RC alla dx del EGC è in procinto di scaricare il proprio contenuto (barra:  $3 \mu\text{m}$ ). **c)** RC con evidente apertura della zona apicale, all'inizio della fase di escrezione, situata tra due lamelle secondarie (barra:  $4 \mu\text{m}$ ). **d)** RC alla fine della fase di escrezione (barra:  $4 \mu\text{m}$ ).

## 5. DISCUSSIONE

### Espressione dell'mRNA per la forma inducibile delle Hsp70 e localizzazione immunostochimica di Hsp70 e Hsc70 in spigole diploidi e triploidi sottoposte a stress termico

I risultati ottenuti tramite RT-PCR confermano, sia per i diploidi che per i triploidi, l'avvenuta espressione della forma inducibile dell'Hsp70 in conseguenza di uno stress termico (aumento della temperatura di 10°C per un intervallo di un ora). Solo in alcuni casi, triploidi a 0 dph e diploidi a 6 dph stressati, tale espressione sembra assente; nel primo caso l'assenza potrebbe essere imputabile ad un prelievo di materiale non sufficiente alla determinazione dell'mRNA (a 0 dph la dimensione e biomassa delle larve è davvero minima), nel secondo caso (6 dph) potrebbe esserci stato qualche errore procedurale nell'analisi. In genere, non si evidenziano differenze qualitative, nell'espressione del messaggero, dipendenti dalla ploidia. Un'analisi quantitativa (Real-Time PCR) avrebbe permesso di ottenere maggiori informazioni sull'espressione relative del gene, non solo in funzione della ploidia, ma anche nel corso dello sviluppo. Purtroppo tale analisi non è stata possibile per lo scarso contenuto di mRNA presente nei campioni.

La localizzazione immunostochimica delle Hsc70 (costitutive) conferma, sia nei diploidi che nei triploidi, la presenza pressoché ubiquitaria della proteina già a partire dai primi stadi di sviluppo e senza alcuna apparente dipendenza dall'esposizione allo stress termico. I tessuti maggiormente interessati dalla presenza della proteina sono, in genere, quelli di natura epiteliale: cute, mucosa del faringe e del tubo digerente. Questi dati concordano con quelli di Schmidt *et al.* (1998), il quale riscontrò la presenza della forma costitutiva per le Hsp70 in branchie e cute di trota sia in individui non stressati che in individui sottoposti a stress termico. Positività all'Hsc70 è stata riscontrata, nei nostri campioni, anche nel fegato degli individui sia stressati che di controllo; presenza di proteine dello stress, in forma costitutiva, negli epatociti era già stata evidenziata da Boone & Vijayan (2002); essi notarono che uno stress da esposizione a metalli pesanti era in grado di aumentare notevolmente l'espressione delle Hsp70 nelle cellule epatiche, ma senza provocare variazioni nella produzione di Hsc70.

Stranamente non è stata osservata alcuna positività alla forma inducibile delle Hsp70, nonostante i risultati della RT-PCR confermino la presenza del messaggero. La mancata

traduzione del messaggero in proteina nel periodo trascorso dall'inizio alla fine dello stress (un ora) è in contrasto con l'ipotesi che il gene per l'Hsp70, essendo privo di introni, sia velocemente trascritto e tradotto.

### **Analisi RT-PCR qualitativa e quantitativa e localizzazione immunostochimica di Hsp70 in spigole sottoposte a stress da trasporto**

In questo studio è stata analizzata l'espressione della forma inducibile delle Hsp70 in larve, giovanili e adulti di spigola, un pesce teleosteo di elevato interesse per l'acquacoltura. Lo scopo è stato di investigare se il comune stress da trasporto fosse in grado di attivare l'espressione della proteina, utilizzando sia un approccio qualitativo (RT-PCR) che quantitativo (Real-Time PCR). La localizzazione della proteina, in questo caso sia nella sua forma inducibile che costitutiva (Hsc70), è stata effettuata tramite metodo immunostochimico. Il livello di cortisolo plasmatico o corporeo (nelle larve e nei giovanili) è stato utilizzato per verificare l'effettiva presenza di una condizione di stress alla fine del trasporto. Nelle normali pratiche di acquacoltura, l'esposizione dei pesci a condizioni stressanti quali: ipossia, pesca, manipolazione, trasporto e sovraffollamento, sono eventi frequenti (Airaksinen *et al.* 1998; Dini *et al.*, 2006); la risposta a queste forme di stress comprende l'aumento di catecolamine, cortisolo, glicemia, flusso sanguigno nelle branchie e attività muscolare (Barton & Iwama, 1991). La risposta dei pesci allo stress può, inoltre, includere un incremento della sintesi di Hsp a livello intracellulare (Iwama *et al.*, 1998). La famiglia delle Hsp70 include diversi tipi di proteine, alcune delle quali sono inducibili e vengono prodotti solo in conseguenza di alcune forme di stress, altre sono costantemente espresse anche in condizioni normali (Morimoto *et al.*, 1990). A proposito delle Hsc70 (costitutive), Deane & Woo (2005) dimostrarono che la produzione del loro mRNA codificante poteva variare in conseguenza di uno stress acuto, sebbene si trattasse di un aumento inferiore a quello che caratterizza l'mRNA della forma inducibile (Hsp70). Nel nostro lavoro l'espressione delle Hsp70, analizzato tramite RT-PCR, non rileva differenze qualitative nella produzione del messaggero tra gruppi di controllo e stressati in larve ed avannotti, differenze che, a livello qualitativo, risultano invece apprezzabili negli adulti. L'analisi quantitativa (Real-Time PCR), però, ha permesso di rilevare differenze tra controlli e stressati significative per i giovanili di 80 dph ed appena evidenti per le larve di 40 dph. Negli adulti l'espressione del messaggero per le Hsp70 è generalmente più elevata negli stressati che nei controlli; più in dettaglio, analizzando i diversi tessuti, l'espressione

dell'mRNA per l'Hsp70 nel muscolo e nelle cute risulta significativamente maggiore negli stressati. Un'elevata espressione dell'mRNA per l'Hsp70 nella spigola è riportata anche per casi di stress da sovraffollamento (Gornati *et al.*, 2004). Vijayan *et al.* (1997), però, osservarono che uno stress da manipolazione non causa un aumento nell'espressione delle Hsp70 in fegato di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*); Washburn *et al.* (2002), in uno studio analogo sulla stessa specie, confermarono gli stessi risultati, non osservando alcuna espressione del gene anche in altri tessuti come il muscolo, la branchia e il cuore. Nel lavoro di Gornati *et al.* (2004) il sovraffollamento provoca un aumento delle Hsp70 nel tessuto epatico, così come uno shock da aumento della temperatura in Enes *et al.* (2006). Uno stress da trasporto, nello stesso tessuto, secondo i nostri dati non provoca un aumento delle Hsp70.

Nonostante siano particolarmente numerosi i lavori sull'espressione delle Hsp70 in pesci sottoposti a diversi fattori stressanti (Sanders *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1996; Vijayan *et al.*, 1997, 1998; Schmidt *et al.* 1998; Duffy *et al.*, 1999; Hassanein *et al.*, 1999; Currie *et al.*, 2000; Zarate & Bradley, 2003; Gornati *et al.*, 2004), informazioni inerenti la localizzazione cellulare della proteina, in entrambe le sue forme, è molto carente (Burkhardt-Holm *et al.*, 1998; Kilemade & Mothersill, 2001; Rendell & Currie, 2005). I due anticorpi commerciali utilizzati per l'immunoistochimica in questo studio, distinguono in modo specifico la forma inducibile della proteina da quella costitutiva; sulla scheda tecnica è inoltre confermata la possibilità di utilizzo per un'ampia gamma di vertebrati, compresi i pesci. Immunoreattività alle Hsc70 (costitutiva) è stata riscontrata in diversi tessuti appartenenti ad animali in diversi stadi di sviluppo, senza differenze di rilievo tra gli animali sottoposti a stress da trasporto e quelli del gruppo di controllo; tale risultato conferma il ruolo costitutivo di queste proteine, che sembrano essere richieste in vari aspetti del metabolismo proteico e nel mantenimento dell'omeostasi cellulare (Fink & Goto, 1998; Iwama *et al.*, 2004).

Immunoreattività alla forma inducibile delle Hsp70 non è stata riscontrata in alcun tessuto di spigola negli stadi più precoci di sviluppo, se non una debole immunopositività nella muscolatura scheletrica di giovanili ad 80 dph sottoposti a stress. L'assenza di positività in tutti gli altri tessuti è probabile sia da correlare ad una mancata traduzione del messaggero in proteina. Anche nel caso degli individui adulti, nonostante l'espressione dell'Hsp70 sia stata evidenziata in diversi tessuti, immunoreattività alla proteina è stata riscontrata solo nella muscolatura rossa e non negli altri tessuti. E' interessante notare che

l'immunopositività osservata nel muscolo rosso è in accordo con i risultati della Real-Time PCR (sebbene nell'analisi non siano stata distinta la muscolatura rossa da quella bianca), in quanto il muscolo rappresenta il tessuto con la maggiore espressione quantitativa di mRNA per la forma inducibile. Questo risultato è in accordo con l'ipotesi che tale proteina abbia un ruolo di rilievo nel prevenire il danneggiamento della struttura proteica dei miociti; questa funzione acquisisce maggiore importanza nelle situazioni stressanti, caratterizzate spesso da un aumento dell'attività muscolare (Barton e Iwama, 1991). Alcuni studi hanno evidenziato un aumento della sintesi di Hsp70 in tessuto muscolare di carpa (Ali *et al.*, 2003) e cardiomiociti di ratto (Laios *et al.*, 1997) sottoposti a stress termico. Si è ipotizzato quindi, che la proteina Hsp70 nel ratto abbia la funzione di proteggere e riparare le proteine muscolari danneggiate (Kilgore *et al.*, 1998) e correggere eventuali alterazioni della catena pesante della miosina (MHC) conseguenti allo stress (Locke *et al.*, 1991).

#### **Localizzazione immunostochimica di Hsp70 costitutive e inducibili in carpa (*Cyprinus carpio*) e trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) sottoposte a stress da trasporto**

I risultati di questa prova sperimentale offrono un quadro per certi aspetti diverso da quello derivante dall'esperienza precedente, soprattutto nel caso della carpa. In questa specie, infatti, immunopositività all'Hsc70 (costitutiva) è stata riscontrata solo a livello della muscolatura rossa, sia nei controlli che negli stressati. Nonostante il ruolo di questa proteina venga ritenuto importante in vari aspetti del metabolismo, anche in cellule non stressate, per mantenere l'omeostasi cellulare (Fink & Goto, 1998), questi risultati sono in contrasto con quelli ottenuti sulla spigola, dove è stata riscontrata una distribuzione pressoché ubiquitaria della proteina sia negli individui stressati che nei controlli. Ali *et al.* (2003) osservarono, proprio nella carpa, la presenza di due diversi geni per le Hsc70 e osservarono, inoltre, che la loro espressione dipendeva non solo dal tessuto analizzato, ma anche dalla natura dello stressore.

Nella maggior parte dei tessuti, non è stata riscontrata alcuna immunopositività all'Hsp70 (inducibile) negli animali di controllo, se si eccettua una debole colorazione a livello di muscolatura rossa. Anche in questo caso, la presenza della proteina potrebbe essere legata ad un aumento dell'attività muscolare (Barton e Iwama, 1991). Negli individui stressati, invece, è stata per la prima volta localizzata la presenza di Hsp70

nell'epitelio dei tubuli renali, oltre che nella cute e nelle branchie. Negli stessi tessuti dei controlli la colorazione risulta negativa, suggerendo un coinvolgimento della proteina nella risposta a forme di stress quali quelle derivanti dal trasporto.

Nella trota i risultati si rivelano molto simili a quelli evidenziati nella spigola per quanto riguarda le Hsc70, infatti diversi tessuti, sia dei controlli che degli stressati, esibiscono una netta positività. E' interessante sottolineare che, in uno studio effettuato sulla stessa specie, Zafarullah *et al.* (1992) osservarono che il messaggero per le Hsc70 era espresso in modalità costitutiva in diversi tessuti. Osservando la colorazione dell'epitelio intestinale e dell'epitelio branchiale degli individui stressati, si nota come l'intensità della reazione immunostochimica sia maggiore in questi individui rispetto a quella osservata nei controlli; non solo la colorazione appare più intensa, ma sembra anche più estesa la porzione di tessuto interessata dalla presenza della proteina. Tale osservazione rende plausibile l'ipotesi che la produzione delle Hsc70 sia comunque modulabile in conseguenza di un evento stressante.

Immunopositività alla forma inducibile della proteina (Hsp70) è stata riscontrata sia nella muscolatura rossa che nella cute di pesci appartenenti al gruppo di controllo, mentre negli stressati tali tessuti sono risultati negativi. Questi risultati sono di difficile interpretazione, anche se, per certi aspetti, non sono in contrasto con le osservazioni di Washburn *et al.* (2002), il quale evidenziò, proprio nella trota, che eventi stressanti quali cattura e trasporto non erano in grado di interferire con l'analisi di marcatori quali appunto le proteine dello stress.

### **Influenza dello stress da sovraffollamento e confinamento sul numero di “rodlet cells” nella spigola**

In questo studio è stata analizzata la localizzazione morfologica e l'abbondanza delle RCs in tessuti di spigola sottoposta a due condizioni di stress molto comuni: il confinamento e il sovraffollamento; tale analisi è stata effettuata sia tramite microscopia ottica che elettronica. Scopo della ricerca è stato verificare se le RCs possono essere ritenute dei buoni indicatori, anche da un punto di vista quantitativo, nell'analisi di queste forme di stress. La possibilità di utilizzare le RCs come biomarcatori è stato proposto già in numerosi studi e per un'ampia tipologia di fattori stressanti e/o nocivi (Iger & Abraham,

1997; Manera & Dezfuli, 2004; Giari *et al.* 2007, 2008; Dezfuli *et al.*, 2006, 2007b, c; Mazon *et al.* 2007). Tuttavia non è mai stata verificata, da un punto di vista quantitativo, la possibilità di utilizzare le RCs come bioindicatori nei casi di stress da sovraffollamento e confinamento. Nel nostro studio è stata valutata la variazione del numero di RCs in spigole confinate a due diverse densità (20 Kg/m<sup>3</sup> e 80 Kg/m<sup>3</sup>) per 2 e 24 ore. Dopo 2 ore di confinamento gli individui mantenuti ad una densità di 80 Kg/m<sup>3</sup> presentano un aumento significativo nel numero di RCs, presenti nelle branchie, rispetto agli individui confinati ad una densità inferiore (20 Kg/m<sup>3</sup>). Dopo 24 ore il numero di RCs aumenta ulteriormente, per entrambe le densità, ma in misura significativamente maggiore negli individui mantenuti ad una densità più elevata. Tali risultati sono in accordo con quelli riportati da Leino (1974), il quale osservò che, in effetti, il sovraffollamento e i repentini cambi di salinità potevano causare un aumento del numero di RCs, pur tuttavia egli non fornì dati quantitativi a conferma delle proprie osservazioni.

Dalle nostre osservazioni è emerso, inoltre, che, mentre negli individui di controllo le poche RCs presenti erano distribuite principalmente a livello delle lamelle primarie, negli stressati tali cellule formavano dei gruppi numerosi o “cluster” in grado di spingersi anche lungo le lamelle secondarie, denotando quindi notevoli capacità di migrazione. Anche in questo caso le nostre osservazioni trovano conferma in lavori precedenti; ad esempio, Iger e Abraham (1997) osservarono la comparsa di RCs in epidermide di carpe sottoposte a varie tipologie di stress e non nei controlli. Tale comparsa avveniva anche entro un ora dall'applicazione dell'evento stressante (in questo caso una leggera ferita), confermando non solo il legame tra RCs e difesa dell'organismo nei confronti di condizioni avverse, ma anche la loro capacità di differenziarsi e migrare dagli stati più profondi del tessuto esposto in tempi rapidi. Nel nostro studio al TEM abbiamo osservato negli animali stressati numerose RCs con la componente apicale aperta e pronta al rilascio del proprio contenuto sulla superficie dell'epitelio, a livello di lamelle branchiali secondarie. Manera e Dezfuli (2004) sottolinearono che le RCs sono le uniche tipologie cellulari aventi tratti distintivi comuni sia ai leucociti che alle cellule con funzioni secretorie. Le nostre osservazioni ultrastrutturali trovano conferma anche in Reite & Evensen (2006), i quali ritengono le RCs una tipologia di granulociti con capacità secretorie presenti nei tessuti ad uno stadio immaturo, ma in grado di differenziarsi rapidamente in conseguenza di stimoli appropriati.

In conclusione, il significativo aumento nel numero di RCs osservato nelle branchie di *D. labrax* già dopo due ore di stress da sovraffollamento, indica che queste cellule sono

influenzate dalla densità di allevamento. Inoltre, l'organizzazione in "cluster" a livello di lamelle primarie e secondarie, supporta l'ipotesi che attribuisce alle RCs un ruolo di difesa nei confronti di eventi stressanti. Le RCs in definitiva possono a pieno titolo essere considerate dei validi indicatori nello studio di alcune forme di stress nei pesci.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Ackerman P. A. & Iwama G. K. (2001). Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to Vibriosis. *J Aquat Anim Health*; **13**, 173-180.
- Ackerman P. A., Forsyth R. B., Mazur C. F. & Iwama G. K. (2000). Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. *Fish Physiol Biochem*; **23**, 327–336.
- Airaksinen S., Rabergh C. M., Sistonen L. & Nikinmaa M. (1998). Effects of heat shock and hypoxia on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells. *J Exp Biol*; **201**, 2543-2551.
- Ali K.S., Dorgai L., Abraham M. & Hermes E. (2003). Tissue and stressor-specific differential expression in two hsc70 genes in carp. *Biochem Biophys Res Comm*; **307**, 503-509.
- Arai A., Naruse K., Mitani H. & Shima A. (1995). Cloning and characterization of cDNAs for 70-kDa heat-shock proteins (Hsp70) from two fish species of the genus *Oryzias*. *Jpn J Genet*; **70**, 423-433.
- Bachelet M., Adrie C. & Polla B. S. (1998). Macrophages and heat shock proteins. *Res. Immunol*; **149**, 727-732.
- Baler R., Dahl G. & Voellmy R. (1993). Activation of human shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat-shock transcription factor HSF1. *Mol Cell Biol*; **13**, 2486-2496.
- Baler R., Welch W. J. & Voelling R. (1992). Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: Hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J Cell Biol*; **117**, 1151-1159.

- Barber D. L. & Mills Westermann J. E. (1986). Comparison of the DNA of nuclei of rodlet cells and other cells in the chub *Semotilus atromaculatus*: hybridisation *in situ*. *Can J Zool*; **64**, 801-804.
- Barber D. L., Mills Westermann J. E. & Jensen D. N. (1979). New observations on the rodlet cell (*Rhabdospora thelohani*) in the white sucker (*Catostomus commersoni*) (Lacépède): LM and EM studies. *J Fish Biol*; **14**, 277-284.
- Barnett T., Altschuler M., McDaniel C. N. & Mascarenhas J. P. (1980). Heat shock induced proteins in plant cells. *Dev Genet*; **1**, 331-340.
- Barry T. P., Lapp A. F., Kayes T. B. & Malison J.A.(1993). Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Acquaculture*. **117**: 351-363.
- Barton B. A & Iwama G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effect of corticosteroids. *Ann Rev Fish Dis*; **1**, 3-26.
- Basu N., Kennedy C. & Iwama G. K. (2003). The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol, Part A*; **134**, 655-663.
- Basu N., Nakano T., Grau E. G. & Iwama G. K. (2001). The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *Gen Comp Endocrinol*; **124**, 97-105.
- Basu N., Todgham A. E., Ackerman P. A., Bibeau M. R., Nakano K., Schulte P. M. & Iwama G. K. (2002). Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*; **295**, 173-183.
- Bensaude O., Bellier S., Dubois M. F., Giannoni F. & Nguyen V. T. (1996). Heat shock induced protein modifications and modulation of enzyme activities. *Stress-inducible cellular responses*; 199-219.

- Bienz M. & Pelham H. R. (1987). Mechanisms of heat shock gene activation in higher eukaryotes. *Adv. Genet*; **24**, 31-72.
- Björnsson B. T., Johansson V., Benedet S., Einarsdottir I. E., Hildahl J., Agustsson T. & Jönsson E. (2002). Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiol Biochem*; **27**, 227-242.
- Blachere N. E., Udono H., Janetzki S., Li Z., Heike M. & Srivastava P. K. (1993). Heat shock protein vaccines against cancer. *J Immunother*; **14**, 252-256.
- Blake M. J., Udelsman R., Feulner G. J., Norton D. D.; Holbrook N. J. (1991). Stress induced Hsp70 expression in adrenal cortex: a glucocorticoid-sensitive, age dependent response. *Proc Natn Acad Sci, USA*; **88**, 9873-9877.
- Boone A. N. & Vijayan M. M. (2002). Constitutive heat shock protein 70 (Hsc70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure. *Comp Biochem Physiol; C* **132**, 223-233.
- Braithwaite V. A. & Huntingford F. A. (2004). Fish and welfare: do fish have the capacity for pain perception and suffering? *Anim Welfare*; **13**, 87-92.
- Broglio C., Rodriguez F. & Salas C. (2003). Spatial cognition and its neural basis in teleost fishes. *Fish Fish*; **4**, 247-255.
- Brown M. A., Upender R. P., Hightower L. E. & Renfro J. L. (1992). Thermoprotection of a functional epithelium: Heat stress effects on transepithelial transport by flounder renal tubule in primary monolayer culture. *Proc Natl Acad Sci, USA*; **89**, 3246-3250.
- Bry C. (1982). Daily variations in plasma cortisol levels of individual female rainbow trout (*Salmo gairdneri*): evidence for a post-feeding peak in well-adapted fish. *Gen Comp Endocrinol*; **48**: 462-468.
- Burkhardt-Holm P., Schmidt H. & Meier W. (1998). Heat shock protein(hsp70) in brown trout epidermis after sudden temperature rise. *Comp Biochem Physiol A*; **120**, 35-41.

- Calderwood S. K., Stevenson M. A. & Price B. D. (1993). Activation of phospholipase C by heat shock requires GTP analogs and is resistant to pertussis toxin. *J Cell Physiol*; **156**, 153-159.
- Calzada A., Medina A. & Gonzales De Canales M. L. (1998). Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae. *J Fish Biol*; **53**, 340-365.
- Carrager J. F. & Pankhurst N. W. (1991). Stress and reproduction in a commercially important marine fish, *Pagrus auratus*. Proceedings of the 4<sup>th</sup> international symposium on the reproductive physiology of fish. Sheffield: *Fishsymp*; **91**, 253-255.
- Carruth L. L., Jones R. E. & Norris D. O. (2000). Cell density and intracellular translocation of glucocorticoid receptor- immunoreactive neurons in the kokanee salmon (*Onchoryncus nerka*) brain with a emphasis on the olfactory system. *Gen Comp Endocrinol*; **117**, 66-76.
- Catton W. T. (1951). Blood cell formation in certain teleost fishes. *Blood*; **6**, 39-60.
- Cenini P. (1984). The ultrastructure of leucocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *J Zool (London)*; **204**, 509-520.
- Chaicharn A. & Bullock W. L. (1967). The histopathology of acanthocephalan infections in sucker with observations on the intestinal histology of two species of catostomid fishes. *Acta Zoologica (Stockholm)*; **48**, 19-42.
- Chandroo K. P., Duncan I. J. H. & Moccia R. D. (2004). Can fish suffer? Perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Appl Anim Behav Sci*; **86**, 225-250.
- Cho W. J., Cha S. J., Do J. W., Choi J. Y., Lee J. Y., Jeong C. S., Cho K. J., Choi W. S., Kang H. S., Kim H. D. & Park J. W. (1997). A novel 90-kDa stress protein induced in fish cells by fish rhabdovirus infection. *Biochem Biophys Res Commun*; **233**, 316-319.
- Ciocca D. R., Oesterreich S., Chamness G. C., McGuire W. L. & Fuqua S. A. (1993). Biological and clinical implications of Hsp27. A review; *J Natl Cancer Inst*; **85**, 1558-1570.

- Colombo C., Barbaro B., Libertini A., Benedetti P., Francescon A. & Lombardo I. (1995). Artificial fertilization and induction of triploidy and meiogynogenesis in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. *J Appl Ichthyol*; **11**, 118–125.
- Currie S. & Tufts B. L. (1997). Synthesis of stress protein 70 (Hsp70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *J Exp Biol*; **200**, 607-614.
- Currie S., Moyes C. D. & Tufts B. L. (2000). The effects of heat shock and acclimation temperature on hsp70 and hsp30 mRNA expression in rainbow trout: in vivo and in vitro comparisons. *J Fish Biol*; **56**, 398-408.
- Currie S., Tufts B. L. & Moyes C. D. (1999). Influence of bioenergetic stress on heat shock protein gene expression in nucleated red blood cells of fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; **276**, 990–996.
- Czanyi V. & Doka A. (1993). Learning interactions between prey and predator fish. *Mar Behav Phy*; **23**, 63-78.
- D.M. Furevik D. M., Bjordal A., Huse I. & Fernö A. (1993). Surface activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in net pens. *Aquaculture*; **110**, 119-128.
- Davis K. B., Suttle M. A. & Parker N.C. (1984). Biotic and abiotic influences on corticosteroid hormone rhythms in channel catfish. *Trans Am Fish Soc*; **113**, 414-421.
- Dawkins M. S. (1998). Evolution and animal welfare. *Quarterly Review of Biology*; **73**, 305-328.
- Deane E. E. & Woo N. Y. S. (2003). Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, Hsp70 and Hsp90 during silver sea bream larval development. *Life Sciences*; **72**, 805-818.
- Deane E. E. & Woo N. Y. S. (2005). Evidence for disruption of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and hsp70 during vibriosis of sea bream, *Sparus (=Rhabdosargus) sarba* Forsskal, *J Fish Dis*; **28**, 239-251.

- Deane E. E., Kelly S. P., Chow I. N. K. & Woo N. Y. S. (2000). Effect of a prolactin pharmacological stimulant (sulpiride) and suppressant (bromocriptine) on heat shock protein 70 expression in silver seabream, *Sparus sarba*. *Fish Physiol Biochem*; **22**, 125-133.
- Deane E. E., Kelly S. P., Lo C. K. M. & Woo N. Y. S. (1999). Effects of GH, prolactin and cortisol on hepatic heat shock protein 70 expression in a marine teleost *Sparus sarba*. *J Endocrinol*; **161**, 413-421.
- Dezfuli B. S., Capuano S. & Manera M. (1998). A description of rodlet cells from the alimentary canal of *Anguilla anguilla* and their relationship with parasitic helminths. *J Fish Biol*; **53**, 1084-1095.
- Dezfuli B. S., Giari L., Konecny R., Jaeger P. & Manera M. (2003a). Immunohistochemistry, ultrastructure and pathology of gills of *Abramis brama* from Lake Mondsee, Austria, infected with *Ergasilus sieboldi* (Copepoda). *Dis Aquat Org*; **53**, 257-262.
- Dezfuli B. S., Giari L., Simoni E., Bosi G. & Manera M. (2002). Histopathology, immunohistochemistry and ultrastructure of the intestine of *Leuciscus cephalus* naturally infected with *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *J Fish Dis*; **25**, 7-14.
- Dezfuli B. S., Giari L., Simoni E., Palazzi D. & Manera M. (2003b). Alteration of rodlet cells in chub caused by the herbicide Stam<sup>®</sup> M-4 (Propanil). *J Fish Biol*; **63**, 232-239.
- Dezfuli B. S., Giari L., Simoni E., Shinn A. P. & Bosi G. (2004). Immunohistochemistry, histopathology and ultrastructure of *Gasterosteus aculeatus* (L.) tissue infected with *Glugea anomala* (Moniez 1887). *Dis Aquat Org*; **58**, 193-202.
- Dezfuli B. S., Simoni E., Giari L. & Manera M. (2006). Effects of experimental terbuthylazine exposure on the cells of *Dicentrarchus labrax* (L.). *Chemosphere*; **64**, 1684-1694.

- Dezfuli B. S., Simoni E., Rossi R. & Manera M. (2000). Rodlet cells and other inflammatory cells of *Phoxinus phoxinus* infected with *Raphidascaris acus* (Nematoda). *Dis Aquat Org*; **43**, 61-69.
- Dini L., Lanubile R., Tarantino P., Mandich A. & Cataldi E. (2006). Expression of stress proteins 70 in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during confinement and crowding stress. *Ital J Zoolog*; **73**, 117-24.
- Dubeau S. F., Pan F., Tremblay G. C. & Bradley T. M. (1998). Thermal shock of salmon in vivo induces the heat shock protein (Hsp70) and confers protection against osmotic shock. *Aquaculture*; **168**, 311-323.
- Duffy L. K., Scofield E., Rodgers T., Patton M., Bowyer R. T. (1999). Comparative baseline levels of mercury, hsp70 and hsp60 in subsistence fish from the Yukon-Kuskokwim delta region of Alaska. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol*; **124**, 181-186.
- Enes P., Panserat S., Kaushik S. & Oliva-Teles A. (2006). Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate sources after heat shock stress. *Comp Biochem Physiol A-Mol Integr Physiol*; **145**, 73-81.
- Esteban A., Rodriguez A., Ayala A. G. & Meseguer J. (2004). Effects of high doses of cortisol on innate cellular immune response of seabream (*Sparus aurata*, L.). *Gen Comp Endocrinol*; **137**, 89-98.
- Fader S. C., Yu Z. & Spotila J. R. (1994). Seasonal variation in heat shock proteins (hsp70) in stream fish under natural conditions. *J Thermal Biol*; **19**, 335-341.
- Feder M. E. & Hofmann G. E. (1990). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Ann Rev Physiol*; **61**, 243-282.
- Fink A. L. & Goto Y. (1998). Molecular chaperones in the life cycle of proteins: structure, function, and mode of action. *New York: Marcel Dekker*.

- Fishelson L. & Becker K. (1999). Rodlet cells in the head and trunk kidney of the domestic carp (*Cyprinus carpio*): enigmatic gland cells or coccidian parasites? *Naturwissenschaften*; **86**, 400-403.
- Flood M. T., Nigrelli R. F. & Gennaro J. F. Jr. (1975). Some aspects of the ultrastructure of the “Stäbchendrüsenzellen”, a peculiar cell associated with the endothelium of the bulbus arteriosus and with other fish tissue. *J Fish Biol*; **7**, 129-138.
- Forsyth R. B., Candido E. P. M., Babich S. L., Iwama G. K. (1997). Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease. *J. Aquat. Anim Health*; **9**, 18-25.
- Fujioka H. & Aikawa M. (2002). Structure and life cycle. In *Malaria Immunology*, Vol. 80 (Perlmann P. & Troye-Blomberg M., eds), pp. 1-26. Basel: Karger.
- Gamperl A. K., Vijayan M. M. & Boutilier R. G. (1994). Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Rev Fish Biol Fish*; **4**, 215-255.
- Giari L., Manera M., Simoni E. & Dezfuli B.S. (2007). Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere*; **67**, 1171-1181.
- Giari L., Simoni E., Manera M. & Dezfuli B.S. (2008). Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; **70**, 400-410.
- Gornati R., Papis E., Rimoldi S., Terova G., Saroglia M. & Bernardini G. (2004). Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene*; **341**, 111-8.
- Gregory T. R. & Wood C. M. (1999). The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol Biochem Zool*; **72**, 286-295.

- Gupta R. S. & Golding G. B. (1993). Evolution of Hsp70 gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *J Mol Evol*; **37**, 573-582.
- Hassanein H. M. A., Banhaway M. A., Soliman F. M., Abdel-Rehim S. A., Muller W. E. G. & Schroder H. C. (1999). Induction of Hsp70 by the herbicide oxyfluoren (goal) in the Egyptian Nile fish, *Oreochromis niloticus*. *Arch Environ Contam Toxicol*; **37**, 78-84.
- Heikkila J. J., Schultz G. A., Iatrou K. & Gedamu L. (1992). Expression of a set of fish genes following heat or metal ion exposure. *J. Biol. Chem*; **257**, 12000-12005.
- Holm P. (1998). Transient increase in chloride cell number and heat shock protein expression (hsp70) in brown trout (*Salmo trutta fario*) exposed to sudden temperature elevation. *Biol Chem*; **379**, 1227-33.
- Huntingford F. A., Adams C., Braithwaite V. A., Kadri S., Pottinger T. G., Sandoe P. & Turnbull J. F. (2006). Current issues in fish welfare. *J Fish Biol*; **68**, 332-372.
- Iger Y. & Abraham M. (1997). Rodlet cells in the epidermis of fish exposed to stressors. *Tissue Cell*; **29**, 431-438.
- Imagawa T., Hashimoto Y., Kon Y. & Sugimura M. (1990). Lectin histochemistry as special markers for rodlet cells in carp, *Cyprinus carpio* L. *J Fish Dis*; **13**, 537-540.
- Iwama G. K., Afonso L. O. B., Todgham A., Akerman P. & Nakano K. (2004). Are hsps suitable for indicating stressed states in fish?. *J Exp Biol*; **207**, 15-19.
- Iwama G. K., Afonso L. O. B., Todgham A., Ackermann P. & Nakano K. (2004). Are HSPs suitable for indicating stressed states in fish? *J Exp Biol*; **207**, 15-9.
- Iwama G. K., McGeer J. C. & Pawluk M.P. (1989). The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Can J Zool*; **67**, 2065-2073.

- Iwama G. K., Vijayan M. M., Forsyth R. B. & Ackerman P. A. (1999). Heat shock proteins and physiological stress in fish. *Am Zool*; **39**, 901-909.
- Jacquier-Sarlin M. R., Fuller K., Dinh-Xuan A. T., Richard M. J. & Polla B. S. (1994). Protective effects of hsp70 in inflammation. *Experientia*; **50**, 1031-1038.
- Jhingan E., Devlin R. H. & Iwama G. K. (2003). Disease resistance, stress response and effects of triploidy in growth hormone transgenic coho salmon. *J Fish Biol*; **63**, 806-823.
- Juell J. E. & Fosseidengen J. E. (2004). Use of artificial light to control swimming depth and fish density of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in production cages. *Aquaculture*; **233**, 269-282.
- Kaattari S. L. & Tripp R. A. (1987). Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmon. *J Fish Biol*; **31**, 129-132.
- Kagawa N., Ryo K. & Mugiya Y. (1999). Enhanced expression of stress protein 70 in the brains of goldfish, *Carassius auratus*, reared with bluegills, *Lepomis macrochirus*. *Fish Physiol Biochem*; **21**, 103-110.
- Kelly P. M. & Schlesinger M. J. (1978). The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell*; **15**, 1277-1286.
- Kilemade M. & Mothersill C. (2001). Heat shock protein 70 levels in rainbow trout primary epidermal cultures in response to 2,4-dichloroaniline exposure: a novel in vitro aquatic toxicity marker. *Environ Toxicol*; **16**, 253-9.
- Kilgore J. L., Musch T. & Ross C. R. (1998). Physical activity muscle and the Hsp70 response. *Can J Appl Physiol*; **23**, 245-260.
- Koban M., Graham G. & Prosser C. L. (1987). Induction of heat shock proteins synthesis in teleost hepatocytes: Effects of acclimation temperature. *Physiol Zool*; **60**, 290-296.

- Koponen K. & Myers M. S. (2000). Seasonal changes in intra- and interorgan occurrence of rodlet cells in freshwater bream. *J Fish Biol*; **56**, 250-263.
- Kothary R. K. & Candido E. P. M. (1982). Induction of a novel set of polypeptides by heat shock or sodium arsenite in cultured cells of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can J Biochem*; **60**, 347-355.
- Kothary R. K., Burgess E. A. & Candido E. P. M. (1984). The heat-shock phenomenon in cultured cells of rainbow trout: hsp70 mRNA synthesis and turnover. *Biochim Biophys Acta*; **783**, 137-143.
- Kotrschal K., Van Straaden M. J. & Hubert R. (1998). Fish brains: evolution and environmental relationships. *Rev Fish Biol Fisher*; **8**, 373-408.
- Kramer C. R. & Potter H. (2002). Ultrastructural observations on rodlet-cell development in the head kidney of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Teleostei: Poeciliidae). *Can J Zool*; **80**, 1422-1436.
- Kramer C. R. & Potter H. (2003). Rodlet cells in the posterior intestine of embryos and neonates of two poeciliid species. *J Fish Biol*; **62**, 1211-1216.
- Krone P. H. & Sass J. B. (1997). Hsp90 a and hsp90 b genes are present in the zebrafish and are differentially regulated in developing embryos. *Biochem Biophys Res Commun*; **204**, 746-752.
- Laidley C. W. & Leatherland J.F. (1988). Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein glucose, and ion concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Richardson. Comp Biochem Physiol*; **89A**, 495-502.
- Laios E., Rebeyka I. M. & Prody C. A. (1997). Characterization of cold-induced heat shock protein expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol*; **173**, 153-159.

- Lankford S. E., Adams T. E., & Cech J. J. Jr. (2003). Time of day and water temperature modify the physiological stress response in green sturgeon, *Acipenser medirostris*. *Comp Biochem Physiol, Part A*; **135**, 291-302.
- Leino R. L. (1974). Ultrastructure of immature, developing and secretory rodlet cells in fish. *Cell Tissue Res*; **155**, 367-381.
- Leino R. L. (1982). Rodlet cells in the gill and intestine of *Catostomus commersoni* and *Perca flavescens*: a comparison of their light and electron microscopic cytochemistry with that of mucous and granular cells. *Can J Zool*; **60**, 2768-2782.
- Leino R. L. (1996). Reaction of rodlet cells to a myxosporean infection in kidney of the bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Can J Zool*; **74**, 217-225.
- Lele Z., Engel S.; Krone P. H. (1997). Hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebrafish embryos. *Dev. Genet*; **21**, 123-133.
- Lemeux P. G., Herendeen S. L., Bloch P. L. & Neidhardt F. C. (1978). Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E.Coli* following temperature shifts. *Cell*; **13**, 427-434.
- Libertini A. & Bertotto D. (2004). Una microtecnica per allestire campioni da singole larve di pesci teleostei per la diagnosi della ploidia tramite citometria a flusso. *Lettere GIC*; **13**, 9-12.
- Lim E. H. & Brenner S. (1999). Short-range linkage relationships, genomic organization and sequence comparisons of a cluster of five hsp70 genes in *Fugu rubripes*. *Cell Mol Life Sci*; **55**, 668-678.
- Locke M., Noble E. G. & Atkinson B. G. (1991). Inducible isoform of Hsp70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *Am J Physiol*; **261**, C774-C779.

- Manera M. & Dezfuli B. S. (2004). Rodlet cells in teleosts: a new insight into their nature and functions. *J Fish Biol*; **65**, 597-619.
- Manera M., Simoni E. & Dezfuli B. S. (2001). The effect of dexamethasone on the occurrence and ultrastructure of rodlet cells in goldfish. *J Fish Biol*; **59**, 1239-1248.
- Maridonneau-Parini I., Malawista S. E., Stubbe H., Russo-Marie F. & Polla B. S. (1993). Heat shock in human neutrophils: Superoxide generation is inhibited by a mechanism distinct from heat-denaturation of NADPH oxidase and is protected by heat shock proteins in thermotolerant cells. *J Cell Physiol*; **156**, 204-211.
- Maule A. G., Tripp R. A., Kaattari S. L. & Schreck C. B. (1989). Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J Endocrinol*; **120**, 135-142.
- Mayberry L. F., Marchiondo A. A., Ubelaker J. E. & Kazic D. (1979). *Rhabdospora thelohani* Laguesse, 1895 (Apicomplexa): new host and geographic records with taxonomic consideration. *Journal of Protozoology*; **26**, 168-178.
- McAlister L. & Finkelstein D. B. (1980). Heat shock protein and thermal resistance in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*; **93**, 819-824.
- Moberg G.P. (1985). Influence of stress on reproduction: measure of well-being. In: Moberg G.P. (ed.) *Animal stress. Am Physiol Soc*; 245-267.
- Molina A., Biemar F., Muller F., Iyengar A., Prunet P., Maclean N., Martial J. A. & Muller M. (2000). Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. *FEBS Lett*; **474**, 5-10.
- Morange M. (1997). Developmental control of heat shock and chaperone gene expression. *Cell. Mol. Life Sci*; **53**, 78-79.
- Morimoto R. I. & Santoro M. G. (1998). Stress inducible responses and Hsp: new pharmacological target for cytoprotection. *Nat Biotechnol*; **16**, 833-838.

- Morimoto R. I., Sarge K. D. & Abravaya K. (1992). Transcriptional regulation of heat shock genes. *J Biol Chem*; **267**, 21987-21990.
- Morimoto R. I., Tissieres A. & Georgopoulos C. (1990). Stress proteins in biology and medicine. *Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Morrison C. M. & Odense P. H. (1978). Distribution and morphology of the rodlet cell in fish. *J Fish Res Board Can*; **35**, 101-116.
- Mosser D. D. & Bools N. C. (1998). Relationship between heat- shock protein synthesis and termotolerance in rainbow trout fibroblasts. *J Comp Physiol*; **B 158**, 457-467.
- Munck A., Guyre P. M. & Holbrook N. J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev*; **5**, 25-44.
- Nagahama Y., Yoshikuni M., Yamashita M., Sakai N. & Tanaka M. (1995). Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation in fish. *Fish Physiol Biochem*; **11**, 3-14.
- Ojolick E. J., Cusack R., Benfey, T. J. & Kerr S. R. (1995). Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. *Aquaculture*; **131**, 177-187.
- Olsen R. E., Sundell K., Mayew T., Myklebust R. & Ringo E. (2005). Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Acquaculture*; **250**, 480-495.
- Palenzuela O., Alvarez-Pellitero P. & Sitjà-Bobadilla A. (1999). Glomerular disease associated with *Polysporoplasma sparis* (Myxozoa) infections in cultured gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. (Pisces: Teleostei). *Parasitology*; **118**, 245-256.
- Pan F., Zarate J. M., Tremblay G. C., Bradley T. M. (2000). Cloning and characterization of salmon hsp90 cDNA: Upregulation by thermal and hyperosmotic stress. *J Exp Zool*; **287**, 199-212.

- Pankhurst N. W. & Dedual M. (1994) . Effects of capture and recovery on plasma levels of cortisol, lactate and gonadal steroids in a natural population of rainbow trout. *J Fish Biol*; **45**, 1013-1025.
- Pankhurst N. W., Van Der Kraak G. & Peter R. E. (1995). Evidence that the inhibitory effect of stress on reproduction in teleost fish is not mediated by the action of cortisol on ovarian steroidogenesis. *Gen Comp Endocrinol*; **99**, 249-257.
- Park J. H., Lee J. J., Yoon S., Lee J. S., Choe S. Y., Choe J., Park E. H. & Kim C. G. (2001). Genomic cloning of the Hsc71 gene in the hermaphroditic teleost *Rivulus marmoratus* and analysis of its expression in skeletal muscle: Identification of a novel muscle-preferred regulatory element. *Nucleic Acids Res*; **29**, 3041-3050.
- Parsell D. A. & Lindquist S. (1993). The function of Hsps in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet*; **27**, 437-496.
- Paterson W. B. & Desser S. S. (1981). *Rhabdospora thelohani* Laguesse, 1906 is not a member of the Apicomplexa. *J Parasitol*; **67**, 741-744.
- Pickering A. D. & Pottinger T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol Biochem*; **7**, 253-258.
- Pickering A. D. (1984). Cortisol-induced Lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. *Freshwater Biol*; **21**, 47-45.
- Pickering A. D., Pottinger T. G., Carrager J. F. & Sumpter J.P. (1987). The effects of acute and chronic stress and levels of reproductive hormones in the plasma of mature male browntrout, *Salmo trutta* L. *Gen Comp Endocrinol*; **68**, 249-259.
- Polla B. S., Stubbe H., Kantengwa S., Maridonneau-Parini I. & Jacquier-Sarlin M. R. (1995). Differential induction of stress proteins and functional effects of heat shock in human phagocytes. *Inflammation*; **19**, 368-378.

- Portavella M., Torres B. & Salas C. (2004). Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *J Neurosci*; **24**, 2335-2342.
- Pottinger P. G. & Pickering A. D. (1990). The effect of cortisol administration on hepatic and plasma estradiol-binding capacity in immature female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol*; **80**, 264-273.
- Pottinger T. G. (1990). The effect of stress and exogenous cortisol on receptor-like binding of cortisol in the liver of rainbow trout. *Genet Comp Endocrinol*; **78**, 194-203.
- Pratt W. B. & Welsh M. J. (1994). Chaperone functions of the heat shock proteins associated with steroid receptors. *Semin Cell Biol*; **5**, 83-93.
- Pratt W. B. (1993). The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*; **268**, 21455-21458.
- Pulsford A. L., Lemaire-Gony S., Tomlinson M., Collingwood N. & Glynn P. J. (1994). Effects of acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*. *Comp Biochem Physiol*; **109C**, 129-139.
- Rabergh C. M., Airaksinen S., Soitamo A., Bjorklund H. V., Johansson T., Nikinmaa M. & Sistonen L. (2000). Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J Exp Biol*; **203**, 1817-1824.
- Rabergh C. M., Airaksinen S., Soitamo A., Bjorklund H. V., Johansson T., Nikinmaa M. & Sistonen L. (2000). Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J Exp Biol*; **203**, 1817-1824.
- Rabindran S. K., Wisniewski J., Li L., Li G. C. & Wu C. (1994). Interaction between heat shock factor and Hsp70 is insufficient to suppress induction of DNA-binding activity in vivo. *Mol Cell Biol*; **14**, 6557-6561.

- Rance T. A., Baker B. I. & Webley G. (1982). Variation in plasma cortisol concentration of a 24 hour period in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol*; **48**, 269-274.
- Randall D. J. & Perry S. F. (1992). Catecholamine in fish physiology. *Vol XII B*, 255-300, *academic press, New York*.
- Reid S. G., Vijayan M. M. & Perry S. F. (1996). Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Endocrinol*; **120**, 135-142.
- Reite O. B. (1997). Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. *Fish Shellfish Immunol*; **7**, 567-584.
- Rendell J. L. & Currie S. (2005). Intracellular localization of HSP90 is influenced by developmental stage and environmental estrogens in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Physiol Biochem Zool*; **78**, 937-46.
- Rice J.A. (1990). Bioenergetics modelling approaches to evaluation of stress in fish. *Am Fish Soc Symp*; **8**, 80-92.
- Ritossa F. M. (1962). A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*; **18**, 571-573.
- Rose J. D. (2002). The Neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Rev Fish Sci*; **10**, 1-38.
- Sanders B. M., Nguyen J., Martin L. S., Howe S. R. & Coventry S. (1995). Induction and subcellular localization of two major stress proteins. *Gene*; **295**, 173-183.
- Santacruz H., Vríz S. & Angelier N. (1997). Molecular characterization of a heat shock cognate cDNA of zebrafish, hsc70, and developmental expression of the corresponding transcripts. *Dev Genet*; **21**, 223-233.

- Sathiyaa R., Campbell T. & Vijayan M. M. (2001). Cortisol modulates hsp90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*; **129**, 679-685.
- Schmidt H., Posthaus H., Busato A., Wahli T., Meier W. & Burkhardt-Holm P. (1998). Transient increase in chloride cell number and heat shock protein expression (hsp70) in brown trout (*Salmo trutta fario*) exposed to sudden temperature elevation. *Biol Chem*; **379**, 1227-1233.
- Seyle H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*; **138**, 32-33.
- Seyle H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *Brit Med J*; **1**, 1383.
- Shrimpton J. M., McCormick S. D. (2002). Environmental and endocrine control of gill corticosteroid receptor number and affinity in Atlantic salmon (*Salmon salar*) during smolting. *Acquaculture*; **222**, 83-99.
- Smith D. F., Whitesell L. & Katsanis E. (1998). Molecular chaperones: biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol. Rev*; **50**, 494-513.
- Smith S. A., Caceci T. & Robertson J. L. (1995a). Occurrence of rodlet cells and associated lesions in the vascular system of freshwater angelfish. *J Aquat Anim Health*; **7**, 63-69.
- Smith S. A., Caceci T., Marei H. E-S. & El-Haback H. A. (1995b). Observations on rodlet cells found in the vascular system and extravascular space of angelfish (*Pterophyllum scalare scalare*). *J Fish Biol*; **46**, 241-254.
- Smith T. R., Tremblay G. C. & Bradley T. M. (1999). Hsp70 and a 54 kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. *J Exp Zool*; **284**, 286-298.
- Sneddon L. U. (2003). The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Appl Anim Behav Sci*; **83**, 153-162.

- Sovrano V. A., Bisazza A. & Vallortigara G. (2003). Modularity as a fish (*Xenotoca eiseni*) views it: Conjoining geometric and nongeometric information for spatial reorientation. *J Exp Psychol Anim B*; **29**, 199-210.
- Suter H. C. & Huntingford F. A. (2002). Eye colour in juvenile Atlantic salmon: effects of social status, aggression and foraging success. *J Fish Biol*; **61**, 606-614.
- Thélohan P. (1892). Sur des sporozoaires indéterminés parasites des poissons. *Journal d'Anatomie et Physiologie Paris*; **28**, 163-171.
- Tissieres A., Mitchell H. K. & Tracy V.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*; **84**, 389-398.
- Vijayan M. M. & Moon T. W. (1994). The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost: the sea raven. *Can J Zool*; **72**, 379-386.
- Vijayan M. M., Pereira C., Forsyth R. B., Kennedy C. J. & Ywama G. K. (1997). Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation heat-shock-cognate HSC71 gene from rainbow trout. *Eur J Biochem*; **204**, 893-900.
- Vijayan M. M., Pereira C., Kruzynski G. & Iwama G. K. (1998). Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in 2 salmonids. *Aquat Toxicol*; **40**, 101-108.
- Vijayan M. M., Raptis S. & Sathiyaa R. (2003). Cortisol treatment affects glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol*; **132**, 256-263.
- Voellmy R. (1996). Sensing stress and responding to stress. *Stress-inducible cellular responses*; 121-138.
- Washburn B. S., Moreland J. J., Slaughter A. M., Werner I., Hinton D. E. & Sanders B. M. (2002). Effects of handling on heat shock protein expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem*; **21**, 557-60.

- Weinreb E. L. & Bilstad N. M. (1955). Histology of the digestive tract and adjacent structures of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. *Copeia*; **1955**, 194-204.
- Welch W. J. (1993). How cells respond to stress. *Sci Am*; **269**, 56-64.
- Wendelaar Bonga S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiol Rev*; **77**, 591-625.
- Weyts F. A. A., Flink G., Rombout J. H. W. M. & Verburg-van Kemenade B. M. L. (1998). Cortisol induces apoptosis in activated B cells, not in other lymphoid cells of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev Comp Immunol*; **22**, 551-562.
- Whitesell L. & Cook P. (1996). Stable and specific binding of heat shock protein 90 by geldanamycin disrupts glucocorticoid receptor function in intact cells. *Mol Endocrinol*; **10**, 705-712.
- Williams J. H., Farag A. M., Stansbury M. A., Young P. A., Bergman H. L. & Petersen N. S. (1996). Accumulation of hsp70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to metal-contaminated water and/or diet. *Environ Toxicol Chem*; **15**, 1324-1328.
- Yada T., Muto K., Azuma T., Hyodo S. & Schreck C. B. (2005). Cortisol stimulates growth hormone gene expression in rainbow trout leucocytes in vitro. *Gen Comp Endocrinol*; **142**, 248-255.
- Yamamori T., Ito K., Nakamura Y. & Tura T. (1978). Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. *J Bacteriol*; **134**, 1133-1140.
- Yamashita M., Hirayoshi K. & Nakata K. (2004). Characterization of multiple members of the hsp70 family in platyfish culture cells: molecular evolution of stress protein hsp70 in vertebrates. *Gene*; **336**, 207-218.
- Yaoita Y, Brown D. D. (1990). A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes Dev*; **4**, 1917-1924.

Young R. A. (1990). Stress proteins and immunology. *Annu Rev Immunol*; **8**, 401-420.

Zafarullah M., Wisniewski J., Shworak N. W., Schieman S., Misra S. & Gedamu L. (1992). Molecular cloning and characterization of a constitutively expressed heat-shock-cognate hsc71 gene from rainbow trout. *Eur J Biochem*; **204**, 893-900.

Zarate J. & Bradley T. M. (2003). Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. *Aquaculture*; **223**, 175-87.

# Ringraziamenti

Vorrei dedicare il primo ringraziamento a Claudia, che anni fa ha avuto fiducia in me, mi ha permesso di iniziare questa lunga e felice avventura a Sperivet e si è battuta perché non terminasse prematuramente.....senza di lei questo lavoro non sarebbe mai stato scritto. Il secondo ringraziamento va a Giuse, che ha accettato non solo di farmi da supervisor, ma anche di sopportare per anni un collaboratore affetto da “cialtroneria acuta”.

Grazie a Daniela, amica e collega.....da sempre.....

Grazie a Tommaso e Giovanni, compagni di laboratorio, mensa, caffè, discussioni “sociopoliticoculturali” e quant'altro, e grazie soprattutto per aver sopportato la mia inguaribile tendenza al disordine.

Grazie a tutti gli amici e colleghi che rendono “Sperivet” un luogo di lavoro sereno e accogliente: Antonella, Maristella, Tiziana, Marco (sì, ti ho messo fra le donne e non ti lamentare!), Lisa, Laura, Marta e Susanna. Un ringraziamento particolare a Lisa e Susanna per aver curato la parte di biomolecolare.

Ed ora l'allegro gruppo dello studio dottorandi. Grazie a Elena, la più efficiente “segretaria” che si possa avere, Elisa, Daniela, Paolo, Eugenia, compagna, in quest'ultimo periodo, di “stress da scrittura tesi”....grazie a Francesco, arrivato da poco ma che si è accollato gran parte del mio lavoro e mi ha permesso di dedicarmi a tempo pieno alla scrittura.

Grazie alla dottoressa Rosalba Laurà, che si è occupata della parte di microscopia elettronica.

Grazie anche a GiGabai, che, conoscendo la mia natura, mi ha fatto da promemoria ambulante.

**GRAZIE A TUTTI!**