

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

Dottorato di Ricerca in Biologia Animale

(Settore disciplinare BIO-05)

XX Ciclo

(2004-2007)

**Effetti del cadmio sulle branchie del
teleosteo marino *Thalassoma pavo*:
uno studio morfo-funzionale**

Dott.ssa Barbara CORAPI

Coordinatore
Chiar.mo Prof.
Bruno TOTA



Docente Tutor
Dott.ssa
Elvira BRUNELLI



CAPITOLO 2

La respirazione nei vertebrati acquatici

Premessa

L'acquisizione dell'ossigeno e l'eliminazione della CO₂ sono i due passaggi basilari della respirazione cellulare.

Il trasferimento di ossigeno e anidride carbonica avviene passivamente attraverso la superficie corporea e la portata di questo fenomeno è dunque determinata soprattutto dalla superficie di scambio disponibile.

La richiesta di ossigeno e la produzione di anidride carbonica di un animale aumentano in proporzione alla sua massa ed allo stato di attività; poiché l'area della superficie cresce in ragione del quadrato mentre il volume aumenta in ragione del cubo, il rapporto tra area di superficie e volume di un animale è adeguatamente elevato solo in animali molto piccoli ed il trasporto per diffusione sarà sufficiente a sostenere metabolicamente solo organismi delle dimensioni massime di circa 0.5 mm di raggio.

Le richieste del metabolismo di un organismo di dimensioni maggiori non possono essere soddisfatte solo da un trasporto per diffusione attraverso la sua superficie esterna e negli animali si sono dunque evoluti diversi sistemi per facilitare lo scambio gassoso con l'ambiente.

Nei Vertebrati vengono utilizzati per la respirazione organi diversi come branchie, polmoni e tegumento. Tutte le aree specializzate per lo scambio dei gas hanno ampie superfici e sono caratterizzate da epiteli sottili e riccamente vascolarizzati; questo tipo di struttura di base garantisce infatti una stretta associazione tra il sangue e il mezzo esterno e, grazie alla piccolissima distanza di diffusione, lo scambio dei gas può avvenire rapidamente.

2.1 Fattori che influenzano gli scambi gassosi

Gli scambi respiratori sono affidati, come abbiamo detto, a sistemi specializzati. La struttura di un sistema per lo scambio dei gas è influenzata dalle proprietà del mezzo e dalle esigenze degli organismi: gli animali a respirazione aerea e quelli a respirazione acquatica hanno dunque apparati respiratori molto differenti come diverse sono le modalità di aerazione.

Il paragone tra la composizione gassosa e le caratteristiche fisiche di acqua e aria mette in evidenza i diversi ordini di problemi che i vertebrati acquatici devono affrontare nell'effettuare gli scambi respiratori.

Il contenuto di ossigeno dell'aria è circa 20 volte superiore a quello dell'acqua satura di aria ed inoltre il tasso di diffusione dell'ossigeno nell'acqua è molto inferiore rispetto al suo tasso di diffusione nel mezzo aereo; è dunque evidente che, per estrarre una determinata quantità di ossigeno, il volume di acqua che deve passare sulla superficie respiratoria di un vertebrato acquatico è molto maggiore del corrispondente volume di aria che deve ventilare il polmone in un animale terrestre.

Inoltre, la densità dell'acqua (1000 volte superiore a quella dell'aria a pressione normale) e la sua viscosità (100 volte quella dell'aria) impongono un lavoro respiratorio molto maggiore. Il 20% del consumo di ossigeno di un pesce, ad esempio, viene speso proprio per sostenere la respirazione ed è una percentuale piuttosto alta se confrontata alla percentuale di ossigeno spesa per la respirazione polmonare dai Mammiferi che è pari solo all'1-2%.

La CO₂ al contrario, è estremamente solubile in acqua e gli ambienti acquatici hanno di solito pressioni parziali di anidride carbonica superiori a quelle dell'atmosfera.

La quantità di ossigeno disciolto nei corpi idrici naturali è determinata da diversi fattori. L'ossigeno disciolto nell'acqua si origina

dalla fotosintesi operata dalle piante acquatiche e dall'atmosfera grazie al fenomeno di diffusione.

Varie azioni naturali di miscelazione distribuiscono i gas nei corpi idrici. I corsi d'acqua vengono aerati quando l'acqua percorre rapide. Nei corpi idrici più grandi le onde aerano gli strati superficiali, ma i loro effetti sono minimi al disotto di qualche metro. I corpi idrici stazionari, comprendenti i laghi, gli oceani ed i mari, si miscelano grazie ai movimenti convettivi causati dal riscaldamento diurno ad opera dei raggi solari, dal raffreddamento notturno dovuto all'evaporazione e dalle variazioni stagionali della temperatura. La convezione tuttavia di solito non influenza gli strati profondi dei corpi idrici stazionari di grandi dimensioni ed il contenuto di ossigeno può variare notevolmente procedendo dalla superficie verso il fondo.

Una forte riduzione di ossigeno ed un notevole aumento della pressione parziale di CO₂ possono essere provocate dalla decomposizione della sostanza organica ad opera dei microrganismi presenti nel sedimento; effetto analogo hanno la prolungata oscurità ed il ridotto scambio con l'atmosfera causati dalla copertura di neve e ghiaccio. In quest'ultimo caso, la copertura della superficie impedisce all'ossigeno atmosferico di diffondere nel mezzo acquatico e inoltre l'assenza di energia luminosa ostacola la fotosintesi algale; il mancato apporto di ossigeno, unitamente ad un invariato consumo da parte degli organismi, comporta un drastico abbassamento del tenore di ossigeno che spesso provoca la cosiddetta "uccisione invernale", una vasta moria di animali acquatici frequente soprattutto nei laghi e negli ambienti acquatici stagnanti di medie e piccole dimensioni.

Altri fattori importanti nel determinare il contenuto di ossigeno nel mezzo acquatico sono la temperatura e la salinità.

La solubilità di un gas nell'acqua diminuisce con l'aumentare della temperatura; un cambiamento da 5° C a 35° C riduce il contenuto di ossigeno da 9 ml/l a 5 ml/l. Per contro l'aumento di temperatura produce negli animali ectotermi un incremento nel metabolismo e dunque un maggiore dispendio di ossigeno; gli animali che vivono negli stagni e nei corsi d'acqua poco profondi, dove la temperatura può raggiungere valori estremi, devono dunque far fronte a questo duplice svantaggio provocato dal rialzo termico.

La solubilità dell'ossigeno decresce anche in ragione dell'aumentare della concentrazione salina e, a tutte le temperature, l'acqua di mare contiene meno ossigeno rispetto all'acqua dolce. Infatti, nelle identiche condizioni di temperatura e pressione parziale l'acqua al 3,6% di NaCl (approssimativamente la salinità dell'oceano) contiene 38 ml O₂/l mentre l'acqua pura contiene 49 ml O₂/l.

2.2 L'apparato branchiale

Al fine di aumentare la superficie disponibile per gli scambi gassosi i Pesci e gli Anfibi allo stadio larvale utilizzano l'apparato branchiale.

Le branchie non svolgono però solo una funzione respiratoria e nelle diverse classi di Vertebrati si assiste ad una diversificazione e specializzazione di questa struttura la quale è spesso coinvolta nella regolazione osmotica e acido-base e può in alcuni casi svolgere, come vedremo più avanti, un ruolo attivo anche nell'alimentazione.

2.3 Le branchie dei pesci

La struttura e l'organizzazione dell'apparato branchiale sono estremamente variabili all'interno della superclasse *Pisces* e differenze morfologiche e strutturali sono riscontrabili anche nei *taxa* di rango inferiore quali ordine e famiglia; molto spesso quindi, l'organizzazione

della componente scheletrica dell'apparato branchiale è stata utilizzata come una delle caratteristiche fondamentali nella filogenesi dei Vertebrati.

2.3.1 Condroitti

Il cranio viscerale degli Elasmobranchi è costituito da diversi elementi cartilaginei; la prima arcata cartilaginea è detta arcata mandibolare mentre la seconda è l'arcata ioidea; le arcate cartilaginee successive sono le arcate branchiali, generalmente in numero di 5-6. Il condotto spiracolare è collocato tra le arcate mandibolare e ioidea mentre le camere branchiali sono collocate tra l'arcata ioidea e la prima arcata branchiale e tra le arcate branchiali successive. Ogni emiarcata branchiale è costituita da 4 elementi cartilaginei (faringobranchiale, epibranchiale, ceratobranchiale e ipobranchiale) in genere distinti con numeri romani.

Il condotto spiracolare non contiene strutture respiratorie. Ciascuna arcata branchiale invece emette lateralmente un setto branchiale che raggiunge la superficie; i setti branchiali sono rivestiti dalla lamina branchiale che rappresenta la struttura respiratoria.

Il setto branchiale è costituito dai raggi branchiali, bastoncelli cartilaginei che si dipartono perpendicolarmente dall'arcata branchiale; la lamina respiratoria risulta così suddivisa in altrettante lamelle branchiali primarie quanti sono i raggi branchiali; da ciascuna lamella si dipartono poi numerose lamelle secondarie.

L'arcata branchiale, inoltre, emette medialmente brevi processi scheletrici detti branchiostegi che ostruiscono in parte le aperture che immettono dal faringe alle camere branchiali; essi costituiscono così una sorta di filtro che impedisce alle particelle alimentari di entrare nelle camere respiratorie.

Rispetto agli Elasmobranchi, gli Olocefali mostrano differenze significative nell'organizzazione dell'apparato branchiale; si assiste infatti alla scomparsa degli spiracoli ed alla obliterazione dell'ultima fessura

branchiale. Inoltre, mentre negli Elasmobranchi la porzione terminale di ciascun setto branchiale si proietta all'indietro col suo rivestimento epiteliale a proteggere, verso l'esterno, l'apertura branchiale successiva, negli Olocefali si assiste alla comparsa di un'unica e ampia piega cutanea che riveste, come un opercolo, le 4 fenditure branchiali molto ravvicinate tra loro.

Il meccanismo respiratorio dei pesci cartilaginei è molto semplice: l'acqua entra dalla bocca, la quale poi si chiude, e il pavimento della regione orale si solleva per spingere l'acqua sulle branchie e farla poi fuoriuscire dalle fenditure branchiali.

2.3.2 Osteitti

Negli Osteitti, l'organizzazione dello splancnocranio appare più complessa rispetto a quella osservata nei Condroitti e si assiste alla comparsa di nuovi elementi scheletrici di natura ossea.

L'arcata mandibolare e quella ioidea sono costituite da un numero elevato di elementi spesso articolati mobilmente tra loro. Anche ciascuna delle arcate branchiali, in numero di 5 per ciascun lato, è formata da più ossa denominate: faringobranchiale, epibranchiale, ceratobranchiale, ipobranchiale e basibranchiale; quest'ultimo connette tra loro le due arcate eterolaterali.

A differenza di quanto osservato negli Elasmobranchi, negli Osteitti si assiste all'assenza o rudimentazione dello spiracolo ed alla comparsa di una piega cutanea, detta opercolo, che ricopre le fenditure branchiali. Una struttura analoga è presente, come abbiamo visto, negli Olocefali ma essa è costituita esclusivamente dalla cute mentre negli Osteitti questa struttura è sostenuta da lamine ossee dette appunto ossa opercolari.

La comparsa degli opercoli si associa anche a modificazioni delle branchie. I setti branchiali, presenti nei Condroitti, regrediscono progressivamente fino a scomparire completamente e le lamelle branchiali

si inseriscono direttamente sull'arcata branchiale conferendo alla branchia degli Osteitti la caratteristica conformazione "a pettine". Ciascun arco branchiale porta sul margine esterno due serie di filamenti o lamelle dalle quali si dipartono una fila superiore ed una inferiore di lamelle secondarie. Sul margine interno, l'arco porta invece una serie di branchiospine, provviste di numerosi dentelli che costituiscono una sorta di filtro atto a proteggere la branchia dai danni che potrebbero arrecare le particelle di cibo o i corpi estranei.

La modificata architettura dell'apparato branchiale, rispetto a quella degli Elasmobranchi, si associa ad una differente meccanica nell'assunzione di acqua. Il meccanismo respiratorio dei Pesci ossei si attua in due tempi: nella fase inalante gli opercoli si chiudono e la cavità boccale si dilata aspirando acqua dalla bocca; simultaneamente le camere branchiali si dilatano creando un gradiente pressorio che fa fluire l'acqua sulle branchie. Nella fase esalante la cavità boccale si contrae e le valvole orali passive si chiudono impedendo il reflusso dell'acqua che viene così forzata sulle branchie e fuoriesce poi attraverso gli opercoli.

2.4 L'epitelio delle branchie dei pesci

Il filamento branchiale rappresenta l'unità funzionale della branchia in quanto è dotato di un sistema motore proprio ed è sede dei principali siti di controllo vascolare. L'unità respiratoria è rappresentata invece dalla lamella secondaria dove avvengono gli scambi gassosi.

La branchia dei Pesci, infatti, non svolge solo la funzione respiratoria ma rappresenta anche sede della osmoregolazione e dello scambio ionico; questa diversità funzionale si riflette sulla morfologia degli epitelii deputati alle diverse funzioni.

2.4.1 L'epitelio del filamento

L'epitelio del filamento è multistratificato e riveste i filamenti branchiali, con l'esclusione delle lamelle, e le superfici anteriori e laterali degli archi branchiali. Esso è costituito da 5 tipi cellulari: cellule indifferenziate (cellule basali), cellule pavimentose, cellule mucose (“goblet cells”) e “chloride cells” (Laurent, 1984).

Cellula pavimentosa - E' una cellula di superficie di forma poligonale dal diametro di 3-10 μ ; essa rappresenta il tipo cellulare più comune nell'epitelio del filamento. Diversi studi condotti al SEM (Hughes, 1979; Kendall & Dale, 1979) hanno mostrato la presenza, sulla superficie esterna della cellula pavimentosa, di un complesso sistema di microcreste. Le microcreste possono variare leggermente in forma e dimensioni nelle diverse specie ma in genere hanno una lunghezza che varia da 5 a 15 μ ed una larghezza compresa tra 0.15 e 0.20 μ . Nella porzione superficiale il confine tra le cellule pavimentose adiacenti non è sempre chiaramente definito ma in molti casi le microcreste che decorrono parallelamente al limite cellulare rendono tale confine piuttosto marcato.

Un altro tipo di cellula pavimentosa è presente nell'epitelio del filamento: la cellula colonnare; questo secondo tipo cellulare, osservato al SEM non è distinguibile dalle altre cellule di superficie ma la sua ultrastruttura è invece caratteristica per la presenza di un grande numero di vescicole citoplasmatiche e per le profonde introflessioni delle membrane parietali.

Cellula mucosa (“goblet cell”) - Le cellule mucose sono collocate principalmente lungo i margini del filamento; solo poche cellule di questo tipo vengono rinvenute nell'area interlamellare dove prendono contatto con le “chloride cells”. Una lunga serie di osservazioni in differenti specie e in diverse condizioni sperimentali hanno mostrato tuttavia che il numero e la collocazione delle popolazioni di “goblet cell” è estremamente variabile.

In particolare il numero di cellule mucose è influenzato dalla salinità del mezzo acquatico. Nei Teleostei d'acqua dolce *Gambusia* e *Catla*, le cellule mucose scompaiono completamente quando il mezzo contiene cloro, persino a basse concentrazioni (Ahuja, 1970); in *Anguilla japonica* il numero diminuisce dopo un mese di acclimatazione in acqua salata. Nel pesce eurialino *Etroplus maculatus*, durante un graduale adattamento dall'acqua dolce all'acqua salata al 100% le cellule mucose subiscono un decremento numerico ma aumentano di dimensioni. Al 100% di acqua salata esse sono ridotte ad un numero trascurabile (Virabhadrachari, 1961).

Il ruolo delle cellule mucose non è ancora stato chiarito ma si ritiene che esse possano essere attivamente coinvolte nell'osmoregolazione: il numero più elevato di “goblet cell” rinvenuto nei pesci d'acqua dolce fa pensare ad un ruolo di controllo esercitato da questa cellula nella perdita di ioni o nell'influsso d'acqua.

“Chloride cell” - Una delle caratteristiche principali dell'epitelio branchiale dei Pesci è la presenza della “chloride cell”. Questo tipo cellulare è attivamente coinvolto nell'osmoregolazione ed è in grado di svolgere sia la funzione di escrezione ionica che la funzione di assorbimento.

Generalmente le CC si rinvengono nell'epitelio dei filamenti branchiali, ma a volte sono presenti anche nell'epitelio delle lamelle (Laurent 1984, 1989; Pisam & Rambourg, 1991). Oltre che nelle branchie, le “chloride cells” sono state rinvenute anche nella pelle dei pesci (Nonnotte *et al.*, 1979), nelle pseudobranchie (Laurent & Dunel 1980), e nell'epitelio opercolare (Karnaky *et al.*, 1984; Foskett *et al.*, 1981).

La “chloride cell” presenta, in genere, dimensioni maggiori rispetto agli altri tipi cellulari che costituiscono l'epitelio del filamento; spesso la CC si estende per l'intero spessore del foglietto epiteliale presentando così la porzione apicale a diretto contatto con il mezzo esterno e la porzione prossimale adagiata sulla membrana basale. La membrana plasmatica

apicale della “chloride cell”, nei pesci marini, è depressa a formare una cripta piuttosto profonda contenente muco e suddivisa da setti tra loro interconnessi o da microvilli; nei pesci d’acqua dolce, invece, la membrana apicale si presenta solo leggermente depressa (Pisam & Rambourg, 1991).

La CC è caratterizzata dalla presenza all’interno del citoplasma di un grande numero di mitocondri e di un sistema estremamente complesso di tubuli che si aprono verso la membrana basolaterale (Laurent, 1984, Pisam & Rambourg, 1991). Il sistema tubulare si estende attraverso l’intero citoplasma, eccetto che nell’area del Golgi e in una banda ristretta situata proprio sotto la superficie apicale delle “chloride cells” (Pisam & Rambourg, 1991). Questo complesso sistema di membrane plasmatiche basolaterali è ricco in Na^+/K^+ -ATPasi (Jürss & Bastrop, 1995); al contrario la membrana plasmatica apicale e le vescicole di secrezione mostrano una reazione istochimica debole per lo stesso enzima (Hootman & Philpott, 1979).

La “chloride cell”, nei Teleostei stenoalini marini e nei Teleostei eurialini acclimatati all’acqua salata, è circondata da cellule accessorie (Laurent, 1989) caratterizzate dalla presenza di processi citoplasmatici che penetrano nella porzione apicale delle CC. Le cellule accessorie hanno forma a pera o a semiluna e presentano un sistema tubulare simile a quello delle CC, ma meno sviluppato. Le porzioni apicali delle CC e le cellule accessorie associate formano un mosaico che crea le pareti delle cripte presenti nella membrana plasmatica apicale delle CC (Pisam & Rambourg, 1991).

2.4.2 L'epitelio lamellare: organizzazione e componenti cellulari nei Teleostei

L'epitelio lamellare riveste la ramificazione terminale delle branchie e rappresenta il sito principale degli scambi respiratori. Lo spessore degli strati è infatti modesto e dunque idoneo a consentire la diffusione dei gas.

L'epitelio lamellare si origina da cellule non differenziate dell'epitelio del filamento (Morgan, 1974) ed è costituito da due strati di cellule.

Tra lo strato più interno (sierosale o basale) e quello più esterno (mucosale o apicale), si colloca uno spazio intercellulare, che comunica con il seno venoso centrale attraverso gli spazi intercellulari dell'epitelio del filamento.

Le cellule che compongono i due strati presentano caratteristiche differenti ma in entrambi i casi è stata evidenziata, mediante studi al microscopio elettronico, la presenza nel citoplasma di numerosi organuli cellulari che sono indice dell'intensa attività di tutte le cellule (Laurent & Dunel, 1980).

Lo strato mucosale è costituito principalmente da cellule pavimentose; queste sono dotate di un apparato di Golgi molto sviluppato, di un abbondante reticolo endoplasmatico rugoso e di numerose vescicole di secrezione di differenti dimensioni.

Probabilmente la funzione di questo strato epiteliale è quella di costituire una barriera impermeabile all'acqua ed agli ioni per consentire il controllo nell'efflusso o nell'influsso attraverso la superficie branchiale la quale ha dimensioni quasi doppie rispetto all'intera area di superficie del corpo dell'animale (Hughes, 1979).

Le cellule superficiali sono legate tra loro tramite giunzioni strette e desmosomi; non sono state osservate giunzioni "gap".

Le giunzioni strette sono state studiate in esemplari di *Mugil capito* adattati all'acqua di mare e all'acqua dolce; in entrambi i casi sono state osservate giunzioni piuttosto lunghe, costituite da 5 a 9 microfilamenti anastomizzati tra loro. Questo modello di disposizione, che non varia in base al tipo di ambiente in cui l'animale vive, è compatibile con la classificazione delle giunzioni generalmente utilizzata e l'epitelio lamellare

può essere considerato un epitelio "stretto" e, pertanto, impermeabile agli elettroliti.

La superficie delle cellule è ricoperta da un materiale lanuginoso, contenente gruppi polisaccaridici; questo strato mucoso, probabilmente, si è ancora alle microcreste di superficie, evidenziate da Laurent & Dunel (1980) con studi di microscopia elettronica a scansione.

Lo strato basale o sierosale dell'epitelio lamellare è costituito, invece, da cellule poco o niente affatto differenziate, le quali sono a diretto contatto con la lamina basale. Il rapporto nucleo/citoplasma di queste cellule è molto elevato e la presenza di numerosi ribosomi liberi e di un reticolo endoplasmatico rugoso ben sviluppato suggeriscono l'inizio di un processo di differenziazione di queste cellule (Laurent & Dunel, 1980). Presumibilmente, la funzione di questo strato di cellule in differenziazione è quella di sostituire lo strato di cellule superficiali, così come si verifica con le cellule basali dell'epitelio del filamento. Solo occasionalmente le cellule basali si differenziano nelle "chloride-cells" (Laurent & Perry, 1991).