

Elasmobranchi e intossicazione da elementi traccia: il ruolo svolto dal mercurio

Il progetto si dividerà in due fasi: 1) analisi di esemplari selvatici derivati da pesca commerciale (in collaborazione con altri enti di ricerca), sia per quanto riguarda i livelli di mercurio, che per l'analisi della loro neuroanatomia (sia in elasmobranchi che in osteoitti); 2) valutazione in laboratorio dell'assorbimento embrionale del mercurio e dei potenziali effetti avversi a carico del sistema nervoso centrale. Le tempistiche di implementazione della ricerca sono illustrate nel diagramma di Gantt sottostante, allungato a 18 mesi per includere la fase di pubblicazione degli articoli.

WP	Month																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Coordinazione																		
Campionamento																		
<i>Raccolta dei campioni</i>																		
<i>Ottenimento delle uova</i>																		
Analisi																		
<i>Neuroanatomia</i>																		
<i>Analisi del mercurio</i>																		
<i>Analisi enzimatiche</i>																		
<i>Esposizione in ovo</i>																		
Disseminazione																		
<i>Preparazione di articoli</i>																		

Analisi di esemplari selvatici

Per ogni specie considerata verranno campionati almeno 40 esemplari, da cui verranno prelevati gli organi target per l'accumulo del mercurio e di riferimento per la sicurezza alimentare (cervello, fegato, muscolo). Il tessuto cerebrale verrà prelevato al momento della salpata della rete, e verrà suddiviso in due porzioni, una destinata all'analisi tossicologica e di quantificazione dello stress ossidativo, e una per le valutazioni istologiche, effettuate su un numero di non più di 5 animali/specie.

I marcatori di stress ossidativo (glutazione totale, 8-isoprostaglandina F2alfa e proteina S100b) saranno misurati su aliquote di tessuto cerebrale utilizzando saggi disponibili in commercio e già testati sugli squali. L'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) sarà determinata secondo la metodica di Ellman et al. (1961), che prevede la valutazione dell'attività dell'enzima con metodo spettrometrico, leggendo a 412 nm, in presenza di acetiltiocolina come substrato.

I livelli di mercurio nei vari tessuti considerati verranno analizzati con metodo ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optic Emission Spectrometry) dopo digestione a microonde dei tessuti (cervello, fegato e muscoli). Verrà utilizzato uno strumento Perkin Elmer Optima 2100 DV, abbinato a un nebulizzatore a ultrasuoni CETAC U5000AT+. In ogni set di analisi saranno inclusi due bianchi per controllare la purezza chimica e l'accuratezza del metodo sarà verificata con materiali di riferimento.

Da punto di vista neuroanatomico, per ogni specie considerata (elasmobranchi e osteoitti) verrà campionato un totale di 5 cervelli. I cervelli saranno trattati per la colorazione della tionina, la colorazione del mercurio e l'immunoistochimica. La colorazione della tionina sarà essenziale per determinare le aree del cervello, mentre la colorazione del mercurio ci fornirà la distribuzione del mercurio nel cervello. Nella procedura immunoistochimica, sezioni del cervello saranno colorate con anticorpi contro la popolazione neuronale totale (anticorpo contro PGP9.5), cellule gliali (anticorpo contro la proteina dell'acido fibrillare gliale - GFAP),

neuroni colinergici (anticorpo contro la colina acetiltransferasi - Chat) e neuroni serotoninergici (anticorpi contro la serotonina e il trasportatore della serotonina - SERT). L'immunoistochimica combinata con un software

specifico sarà utilizzata per le determinazioni morfometriche e densitometriche della popolazione neuronale totale, dei neuroni colinergici e dei neuroni serotoninergici. L'immunoistochimica combinata con la tecnica del thresholding sarà utilizzata per la determinazione quantitativa delle cellule neuronali (inclusi somata e processi colinergici e serotoninergici) e gliali. Le immagini ottenute saranno prima "thresoled" in modo che solo i pixel al di sopra del livello di soglia saranno contati come elementi gliali e neuronali di etichettatura positiva. Il livello di soglia sarà impostato rispetto al livello di fondo delle sezioni di controllo negativo. L'area di pixel occupata da elementi gliali e neuronali positivi sopra il livello di soglia sarà misurata in ogni area del cervello, e le frazioni percentuali saranno calcolate.

Esposizione in ovo al mercurio

Per valutare se il mercurio possa influenzare la forma fisica e la sopravvivenza dei giovani, uova di *Scyliorhinus* saranno esposte a concentrazioni rilevanti dal punto di vista ambientale di mercurio per l'intero sviluppo embrionale. Saranno preparati un gruppo di controllo e due gruppi esposti (a bassa dose, LD, e ad alta dose, HD), ogni gruppo sarà fatto in triplicato, e ogni vasca includerà 12 uova (108 uova in totale). Le uova saranno lasciate sviluppare e schiudere normalmente, e i nuovi nati saranno osservati per il comportamento per 15 giorni per valutare se qualsiasi differenza nel comportamento alimentare e sociale possa essere correlato all'esposizione al mercurio. Due uova/vasca saranno campionate appena prima della schiusa, e tutti i neonati saranno sacrificati e analizzati per i residui di mercurio alla fine dei 15 giorni. Per quanto riguarda le analisi comportamentali saranno identificate le unità comportamentali di base eseguite dai neonati attraverso osservazioni di scansione e campionamento focale. Sarà poi costruita la matrice di transizione per le vasche trattate e di controllo per evidenziare e quantificare eventuali differenze comportamentali. Alla nascita e al giorno 15 saranno anche raccolti campioni di sangue per valutare eventuali effetti ematochimici negativi indotti dal mercurio.

Dato che gli animali saranno osservati anche dopo lo sviluppo embrionale fino al giorno 15 di vita, sarà richiesto il permesso del comitato etico.

Dagli esemplari saranno prelevati gli stessi campioni prelevati dagli esemplari selvatici, che saranno sottoposti alle stesse analisi.

La stessa sperimentazione verrà effettuata anche su uova di osteoitti, per una valutazione comparativa.

Si prevede di arrivare alla produzione di almeno due articoli su riviste peer-reviewed, una in ambito tossicologico e una in ambito anatomico.