



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE
INDIRIZZO COMUNE
CICLO XXVI

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**Valutazione dello stato di benessere in riproduttori di
Venerupis philippinarum e *Venerupis decussata* e studio dei
primi stadi di sviluppo**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

Supervisore: Ch.mo Prof. Giuseppe Radaelli

Dottorando: Michele Boscolo Papo

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE GENERALE	5
2. PROVA DI STRESS INDOTTO	11
2.1 INTRODUZIONE	13
2.2 MATERIALI E METODI.....	14
2.2.1 Protocollo sperimentale	14
2.2.2 Analisi radioimmunologica (RIA)	15
2.2.3 Estrazione steroidi	17
2.2.4 Analisi statistica	18
2.3 RISULTATI	18
2.4 DISCUSSIONE.....	20
3. SPERIMENTAZIONE LAGUNA DI VENEZIA	23
3.1 INTRODUZIONE	25
3.2 MATERIALI E METODI	27
3.2.1 Campionamento	27
3.2.2 Analisi chimiche	28
3.2.3 Analisi istologiche ed immunoistochimiche	28
3.2.4 TBARS	29
3.2.5 Metallotioneine	29
3.2.6 Analisi statistica	30
3.3 RISULTATI	31
3.3.1 Analisi chimiche	31
3.3.2 Istologia	31
3.3.3 Immunoistochimica	35
3.3.4 TBARS	37
3.3.5 Metallotioneine	37
3.4 DISCUSSIONE	38

4. TRATTAMENTO CON B(A)P	43
4.1 INTRODUZIONE	45
4.2 MATERIALI E METODI	48
4.2.1 Animali	48
4.2.2 Analisi chimiche	49
4.2.3 Analisi istologica	49
4.2.4 Estrazione RNA ed espressione GSTr e CYP4 con RT-PCR	49
4.2.5 Analisi TBARS	50
4.2.6 Analisi statistiche	51
4.3 RISULTATI	51
4.3.1 Concentrazione di B(a)P	51
4.3.2 Istopatologia	52
4.3.3 Espressione CYP4	55
4.3.4 Espressione GSTr	55
4.3.5 Analisi TBARS	56
4.4 DISCUSSIONE	57
5. STUDIO SULLA RIPRODUZIONE	61
5.1 INTRODUZIONE	62
5.2 MATERIALI E METODI	64
5.2.1 Campionamento degli animali	64
5.2.2 Preparati istologici	65
5.2.3 Valutazione dello stadio gonadico	65
5.2.4 Analisi RIA	66
5.2.5 Analisi statistica	66
5.3 RISULTATI	67
5.3.1 Gametogenesi	67
5.3.2 Dosaggio degli steroidi	72
5.4 DISCUSSIONE	74
6. SVILUPPO LARVALE	79
6.1 INTRODUZIONE	80

6.2 MATERIALI E METODI	81
6.3 RISULTATI	82
6.4 DISCUSSIONE	86
7. CONCLUSIONI	93
8. BIBLIOGRAFIA	95

RIASSUNTO

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare: 1) lo stato di benessere in riproduttori di vongola *Venerupis philippinarum* e *Venerupis decussata* con l'utilizzo di biomarcatori (cortisolo, marcatori di stress ossidativo, enzimi di detossificazione); 2) la riproduzione e i primi stati larvali di questi molluschi.

La prima sperimentazione ha valutato la variazione del cortisolo in vongole sottoposte a due tipi di stress: anossia e digiuno. E' stata evidenziata una tendenza all'aumento del cortisolo negli animali sottoposti ad anossia e una diminuzione negli animali a digiuno. In un successivo lavoro sono stati valutati la morfologia generale e la risposta allo stress ossidativo in vongole campionate in vari siti della Laguna di Venezia. L'analisi istologica ha rivelato la presenza del parassita *Perkinsus olseni* negli animali di tutti i siti con un'intensa risposta immunitaria da parte dell'ospite. Gli emociti implicati nella risposta immunitaria, hanno mostrato una immunopositività agli anticorpi dello stress ossidativo.

Nell'intento di individuare dei marcatori di stress, visto che i molluschi bivalvi sono spesso utilizzati come bioindicatori dell'inquinamento ambientale, si è deciso di valutare l'espressione di alcuni geni (CYP4-GSTr) implicati nei processi di depurazione degli xenobiotici, in animali sottoposti a differenti dosi di benzo(a)pirene. L'analisi dell'espressione del GSTr ha mostrato un aumento significativo dell'mRNA negli animali sottoposti alla dose maggiore, ma l'analisi dell'espressione del CYP4 non ha evidenziato differenze tra i trattamenti. Su questi animali, l'analisi istopatologica ha evidenziato, negli animali trattati, un incremento di un tipo particolare di cellule coinvolte nei processi di detossificazione nei molluschi chiamate *brown cells*.

Per quanto riguarda lo studio sulla riproduzione di questi bivalvi, è stata condotta un'analisi istologica per valutare la maturazione gonadica e una analisi radioimmunologica per determinare la variazione degli steroidi sessuali in animali pescati in natura e stabulati presso l'impianto di Veneto Agricoltura alle condizioni previste dal protocollo dell'Azienda per la produzione di larve di vongola, al fine di ottenere informazioni per eventualmente migliorarlo. Gli steroidi sessuali testosterone, estradiolo e progesterone sono risultati essere implicati nello sviluppo gonadico delle

vongole. L'analisi istologica ha evidenziato differenti tempi di maturazione delle gonadi delle due specie di *Venerupis* analizzate. Lo studio sullo sviluppo larvale ha permesso di fornire informazioni utili sui tempi di sviluppo dei primi stadi larvali.

ABSTRACT

The aim of this work was to study: 1) the welfare in breeders of clam (*Venerupis philippinarum* and *Venerupis decussata*) using different biomarkers (cortisol, stress oxidative biomarkers, detoxification enzymes); 2) the reproduction and the larval development of these molluscs.

The first study evaluated the variation of cortisol in clams subjected to the following stress conditions: anoxia and fasting. The study evidenced a tendency in the increase of cortisol in the animals under anoxia and a decrease in the animals under fasting conditions.

In a successive work was evaluated the general morphology and the oxidative stress response in clams sampled at different sites of the Venice Lagoon. The histological evaluation revealed the presence of the parasite *Perkinsus olseni* in animals from all sites, with an intense immunitary response of the hosts. The hemocytes, that participate at the inflammatory response, showed an intense immunopositivity to several antibodies of the oxidative stress.

The bivalve molluscs are often used as biondicator of environmental pollution, so we decided to evaluate the expression of two genes involved in the detoxification process of xenobiotics, in animals treated with different concentrations of benzo(a)pyrene. The expression of GSTr evidenced a significant increase of mRNA in the animals treated with the highest dose, but the analysis of CYP4 expression did not evidence differences among treatments. In treated animals, the histopatological analysis revealed an increase of a particular type of cells involved in the detoxification process of molluscs called brown cells.

In the second part of the work we investigated about the reproduction of these bivalves using an histological approach to evaluate the gonad maturation and a radioimmunoassay method to analyse the sex steroids variation. The steroids progesterone, 17 β -estradiol and testosterone resulted involved in the gonad maturation of the clams. The histological analysis revealed a different time of maturation of the two species of clams. The study of the larval development revealed useful information about the larval management.

1. INTRODUZIONE GENERALE

Venerupis philippinarum e *Venerupis decussata*, sono molluschi bivalvi che vivono in ambiente lagunare. *V. decussata* è la vongola autoctona italiana, diffusa nell'area atlantica-mediterranea, dalle Isole Britanniche al Senegal, in tutto il Mediterraneo fino al mar Rosso (Cesari e Pellizzato, 1990). *V. philippinarum*, originaria del Giappone, Corea e Filippine, è stata dapprima introdotta involontariamente in Nord America negli anni '30; in seguito, tra gli anni '70 -'80, è stata importata in Francia, Inghilterra e Irlanda per scopi di acquacoltura. In Italia è stata introdotta nella Laguna di Venezia negli anni '80 per contribuire allo sviluppo della molluschicoltura (Pellizzato, 1990). Durante il primo decennio dall'introduzione, questa specie si è diffusa molto velocemente nelle lagune vicine trovando un habitat molto favorevole e portando alla formazione di banchi naturali per la produzione di seme. Rispetto a *V. decussata* presenta un accrescimento più rapido, ampia tolleranza alle variazioni di temperatura, salinità e qualità del substrato (Boatto e Pellizzato, 2005); proprio per queste caratteristiche è riuscita a diffondersi notevolmente riducendo la presenza della specie nostrana che attualmente, nelle lagune del Nord Adriatico, è presente in pochissimi esemplari (Pellizzato, 1990).

In circa 10 anni dalla sua introduzione nelle lagune del Nord Adriatico, *V. philippinarum* ha raggiunto livelli produttivi molto elevati, con un picco di produzione nel 1999 pari a 53 mila tonnellate (Veneto Agricoltura, 2013). La regione Veneto è infatti diventata *leader* nella produzione di vongole veraci e l'Italia, all'inizio del 2000, si è confermata secondo produttore a livello mondiale dopo la Cina (FAO, 2014). Gli allevatori sono normalmente organizzati in cooperative a cui vengono assegnate le aree di allevamento sotto forma di concessioni demaniali o di permessi esclusivi di pesca. A partire dagli anni 2000 si è assistito inizialmente ad un arresto della produzione e poi ad una progressiva diminuzione dovuta soprattutto ad una riduzione degli stock naturali; questo fatto ha comportato il passaggio da un tipo di pesca libera o gestita ad una attività di allevamento. I dati ufficiali delle produzioni del 2011 riportano 11524 tonnellate per le lagune del Delta del Po e 2868 per la Laguna di

Venezia (Veneto Agricoltura, 2013).

V. philippinaurum e *V. decussata* sono molluschi bivalvi filtratori, appartenenti alla famiglia dei Veneridi, comunemente noti come molluschi eduli. Il corpo è protetto esternamente da una conchiglia formata da due valve unite da una cerniera. I due muscoli adduttori servono per tenere le valve chiuse, la cui apertura è regolata dai legamenti della cerniera. Per spostarsi e per infossarsi nel terreno usano il piede, organo a forma di scure che si dilata per la pressione dell'emolinfa. Il mantello racchiude completamente l'animale all'interno della conchiglia delimitando uno spazio con la conchiglia chiamato cavità palleale (Cesari e Pellizzato, 1990; Gosling, 2003; De Vico e Carella, 2012). I margini posteriori delle pieghe del mantello costituiscono i sifoni che sono le due aperture, una inalante ed una esalante, per il flusso dell'acqua. Sono organismi filtratori, e grazie alle ciglia presenti nelle branchie, riescono a raccogliere il cibo, trasportarlo alla bocca e indirizzarlo allo stomaco dove viene digerito (Gosling, 2003). Lo stomaco è in comunicazione con la ghiandola digestiva che è il centro della regolazione metabolica ed è coinvolta nei processi di difesa immunitaria, regolazione omeostatica, sintesi degli enzimi digestivi e detossificazione degli xenobiotici (De Vico e Carella, 2012). La digestione extracellulare avviene ad opera dello stilo. Si tratta di una struttura che viene fatta roteare in modo che la sua estremità strofini contro una parte ispessita dello stomaco che consumandosi consente la liberazione degli enzimi necessari per la digestione dei glucidi. Il cibo continua il suo percorso nell'intestino che termina con l'ano. Il sistema circolatorio è di tipo aperto, costituito per cui da seni venosi; non sono presenti capillari per una microcircolazione chiusa (De Vico e Carella, 2012). L'emolinfa scorre tra i tessuti aggregandosi nei seni. Il cuore è costituito da due atri e da un ventricolo. Dal ventricolo si origina un'aorta che si allarga e si divide in due rami principali: l'arteria palleale, che irrorà il mantello e l'arteria viscerale che interessa la ghiandola digestiva e il tratto gastrointestinale. Il sangue viene filtrato dal rene e passa poi in parte alle branchie dove viene ossigenato e ritorna poi agli atri (Cesari e Pellizzato, 1990). L'emolinfa serve per il trasporto dell'ossigeno, l'osmoregolazione, la distribuzione dell'alimento, l'eliminazione di scorie e difesa immunitaria. Contiene infatti gli emociti che, nei molluschi rappresentano le cellule deputate alla risposta

immunitaria. Gli emociti sono distinti in granulociti e ialinociti. I granulociti hanno attività fagocitaria, possiedono un nucleo piccolo ma ampio citoplasma e granuli citoplasmatici, gli ialinociti sono cellule più piccole con poco citoplasma e pochi granuli citoplasmatici e non esercitano fagocitosi (De Vico e Carella, 2012). Il sistema nervoso è ridotto e non esiste un capo differenziato. E' costituito da due gangli cerebroidi che formano un anello periesofageo con un paio di gangli pleurali. Da questo anello si dipartono un paio di gangli pedali ed una coppia di gangli viscerali che vanno ad innervare rispettivamente il piede e i visceri (Cesari e Pellizzato, 1990).

Nella denominazione italiana (DM 31 gennaio 2008) sono chiamate entrambe vongole veraci, e per il consumatore risulta difficile la distinzione fra le due specie. *V. philippinarum* presenta una conchiglia con guscio più tondeggiante e robusto rispetto alla specie nostrana che appare di forma appiattita e più sottile. La colorazione della conchiglia è molto varia in entrambe le specie con striature radiali che si incrociano con strie concentriche. Oltre alla diversa posizione di attacco del corpo molle alla conchiglia, la caratteristica anatomica più evidente è costituita dai sifoni, che si presentano completamente separati in *V. decussata*, mentre sono per buona parte fusi e solo apicalmente separati in *V. philippinarum*.

Questi molluschi sono molto spesso utilizzati come modello sia in studi di laboratorio per indagini ecotossicologiche sia in programmi di biomonitoraggio quali indicatori della qualità ambientale (Nasci et al., 2000; Matozzo et al., 2003; 2004; Da Ros e Nesto, 2005; Matozzo e Marin 2005). Questo perché sono organismi filtratori e sono in grado di accumulare numerosi inquinanti, sono caratterizzati da scarsi spostamenti ambientali, presentano una facile reperibilità stagionale e un lungo ciclo vitale. Per queste ragioni, rappresentano dei validi animali sentinella in grado di fornire informazioni precise di una determinata zona.

Gli studi di biomonitoraggio prevedono la valutazione degli effetti dell'inquinamento sugli organismi viventi. Si valutano per cui le variazioni ecologiche e dei parametri biologici causate da sostanze inquinanti. Con il biomonitoraggio è possibile determinare lo stato ambientale degli ecosistemi, stimando le alterazioni da situazioni di base dell'indicatore preso in esame (Manning e Feder, 1980).

Nelle indagini eco-tossicologiche, per ottenere informazioni circa gli effetti degli inquinanti sulle popolazioni, vengono impiegati i biomarker. Secondo Depledge (1994), i biomarker sono le variazioni biochimiche, cellulari, fisiologiche o comportamentali che possono essere misurate in un fluido biologico o nell'organismo fornendo informazioni sull'esposizione a uno o più inquinanti.

Il presente lavoro nasce da una collaborazione con Veneto Agricoltura, l'Azienda della Regione Veneto per i settori agricolo, forestale ed agro-alimentare. L'Azienda è stata istituita con la Legge Regionale n. 35 del 5 settembre 1997 ; tra le priorità dell'azienda fa parte lo sviluppo dei settori della pesca e dell'acquacoltura, attraverso la continua ricerca applicata a tecnologie innovative o a nuove specie che potenzialmente possano dare un impulso positivo e migliorativo alle economie del settore su scala regionale.

I Centri di Veneto Agricoltura operativi nel settore dell'acquacoltura marina sono:

- Il centro ittico sperimentale di Pellestrina (Pellestrina - VE): avannotteria qualificata nella messa a punto di tecniche di riproduzione di specie ittiche marine e schiuditoio specializzato nella riproduzione di molluschi.
- Il centro ittico sperimentale Bonello (Porto Tolle - RO): valle da pesca orientata alle attività di sperimentazione su specie ittiche nuove e tradizionali, crostacei e molluschi.

Il centro ittico sperimentale di Pellestrina è un'avannotteria tra le prime sorte in Europa, situata nella laguna veneta presso l'isola di Pellestrina. L'impianto ha iniziato con sperimentazioni pionieristiche sulla riproduzione e l'allevamento larvale del branzino (*Dicentrarchus labrax*) ed orata (*Sparus aurata*). L'Azienda Regionale Veneto Agricoltura gestisce direttamente l'impianto da metà degli anni '90, integrando la produzione e la sperimentazione riguardante le specie ittiche tradizionali sopra citate, con prove su specie nuove per l'acquacoltura, come ombrina (*Umbrina cirrosa*) e sogliola (*Solea solea*), sulle quali sono stati messi a punto, nell'ultimo decennio, i protocolli di riproduzione (in collaborazione con il Consiglio Nazionale delle Ricerche – ISMAR di Venezia e l'Università di Padova) ed allevamento dai primi stadi di vita, fino all'ingrasso (generalmente condotto nel Centro Bonello). Altre sperimentazioni hanno riguardato lo studio della riproduzione del cefalo bosega (*Chelon labrosus*),

specie tipica della vallicoltura tradizionale, ed indagini sul benessere dei pesci allevati, in collaborazione con l'Università di Padova e con l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA).

Nel recente passato, presso il Centro di Pellestrina, sono iniziate attività riguardanti la produzione di vongole *V. philippinarum* e *V. decussata* e ostrica concava *Crassostrea gigas*.

Il centro ittico sperimentale Bonello è ubicato sull'isola di Donzella, nel Delta del Po, in prossimità degli argini della Sacca degli Scardovari, comune di Porto Tolle (RO). Si tratta di una zona valliva assegnata negli anni '60 all'E.S.A.V. (Ente di Sviluppo Agricolo del Veneto successivamente inglobato in Veneto Agricoltura) con lo scopo di conservare la testimonianza delle attività svolte nelle valli da pesca. Il centro Bonello è, quindi, storicamente attivo soprattutto sulle tematiche attinenti la valorizzazione e la gestione della vallicoltura. Tra le principali attività condotte si ricordano: la vallicoltura in senso tradizionale, il preingrasso del seme di molluschi, la produzione e la sperimentazione nel settore della gambericoltura estensiva e semi-intensiva, le prove di produzione di specie nuove per l'acquacoltura locale e/o nazionale.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di individuare dei marcatori utili a valutare lo stato di salute di alcuni riproduttori di vongola e a determinarne anche la condizione di stress. Visto che questi animali vengono comunemente utilizzati come riproduttori presso lo schiuditoio di Pellestrina (fornisce giovani larve agli allevatori), sono stati eseguiti degli studi per approfondire le conoscenze sulla loro riproduzione.

Le sperimentazioni eseguite sono consistite in:

- una prova di stress indotto, attraverso anossia e digiuno, per valutare la variazione di cortisolo negli animali;
- una valutazione dello stato di salute di esemplari campionati in vari siti della Laguna di Venezia attraverso l'utilizzo di marcatori dello stress;
- una prova di stress acuto sottoponendo esemplari di vongole *V. philippinarum* ad un trattamento con B(a)P;

Inoltre, dal momento che il progetto nasce da una collaborazione in particolare con uno schiuditoio, si è deciso di aumentare le conoscenze sulla riproduzione degli esemplari

presenti presso la struttura e sullo sviluppo dei primi stadi larvali. Pertanto un lavoro ha interessato la valutazione della variazione ormonale e stadiazione di riproduttori di *V. philippinarum* e *V. decussata*, mentre una sperimentazione ha preso in esame la valutazione delle prime fasi larvali per fornire dati utili su queste prime fasi di vita.

2. PROVA DI STRESS INDOTTO

2.1 INTRODUZIONE

Secondo Lupo di Prisco e Dessì Fulgheri (1975), la steroidogenesi negli invertebrati avviene in modo molto simile ai vertebrati. Vari studi hanno indagato le vie enzimatiche descritte per i vertebrati nei molluschi sia esponendo gli animali ai precursori degli steroidi che incubando degli omogenati con precursori degli steroidi. Gli stessi Lupo di Prisco e Dessì Fulgheri (1975) hanno incubato tessuto proveniente dalle gonadi e dalla ghiandola digestiva di *Aplysia depilans* con pregnenolone e progesterone ottenendo fra i vari metaboliti anche il cortisolo. Inoltre anche in *Callinectes sapidus* è stata verificata la steroidogenesi *in vivo* e *in vitro* partendo dal pregnenolone e progesterone (Tcholakian e Eik-Nes, 1969; 1971)

Alcuni autori hanno verificato anche la presenza di enzimi chiave in questi processi come la 17 β -idrossilasi nel granchio *Portunus trituberculatus*, la 17 α idrossilasi e della 3 β HSD C17-20 liasi e della 17 β HSD e 5 α riduttasi in *Mytilus edulis* (Teshima e Kanazawa, 1970; 1971; De Loncamp *et al.*, 1974) Sembra associato pertanto che gli enzimi chiave della steroidogenesi si siano conservati durante l'evoluzione.

Gli steroidi sono sintetizzati nei tessuti steroidogenici da un comune precursore: il colesterolo. Uno studio della composizione degli steroli in *Mytilus edulis* e *Mya arenaria* ha dimostrato che il colesterolo è il componente più presente dimostrando che anche i precursori degli steroidi sono presenti nella specie e più in generale nei molluschi (Jarzebski, 1985).

Molti degli studi effettuati su questo argomento si sono focalizzati sugli steroidi sessuali quali testosterone, estradiolo e progesterone e sulla loro implicazione nei processi riproduttivi dei molluschi. Praticamente nulli sono invece i lavori sugli altri steroidi come il cortisolo nonostante la via di sintesi del cortisolo e la presenza dei recettori per l'ormone di rilascio della corticotropina (CRH) e per l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) siano stati dimostrati in alcune specie (Lupo di Prisco e Dessì Fulgheri, 1975; Ottaviani *et al.*, 1992). Nei vertebrati CRH e ACTH sono all'apice di una risposta neuroendocrina che coinvolge il sistema nervoso centrale, ipotalamo, ipofisi e ghiandole surrenali o tessuto interrenale nel caso dei pesci e che culmina con il rilascio di catecolamine e di corticosteroidi, cortisolo o corticosterone a seconda delle

specie. Questa risposta, generalmente chiamata risposta allo stress, si attua ogniqualvolta l'organismo avverte una situazione di pericolo reale o percepito tale e gli consente di contrastarlo. Si tratta di una risposta adattativa che consente all'animale di rispondere ai cambiamenti ambientali o a condizioni avverse mantenendo una condizione di omeostasi. Catecolamine e soprattutto i corticosteroidi producono degli effetti metabolici e fisiologici che aiutano a contrastare il cosiddetto "stressore" rendendo reattivo l'organismo e mettendo principalmente a disposizione i substrati energetici necessari. Il cortisolo, chiamato anche ormone dello stress, si innalza rapidamente in seguito all'esposizione al fattore stressogeno pertanto i suoi livelli circolanti o in altre matrici biologiche vengono molto comunemente utilizzati come indicatori di stress (Wendelaar Bonga, 1997). I potenziali fattori di stress finora identificati nei vertebrati sono molteplici: presenza del predatore, conflitti sociali, digiuno ma anche fattori ambientali come variazioni termiche, anossia, densità di allevamento, etc.

Allo stato attuale, nei molluschi non è stata verificata la presenza di una risposta allo stress analoga a quella dei vertebrati nonostante siano state dimostrate le vie di sintesi del cortisolo e la presenza di CRH e ACTH.

Nel presente studio, allo scopo di verificare questa ipotesi e di ottenere così strumenti validi per monitorare le potenziali condizioni di stress in ambiente e soprattutto in allevamento, esemplari di *Venerupis philippinarum* sono stati esposti a fattori potenzialmente stressogeni quali l'anossia mediante esposizione all'aria e il digiuno e, su questi, si sono valutati su questi i livelli di cortisolo in emolinfa, ghiandola digestiva e resto animale.

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 Protocollo sperimentale

Gli esemplari di *V. philippinarum* utilizzati per questa sperimentazione sono stati pescati in aree di concessione della Laguna di Venezia e trasportati in contenitori refrigerati presso il Dipartimento di Biologia dove si è svolta la parte sperimentale. Prima dell'esposizioni ai fattori di stress, gli animali sono stati acclimatati alle

condizioni di stabulazione per una settimana. Durante l'acclimatemento, gli animali sono stati mantenuti in vasche di vetro (alla densità di 1 litro/animale), in assenza di sedimento, con acqua marina aerata alla temperatura di $16,5 \pm 0,5$ °C e alla salinità di $36 \pm 1\%$ e alimentati con microalghe della specie *Isochrysis galbana* (Fig. 1).



Fig. 1. Laboratorio di stabulazione delle vongole *V. philippinarum*.

Successivamente gli animali sono stati sottoposti a due differenti fattori di stress. Un gruppo è stato sottoposto a digiuno e un altro ad anossia mediante esposizione all'aria. Gli animali di controllo hanno continuato ad essere alimentati con alghe unicellulari. La sperimentazione ha avuto la durata di 7 giorni e gli animali sono stati campionati a 1-3-7 giorni dall'inizio del trattamento. Gli animali esposti all'aria sono morti dopo 5 giorni. Al termine della sperimentazione sono stati campionati 12 animali per gruppo. Di ciascun esemplare si sono prelevati l'emolinfa, la ghiandola digestiva e il resto dell'animale e i campioni sono stati mantenuti a -20° C fino al momento dell'analisi.

2.2.2 Analisi radioimmunologica (RIA)

Il dosaggio del cortisolo sulle matrici prelevate è stato effettuato mediante analisi radioimmunologica (Radioimmunoassay-RIA) su micropiastra opportunamente messa a punto e validata per la specie.

L'analisi RIA prevede l'utilizzo di tre componenti principali: un antigene libero che corrisponde all'analita, un antigene marcato con tracciante radioattivo e un anticorpo specifico comune. Alla base dell'analisi c'è la competizione fra l'antigene libero e l'antigene marcato determinata dal fatto che l'anticorpo specifico è presente in difetto: maggiore è la concentrazione dell'analita presente, minore sarà la quantità del tracciante radioattivo che si lega all'anticorpo. Grazie alla specificità dell'anticorpo e all'elevata affinità fra questo e l'antigene, questo sistema analitico possiede una elevata sensibilità e specificità. Questa tecnica è stata utilizzata per la prima volta per il dosaggio dell'insulina plasmatica nell'uomo nel 1959, si è poi utilizzata per il dosaggio di ormoni, farmaci, vitamine, enzimi, virus e numerose altre sostanze (Kubasik, 1984). La metodica utilizzata nel presente studio è un RIA su micropiastra in poliestere da 96 pozzetti (Packard, optiplat 96 well PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA).

Le piastre utilizzate sono state da prima preparate distribuendo nei 96 pozzetti 200 µl di anticorpo secondario anti- γ globuline di coniglio (diluito 1:600 con tampone sodio acetato 0,15mM pH 9,0). Dopo un'incubazione a 4 °C overnight la piastra è stata svuotata ed aggiunti ad ogni pozzetto 200 µl di tampone RIA ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 61mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40mM, NaCl 154 mM, pH 7,2 + BSA 0,1%) e incubata per 1 ora a 4°C, svuotata e conservata a -20°C.

Successivamente ogni piastra è stata incubata a 4°C overnight con 200µl dell'anticorpo specifico anti-cortisolo (Anti-CORT-3-CMO-BSA, Centro Medico Diagnostico Emilia-diluizione 1:18000) L'anticorpo non è stato aggiunto nei 2 pozzetti di controllo Attività Totale (-AT) e legame non specifico (-NSB).

Dopo l'incubazione ciascun pozzetto è stato lavato con 200 µl di tampone RIA e poi la piastra è stata asciugata. I campioni sono stati caricati in doppio con 100 µl di estratto e tampone RIA fino all'ottenimento di un volume finale di 200 µl nel pozzetto. Prima di incubare la piastra overnight sono stati aggiunti in tutti i pozzetti 10 µl di tracciante radioattivo (1,2,6,7- ^3H cortisolo Duport Nen). Oltre ai controlli dell'attività totale (AT) e del legame non specifico (NSB) che monitorano la radioattività totale e la presenza di legami aspecifici, su ciascuna piastra si sono caricati anche campioni a concentrazione

nota dell'analita (estratti di plasma bovino) e la curva di taratura. Il giorno seguente la piastra è stata lavata con tampone RIA tranne per i pozzetti di controllo (AT e NSB). Prima della lettura al β -counter (Top-Count, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) sono stati aggiunti 200 μ l di liquido scintillante (Microscint, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA). Il β -counter attraverso una curva di taratura fornisce la concentrazione ormonale dei campioni espressa in pg/pozzetto. La curva di taratura è stata formata dosando quantità note di ormone marcato. L'anticorpo anti-cortisolo utilizzato presenta le seguenti caratteristiche di specificità: cortisolo 100%, prednisolone 44,3%, 11-desossicortisolo 13,9%, cortisone 4,95%, corticosterone 3,5%, prednisone 2,7%, 17-idrossiprogesterone 1%, 11-desossicorticosterone 0,3%, desametasone 0,1%, progesterone < 0,01%, 17-idrossipregnenolone < 0,01%, pregnenolone < 0,01%.

Per stabilire l'accuratezza e la precisione del sistema analitico si sono effettuati dei test di validazione del metodo di dosaggio: il test di diluizione, di ripetibilità e la resa estrattiva.

Test di diluizione: serve a verificare che a diluizioni seriali del campione corrisponda una riduzione proporzionale della concentrazione dell'ormone da dosare.

Test di ripetibilità: valuta la riproducibilità all'interno dello stesso saggio; si effettua inserendo, fra i campioni ignoti, campioni a concentrazioni note. Un buon sistema di dosaggio deve avere un coefficiente di variazione minore del 10%.

Resa estrattiva: verifica l'efficacia dell'estrazione effettuata sulle matrici in esame. I campioni, prima di essere estratti, vengono addizionati alla soluzione marcata a concentrazione nota e la lettura effettuata sui campioni permette di stabilire la percentuale di soluzione marcata che viene recuperata dopo l'estrazione.

2.2.3 Estrazione steroidi

Il dosaggio ormonale è stato effettuato previa estrazione degli steroidi da 100 mg di ghiandola digestiva, 500 mg del resto dell'animale e 500-700 μ l di emolinfa di *V. philippinarum*.

L'estrazione è stata ottenuta omogenando i campioni con un potter di vetro e

aggiungendo 250-500 µl di tampone RIA e 8 ml di etere etilico. Le provette agitate con agitatore orizzontale per 10 minuti e centrifugate a 2700g a 5°C per 5 minuti sono state poi messe in freezer -20°C per separare la fase acquosa. Il surnatante così ottenuto è stato decantato in provette coniche e portato a secco sotto corrente d'azoto. Infine, il residuo secco è stato risospeso in tampone RIA e caricato sulla piastra.

2.2.4 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante il software STATISTICA 9.1 (StatSoft, Inc). Essendo presenti significative deviazioni dagli assunti di normalità e omogeneità delle varianze fra i gruppi in esame si sono utilizzati test non parametrici quali l'ANOVA per ranghi di Kruskal Wallis seguita da confronti multipli bilaterali. Le differenze tra le medie sono state considerate significative se associate ad un livello di probabilità inferiore a 0,05. I risultati sono stati espressi come media \pm errore standard (ES)

2.3 RISULTATI

L'analisi RIA ha confermato la presenza del cortisolo o di una molecola cortisolo simile in tutte e tre le matrici di *V. philippinarum* e *V. decussata* testate ovvero emolinfa, ghiandola digestiva e resto animale.

I test di validazione del dosaggio del cortisolo in *V. philippinarum* sono stati effettuati solamente per la ghiandola digestiva perché i livelli di ormone riscontrati nelle altre due matrici prelevate erano molto bassi (resto animale, concentrazione media 0,05 ng/g, risultati non riportati) o al limite della sensibilità del metodo di dosaggio (emolinfa). I risultati dei test di validazione del dosaggio del cortisolo per la ghiandola digestiva (diluizione, ripetibilità e resa estrattiva) sono riportati in Tab. 1. Il coefficiente di determinazione (r^2) evidenzia una ridotta dispersione dei punti e il valore medio del coefficiente di variazione intra-assay (C.V. %) conferma la buona riproducibilità del sistema di dosaggio.

Ormone	$y = ax + b$	r^2	C.V. %	ER%
Cortisolo	$y = 14,5x - 0,2$	0,999	3,8	63,0

Tab.1. Risultati dei test di validazione del dosaggio del cortisolo nella ghiandola digestiva di *V. philippinarum*.

I valori medi dei livelli di cortisolo nella ghiandola digestiva degli animali sottoposti ai diversi stress sono riportati in Fig.2. La morte precoce degli animali esposti all'aria ha ridotto a 5 giorni la durata della sperimentazione rispetto al gruppo sperimentale sottoposto a digiuno e al controllo (7 giorni) ed questo ha reso impossibile il confronto fra i livelli di cortisolo degli animali di tutti i gruppi sperimentali nel campionamento finale. Si sono operati pertanto solamente confronti fra i livelli di cortisolo nei diversi giorni di campionamento (1-3-5 o 7 giorni dall'inizio del trattamento) entro gruppo sperimentale (anossia, digiuno e controllo) con il risultato che, nonostante la tendenza all'aumento nel caso degli animali sottoposti ad anossia e ad una riduzione nel caso degli animali sottoposti a digiuno, non si sono riscontrate differenze significative a parte negli animali di controllo ($p < 0,001$).

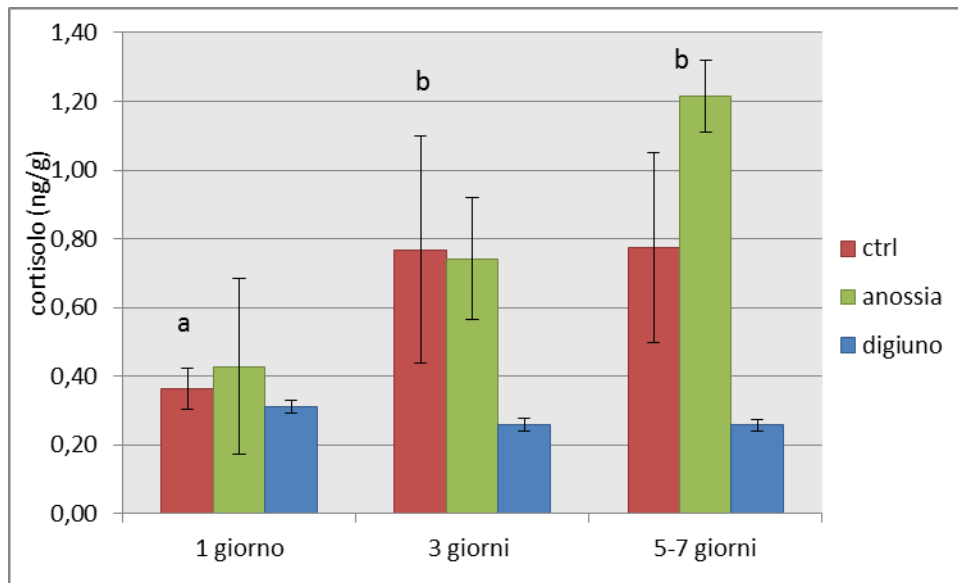


Fig.2. Livelli di cortisolo della ghiandola digestiva di *V. philippinarum* dopo 1-2-5 o 7 giorni di trattamento. I dati sono riportati come media \pm ES. A lettere diverse corrisponde una differenza significativa.

2.4 DISCUSSIONE

La risposta allo stress nei vertebrati prevede l'attivazione di una risposta neuroendocrina che coinvolge sistema nervoso centrale, ipotalamo, ipofisi e ghiandole surrenali o tessuto interrenale con la produzione finale di corticosteroidi, cortisolo o corticosterone. Il cortisolo circolante, in molte specie di vertebrati ma soprattutto nei pesci, viene utilizzato come indice di stress acuto (Wendelaar Bonga, 1997) perché i suoi livelli si innalzano quando l'animale è sottoposto a diversi fattori di stress quali per esempio variazioni ambientali (temperatura, ossigeno, salinità, disponibilità di cibo) o sociali (dominanza etc). Numerosi studi hanno dimostrato che le vie steroidogeniche in alcune specie di mollusco sono comuni a quelle dei vertebrati evidenziando una loro conservazione nella linea evolutiva. Gli studi si sono concentrati soprattutto sugli steroidi sessuali e sul loro potenziale effetto nei processi riproduttivi mentre poco o nulla si sa del cortisolo e del suo ruolo in questi animali. Alcuni autori suggeriscono che la risposta allo stress nei molluschi possa essere comune rilevando la presenza anche in

questi animali, oltre che del cortisolo, anche di CRH e ACTH (Ottaviani *et al.*, 1992) ma allo stato attuale nessun autore ha ancora confermato questa ipotesi.

A tal fine, nel presente lavoro, esemplari di *V. philippinarum*, sono stati esposti per 5/7 giorni a due fattori potenzialmente stressanti, l'anossia ed il digiuno, e su questi si sono valutati i livelli di cortisolo mediante metodica RIA in tre matrici: l'emolinfa, la ghiandola digestiva e il resto animale. L'analisi ha confermato la presenza di questo ormone in tutte e tre le matrici con livelli diversi: molto bassi, al limite del metodo di dosaggio nell'emolinfa, un po' più elevati nel resto animale ma soprattutto preponderanti nella ghiandola digestiva o epatopancreas. La prevalente presenza degli steroidi in questo organo era già stato segnalato da altri autori (Ketata *et al.*, 2007; Negrato *et al.*, 2008) e fa ipotizzare un ruolo importante anche nella sintesi di queste molecole. Altra ipotesi, sostenuta da Le Curieux-Belfond *et al.* (2005) in *Crassostrea gigas*, è che la ghiandola digestiva rappresenti un sito di accumulo preferenziale degli ormoni steroidei rispetto agli altri tessuti.

Fra i fattori sperimentali potenzialmente utilizzabili per valutare il ruolo del cortisolo nella risposta allo stress, il digiuno ma soprattutto l'anossia all'aria si presentavano come quelli a maggior potere stressogeno ma, nonostante questo, si sono evidenziate nel corso della sperimentazione solamente delle tendenze all'aumento o al decremento dei livelli dell'ormone senza significatività statistica. L'elevato potere stressogeno dell'anossia, apparentemente testimoniato dal fatto che gli animali sono morti dopo 5 giorni di trattamento, non ha determinato variazioni significative dei livelli di cortisolo facendo fortemente supporre che questo ormone non sia coinvolto nella risposta allo stress in questi animali. Nei pesci, come la carpa, il salmerino e il merluzzo atlantico, si è visto che una diminuzione dell'ossigeno disponibile nell'acqua determina il rilascio di cortisolo (Van Raaij, 1996; Wendelaar Bonga, 1997; Iwama *et al.*, 2006; Bernier *et al.*, 2012; Boutin *et al.*, 2013). Va fatto notare tuttavia che si è registrata una elevata variabilità individuale che certamente ha influenzato il risultato finale dell'analisi. Il digiuno protratto per 7 giorni in *V. philippinarum*, ha invece prodotto una leggera tendenza alla riduzione dei livelli di cortisolo, comunque non significativa, che può essere stata determinata da un basso potere stressogeno del trattamento prodotto dalla

brevità del periodo di esposizione. E' possibile che il perdurare di questa condizione per tempi più lunghi determini una variazione più marcata dei livelli di questo ormone.

Nessuna conferma a questa ipotesi è possibile per la carenza di lavori sui molluschi e i tempi di resistenza al digiuno.

Nel presente studio, le uniche differenze significative nei livelli di cortisolo si sono riscontrate negli animali di controllo, stabulati per 7 giorni in condizioni apparentemente ottimali con alimentazione continua e buoni livelli di ossigeno. Già dopo 3 giorni dall'inizio del trattamento, il cortisolo degli animali di controllo è aumentato in maniera significativa per mantenersi poi elevato anche al 7° giorno di stabulazione. Pochi o nulli sono i dati presenti in letteratura su molluschi mantenuti a digiuno per periodi più o meno lunghi. Un aumento del cortisolo dopo un digiuno di 20 giorni e un ritorno ai livelli di controllo dopo 7 giorni di rialimentazione si è osservato nel gobide *Gillichthys mirabilis* mentre risultati contrastanti si sono riscontrati per altre specie con assente o molto blanda variazione dei livelli di quest'ormone in risposta a periodi di digiuno (Sumpter *et al.*, 1991; Reddy *et al.*, 1995; Kelley *et al.*, 2001; Pottinger *et al.*, 2003; Weber e Bosworth, 2005; Barcellos *et al.*, 2010). Più coerenti risultano invece i risultati nei mammiferi, dove si è visto che i livelli di cortisolo aumentano in risposta al digiuno (Ortiz *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2002).

La mancata o blanda variazione dei livelli di cortisolo negli animali mantenuti a digiuno nel nostro studio, fa ipotizzare un possibile coinvolgimento del cortisolo nel metabolismo di *V. philippinarum*. Questa ipotesi viene avvalorata se si considera anche la diminuzione, per quanto non significativa, che si è riscontrata negli animali mantenuti a digiuno. Anche Marin *et al.* (2003) hanno rilevato che animali provenienti dalla laguna di Venezia sono soggetti a cambiamenti nel metabolismo in inverno, quando l'alimentazione è ridotta o nulla, soprattutto per quanto riguarda le concentrazioni dei carboidrati. L'ipotesi più probabile è quindi che questo ormone, il cui significato metabolico è ampiamente dimostrato nei vertebrati superiori, svolga analoga funzione anche nei molluschi.

3. SPERIMENTAZIONE LAGUNA DI VENEZIA

3.1 INTRODUZIONE

V. philippinarum è un bivalve fossorio, filtratore; per i suoi scarsi spostamenti e la sua attitudine a filtrare che lo porta ad accumulare gli inquinanti presenti nell'ambiente in cui vive, può essere utilizzato come animale sentinella negli studi di biomonitoraggio ambientale (Matozzo *et al.*, 2005; Matozzo e Marin, 2007; Matozzo *et al.*, 2007; 2010;2012). La Laguna di Venezia è un ambiente caratterizzato da numerose attività antropiche che causano un inquinamento, in alcune zone anche molto elevato, dell'acqua e dei sedimenti. Attraverso l'utilizzo di biomarcatori è possibile valutare lo stato di salute degli animali impiegati negli studi di biomonitoraggio e indirettamente la qualità dell'ambiente in cui vivono.

Il metabolismo degli xenobiotici e delle altre fonti di stress ambientale causa, a livello cellulare, la formazione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) (Halliwell & Gutteridge, 2007). Queste sostanze sono prodotte naturalmente durante il metabolismo e sono eliminate dalle cellule in seguito all'attivazione di enzimi antiossidanti. Quando la loro produzione è elevata, l'organismo non è più in grado di eliminarli, passa per cui ad una situazione di stress ossidativo che comporta: perossidazione lipidica, formazione di carbonili proteici e morte cellulare (Winston e Di Giulio, 1991; Davies, 1995).

I perossidi sono i principali prodotti iniziali dell'ossidazione lipidica. Una volta raggiunto il picco massimo, il valore dei perossidi decresce per via della loro frammentazione in prodotti secondari. Il principale di questi prodotti è la MDA (malondialdeide). MDA si origina dalla degradazione degli acidi grassi polinsaturi ed è un'aldeide molto tossica con specifica affinità per le proteine e il DNA (Aldini *et al.*, 2007). Per determinarne il contenuto, una metodica molto diffusa è la tecnica T-BARS che si basa sulla reazione della MDA con il TBA (acido tiobarbiturico). Questa metodica prevede la reazione di una molecola di MDA con due di TBA per formare un complesso colorato di rosso che è quantificabile con lo spettrofotometro.

Delle le aldeidi che si formano dall'ossidazione dei lipidi fa parte l'HNE (4-idrossi-2-nonenale), che è coinvolta nell'inibizione della sintesi proteica e del DNA, nell'inattivazione degli enzimi ed è anche un agente mutageno (Aldini *et al.*, 2007).

Un altro indicatore di stress ossidativo è la nitrotirosina (NT), un marker di stress

ossidativo provocato da perossinitrito. Questo si forma dalla reazione del radicale libero superossido con l'ossido nitrico, ed essendo un agente ossidante può danneggiare proteine, lipidi e DNA (Ischiropoulos *et al.*, 1992).

Tra i bioindicatori rivestono un ruolo importante le HSP (Heat Shock Protein), chiamate anche proteine da stress, che sono proteine cellulari altamente conservate in tutti gli esseri viventi (Morimoto *et al.*, 1990; Iwama *et al.*, 1998; Feder e Hofmann, 1999). Oltre ad essere attivate da cambiamenti della temperatura, vengono indotte da molti altri fattori di stress, fra gli altri contaminanti ambientali, le patologie e le parassitosi. Fra queste un importante bioindicatore sono le HSP70 che proteggono la cellula da condizioni di stress assistendola nel folding delle proteine danneggiate (Morimoto *et al.*, 1990; Yamashita *et al.*, 2004). Nelle specie acquatiche l'espressione delle HSP70 è stata studiata nei pesci esposti a shock termico, pesticidi, virus, metalli e altri composti tossici (Eder *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2007; Maradonna e Carnevali, 2007; Bertotto *et al.*, 2011). Nei molluschi è stato dimostrato un loro aumento determinato dall'esposizione a contaminanti (Porte *et al.*, 2001; Rola *et al.*, 2012). In *Venerupis decussata* è stato osservato un aumento delle HSP70 in animali parassitati da *Perkinsus olseni* (Simao *et al.*, 2010).

Il Citocromo P4501A (CYP1A) è coinvolto nella biotrasformazione di numerosi contaminanti come gli idrocarburi policiclici aromatici, le policlorodibenzodiossine e i policlorobifenili e gioca un ruolo importante nella trasformazione dei pesticidi negli organismi acquatici (Stegeman e Hahn, 1994).

Le metallotioneine (MT) sono proteine ubiquitarie che sono state identificate in numerosi organismi inclusi vertebrati, invertebrati, piante e batteri (Kagi, 1993). Sono proteine a basso peso molecolare, ricche di gruppi sulfidrilici coinvolte nei processi di omeostasi (Viarengo *et al.*, 1999a). Le MT giocano un ruolo essenziale nel metabolismo dei metalli, nella detossificazione da metalli pesanti, nella risposta immunitaria e nei processi antiossidanti (Davis e Cousins, 2000; Serafim e Bebianno, 2010).

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di trovare dei biomarcatori utili a valutare lo stato di salute dei bivalvi *V. philippinarum* campionati in quattro differenti siti della Laguna di Venezia: Palude del Monte, Marghera, Ca' Roman e Val di Brenta. A tal fine

è stato utilizzato un approccio multidisciplinare. Mediante l'immunoistochimica si sono determinate la localizzazione e l'intensità di espressione nei differenti tessuti di alcuni marcatori di stress ossidativo quali CYP1A, HSP70, HNE e NT. Sugli stessi animali è stata eseguita anche un'analisi istopatologica. Per determinare il livello di perossidazione lipidica e la concentrazione di metallotioneine nella ghiandola digestiva si sono utilizzati metodi spettrofotometrici quali per esempio la tecnica TBARS (sostanze reattive all'acido tiobarbiturico) per la valutazione dell'MDA. Infine, su animali *in toto* è stata condotta, l'analisi chimica per la valutazione delle concentrazioni dei metalli pesanti (Cd, Cu, Hg, Pb) e degli IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici).

3.2 MATERIALI E METODI

3.2.1 Campionamento

Gli animali sono stati campionati in quattro siti della Laguna di Venezia caratterizzati da differente impatto ambientale: Palude del Monte, Marghera, Ca' Roman, Val di Brenta (Fig. 1). I molluschi bivalvi prelevati presentavano una lunghezza media della conchiglia di $4,03 \pm 0,3$ cm. Gli animali pescati sono stati subito trasferiti in laboratorio tramite contenitori refrigerati per essere processati a seconda delle analisi.

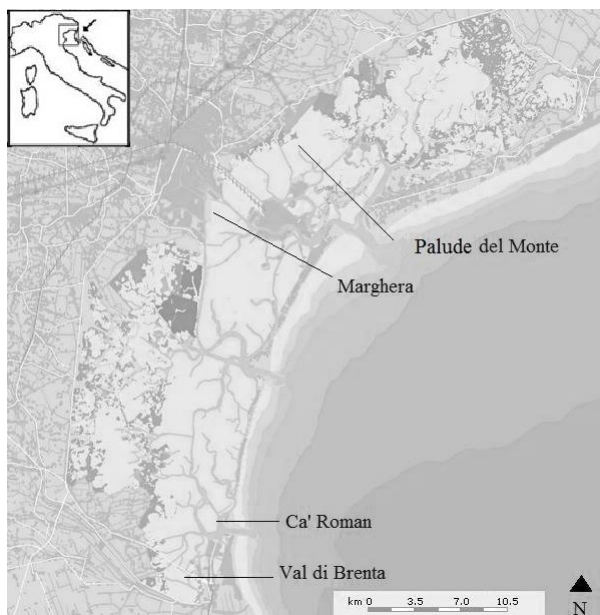


Fig.1 Mappa laguna di Venezia indicante i quattro siti di campionamento.

3.2.2 Analisi chimiche

Le analisi dei metalli pesanti e degli IPA sono state eseguite su 10 animali *in toto* per ciascun sito. Per determinare il contenuto di IPA si è proceduto con l'estrazione utilizzando il kit di estrazione Agilent (CA, USA) SampliQ Buffered QuEChERS AOAC. Dopo i vari passaggi del kit di estrazione, i campioni sono stati filtrati utilizzando dei filtri da siringa della Millipore e il contenuto è stato determinato in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Per le analisi dei metalli pesanti si è proceduto con spettrometria di assorbimento atomico dopo che i campioni sono stati processati con HNO₃ (digestione acida).

3.2.3 Analisi istologiche ed immunoistochimiche

Per l'analisi istologica ed immunoistochimica, 10 vongole per sito sono state fissate in paraformaldeide al 4% (preparata con tampone fosfato salino PBS, 0,1M pH 7,4) a 4°C per 24h. Il giorno seguente i campioni sono stati risciacquati utilizzando PBS e successivamente processati per essere inclusi in paraffina. Con l'utilizzo del microtomo sono state tagliate delle sezioni di 4 µm di spessore. Le sezioni ottenute sono state colorate sia con Ematossilina-Eosina che con metodo PAS (acido periodico-reattivo di Schiff) per poi valutare, con l'utilizzo del microscopio ottico, la struttura morfologica con particolare attenzione alla eventuale presenza di lesioni istopatologiche e di parassiti.

L'analisi immunoistochimica è stata eseguita con un immunocoloratore automatico (Autostainer link 48 Dako, Italy). Il recupero dell'antigene è stato eseguito incubando le sezioni in tampone sodio citrato 10 mM (pH 6) a 97°C per 15 minuti. La perossidasi endogena è stata neutralizzata incubando le sezioni per 10 minuti con EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801, Dako). Sono stati impiegati i seguenti anticorpi primari: anti-HSP70, policlonale in topo, diluito 1:200 (Stressgen Biotechnologies, USA), anti- CYP1A, policlonale in coniglio, diluito 1:500 (Biosense laboratories,

Norway), anti-NT, monoclonale in topo, diluito 1:1000 (GeneTex, Inc, USA), anti-HNE, monoclonale in topo, diluito 1:100 (Abcam, UK). Gli anticorpi sono stati diluiti in PBS 0,1M, pH 7,4 e l'incubazione delle sezioni è avvenuta overnight a 4 °C. Dopo opportuni lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate con il secondario EnVision FLEX/HRP (Dako) utilizzando come cromogeno il buffer substrato EnVision FLEX DAB (Dako). Sono state poi controcolorate con EnVision FLEX Hemato (Dako). Per verificare la specificità della reazione immunostochimica, le sezioni sono state incubate con PBS in sostituzione dell'anticorpo primario.

3.2.4 TBARS

Per determinare il contenuto di MDA, che rappresenta il composto principale che si forma a seguito della perossidazione degli acidi grassi, con gli animali provenienti da ciascun sito sono stati costituiti tre pool, ciascuno composto da 10 ghiandole digestive. Per determinarne il contenuto è stata sfruttata la reattività chimica della MDA con l'acido tiobarbiturico (TBA) utilizzando la metodica TBARS, come descritto da Yoshida *et al.* (2005). 200 mg di ciascun pool è stato omogenato e successivamente incubato a 100°C per 60 minuti con 0,2 ml di dodecilsolfato di sodio (SDS 8,1 %), 1,5 ml di tampone acido acetico (20% , pH 3,5), 1,5 ml di acido tiobarbiturico (1%), 0,775 ml di acqua e 0,05 ml di etanolo contenente idrossitoluene butilato (0,8%). Dopo raffreddamento in ghiaccio, è stato aggiunto 1 ml di acqua e 5 ml di alcol n-butile e piridina (15:1) e centrifugato a 1400g a 0°C per 10 minuti; il surnatante è poi stato misurato allo spettrofotometro a 535 nm. Il tetrametossipropano è stato usato come standard per determinare le nmoli di malondialdeide per grammo di ghiandola digestiva.

3.2.5 Metallotioneine

Il contenuto di metallotioneine è stato determinato con metodo spettrofotometrico seguendo la metodica specifica per molluschi, descritta da Viarengo *et al.*, 1997. Il pool di 10 ghiandole è stato omogenato in Tris Buffer (tris 20 mM, saccarosio 0,5 M pH 8,6) centrifugato a 15000 g per 30 minuti a 4°C. Al surnatante sono stati aggiunti un uguale

volume di etanolo assoluto e un 8% di cloroformio per ottenere il pellet contenente le metallotioneine. Il pellet è stato lavato con Tris Buffer usato per omogenizzare i campioni con l'aggiunta di cloroformio ed etanolo (rispettivamente pari a 1% e 87%), centrifugato a 6000 g per 10 minuti ed essiccato con corrente d'azoto. Come standard è stato utilizzato il glutatione (GSH, Sigma G4251) e il contenuto di metallotioneine è stato determinato con spettrofotometro a 412 nm utilizzando il reagente di Ellman (Ellman, 1958) che permette di determinare il contenuto di SH (gruppo solfidrilico delle MT).

3.2.6 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con il programma STATISTICA 9.1 (StatSoft, Inc). Le differenze tra i livelli di concentrazione degli inquinanti tra i siti sono state determinate con ANOVA e test HSD di Tuckey. Le differenze del contenuto di MDA e metallotioneine sono state determinate con ANOVA non parametrica.

3.3 RISULTATI

3.3.1 Analisi chimiche

Il contenuto di metalli pesanti e idrocarburi policiclici aromatici (IPA) è risultato più elevato negli animali campionati a Marghera (Tab.1). L'analisi statistica ha messo in evidenza che solamente i valori di Pb e IPA erano significativamente più elevati a Marghera rispetto agli altri siti.

	Cd	Cu	Hg	Pb	¹ ∑ IPA
	mg/kg				μg/kg
Palude del Monte	0,16±0,03 ^a	1,25±0,14 ^a	0,05±0,02 ^a	0,29±0,09 ^a	<2,5 ^a
Marghera	0,19±0,05 ^a	2,06±0,30 ^a	0,07±0,01 ^a	0,57±0,14 ^b	6,17±0,77 ^b
Ca' Roman	0,09±0,02 ^a	1,54±0,11 ^a	0,05±0,01 ^a	0,11±0,02 ^a	<2,5 ^a
Val di Brenta	0,17±0,02 ^a	1,53±0,11 ^a	0,05±0,01 ^a	0,18±0,03 ^a	<2,5 ^a

Tab. 1. Valori di metalli pesanti e idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Valori espressi come media ± ES. A lettere diverse corrispondono differenze significative fra le medie. ¹∑IPA= somma delle concentrazioni di benzo(a)antracene, benzo(b)fluorantene, benzo(a)pirene e crisene; p<0,05

3.3.2 Istologia

L'analisi istopatologica ha messo in evidenza la presenza del parassita *Perkinsus olseni* nei seguenti organi: mantello, intestino, ghiandola digestiva, branchie, rene, cuore, testicolo, ovaio (Fig. 2A-F). Il parassita è stato riscontrato in tutti gli animali campionati a Ca' Roman, nel 90% di quelli provenienti da Val di Brenta e Marghera e nell'80% da Palude del Monte. Gli animali di Ca' Roman presentavano anche le infestazioni maggiori con un elevato numero di trofozoiti. La Tab. 2 riporta il grado di infestazione dei vari organi e tessuti negli animali campionati nei quattro siti.

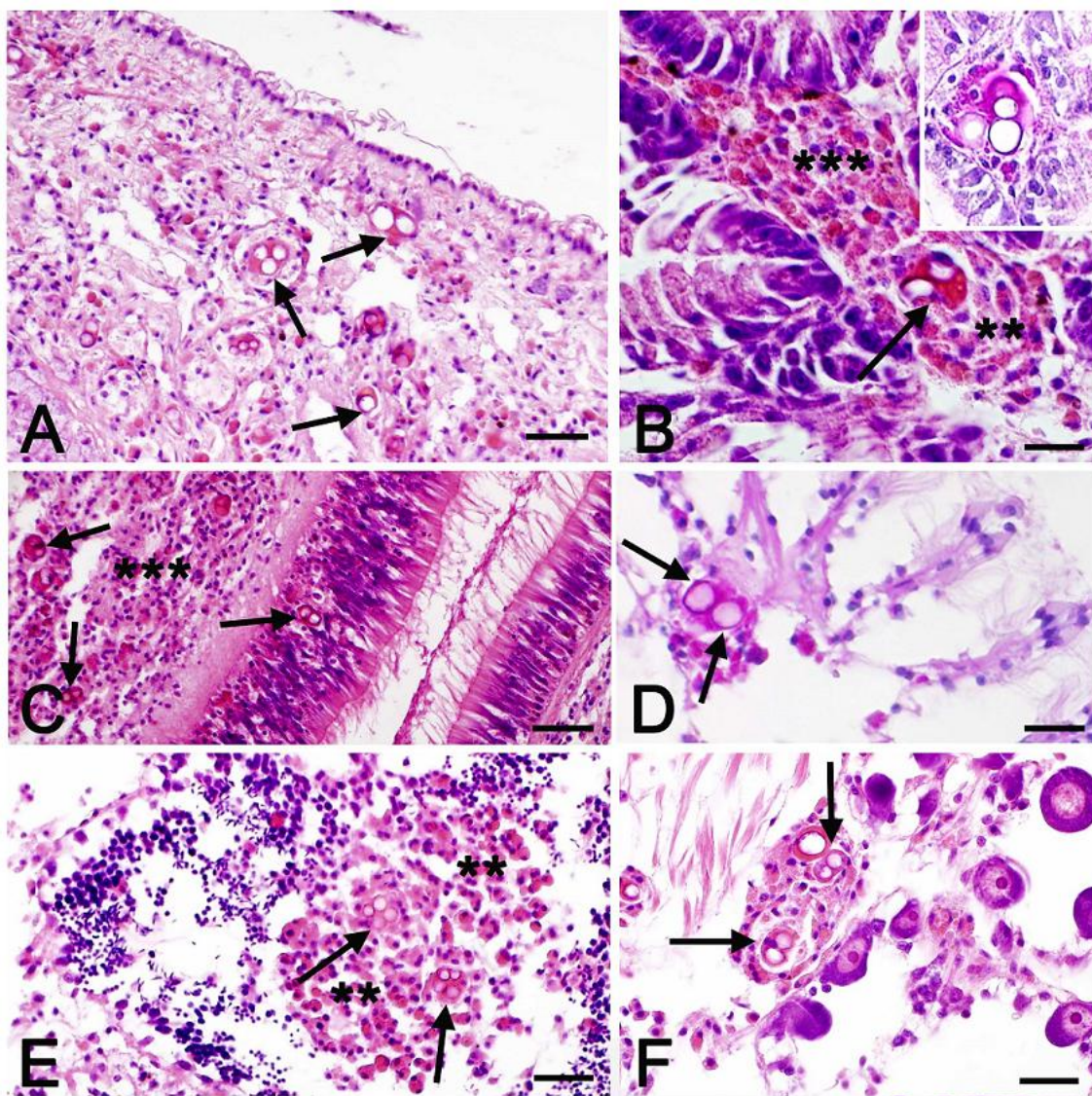


Fig. 2. Presenza del parassita *Perkinsus olseni* in differenti organi di *V. philippinarum*. A,C, E animali campionati a Ca' Roman; B, D, F animali provenienti da Palude del Monte. A) Mantello con numerosi trofozoiti indicati dalle frecce (colorazione Ematossilina-&-Eosina E&E). B) Trofozoiti (freccia) negli spazi interstiziali della ghiandola digestiva con intensa reazione emocitaria (asterischi) (E&E). Il riquadro in B mostra la reazione PAS positiva del parassita. C) Parassiti (frecce) nell'epitelio e nel tessuto connettivo del tratto intestinale con intensa presenza di emociti (asterischi) (E&E). D) Parassita nelle branchie (PAS). E) Parenchima testicolare con intensa presenza emocitaria (asterischi) attorno ai parassiti (frecce) (E&E). F) Ovaio con parassiti (frecce) circondati da intensa reazione emocitaria. Barre A, C, E, F 40 μ m; B, riquadro in B, D 20 μ m.

Nei vari tessuti, i trofozoiti sono stati riscontrati sia isolati che raggruppati e circondati in alcuni casi da una intensa risposta emocitaria (soprattutto emociti granulari).

Nel mantello, la risposta emocitaria era caratterizzata da diversi gradi di intensità: in alcuni casi la risposta era assente, in altri i trofozoiti erano circondati da numerosi emociti contenenti materiale amorfo PAS-positivo.

Siti	Branchie	Mantello	Intestino	Ghiandola digestiva	Gonadi	Rene	Cuore
Palude del Monte	++	+	+	+	+	+	-
Marghera	++	++	++	++	++	+	++
Ca' Roman	+++	++	+++	++	+++	++	+++
Val di Brenta	+	+	+	+	+	+	-

Tab. 2. Grado di intensità di infestazione da parassita *P. olseni* nei vari organi di *V. philippinarum*.

- assente + bassa ++ media +++ alta.

Nella ghiandola digestiva i trofozoiti sono stati osservati principalmente nello spazio interstiziale dei tubuli ghiandolari e raramente nell'epitelio ghiandolare. In caso di intensa infestazione è stata osservata degenerazione e necrosi dei tubuli ghiandolari. Nel tratto digestivo, l'infestazione da trofozoiti è stata evidenziata spesso nel tessuto connettivo e nella parete muscolare, raramente nell'epitelio intestinale. Molto spesso il tessuto connettivo e muscolare si presentavano altamente interessati da risposta infiammatoria.

Nelle branchie, i trofozoiti sono stati riscontrati nel tessuto connettivo circondati da una risposta emocitaria a diversi livelli di intensità. Le branchie maggiormente infestate mostravano erosione e abrasione della superficie epiteliale.

Nelle gonadi, i trofozoiti circondati da emociti riducevano lo spazio disponibile per i gameti.

P. olseni è stato ritrovato anche nel rene e nel cuore con un grado di infestazione minore rispetto agli altri organi.

Gli animali maggiormente colpiti dal parassita presentavano trofozoiti nei muscoli adduttori, nel piede e nei sifoni.

Nel 3% degli animali pescati a Val di Brenta e nel 2% di quelli provenienti da Marghera sono state osservate delle colonie di microrganismi procarioti rikettsia-simili (Fig. 3A) a livello di epitelio di branchie, mantello, e tubuli digestivi e nelle fibre muscolari del mantello e intestino. Anche altri ectoparassiti (tricodine e peritrichi sessili) sono stati riscontrati occasionalmente sulla superficie del mantello, senza una evidente reazione immunitaria dell'ospite. In alcuni molluschi, all'analisi istopatologica è stata riscontrata la presenza di elminti nel lume intestinale.

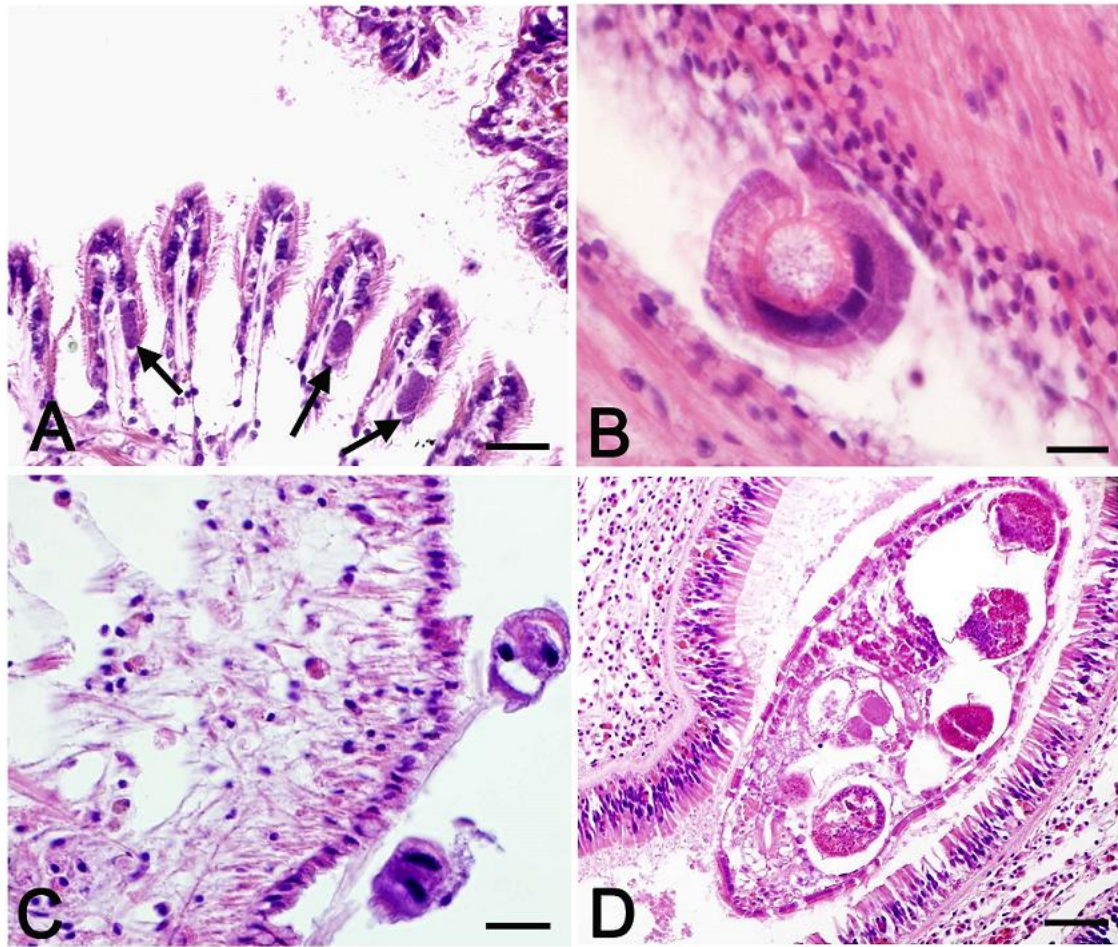


Fig. 3. Presenza di altri parassiti in differenti tessuti di *V. philippinarum*. Sezioni colorate con E&E. A-C animali campionati a Val di Brenta, D animali provenienti da Ca' Roman. A) Branchie con colonie di microrganismi procarioti intracellulari rickettsia-simili indicati dalle frecce. B) Tricodina nel mantello. C) Peritrichi ciliati sessili nel mantello. D) Elminta nel lume dell'intestino. Scala: A, C 20 μ m; B 10 μ m; D 40 μ m.

3.3.3 Immunoistochimica

Gli anticorpi testati hanno dato una immunoreattività a livello del mantello, intestino, ghiandola digestiva, branchie in tutti gli animali provenienti dai vari siti (Fig. 4A-F). La reattività era localizzata nel citoplasma degli emociti che si presentavano distribuiti all'interno dell'epitelio e nel sottostante tessuto connettivo. Non è stata evidenziata differenza tra intensità e distribuzione dell'immunoreattività fra i siti della Laguna.

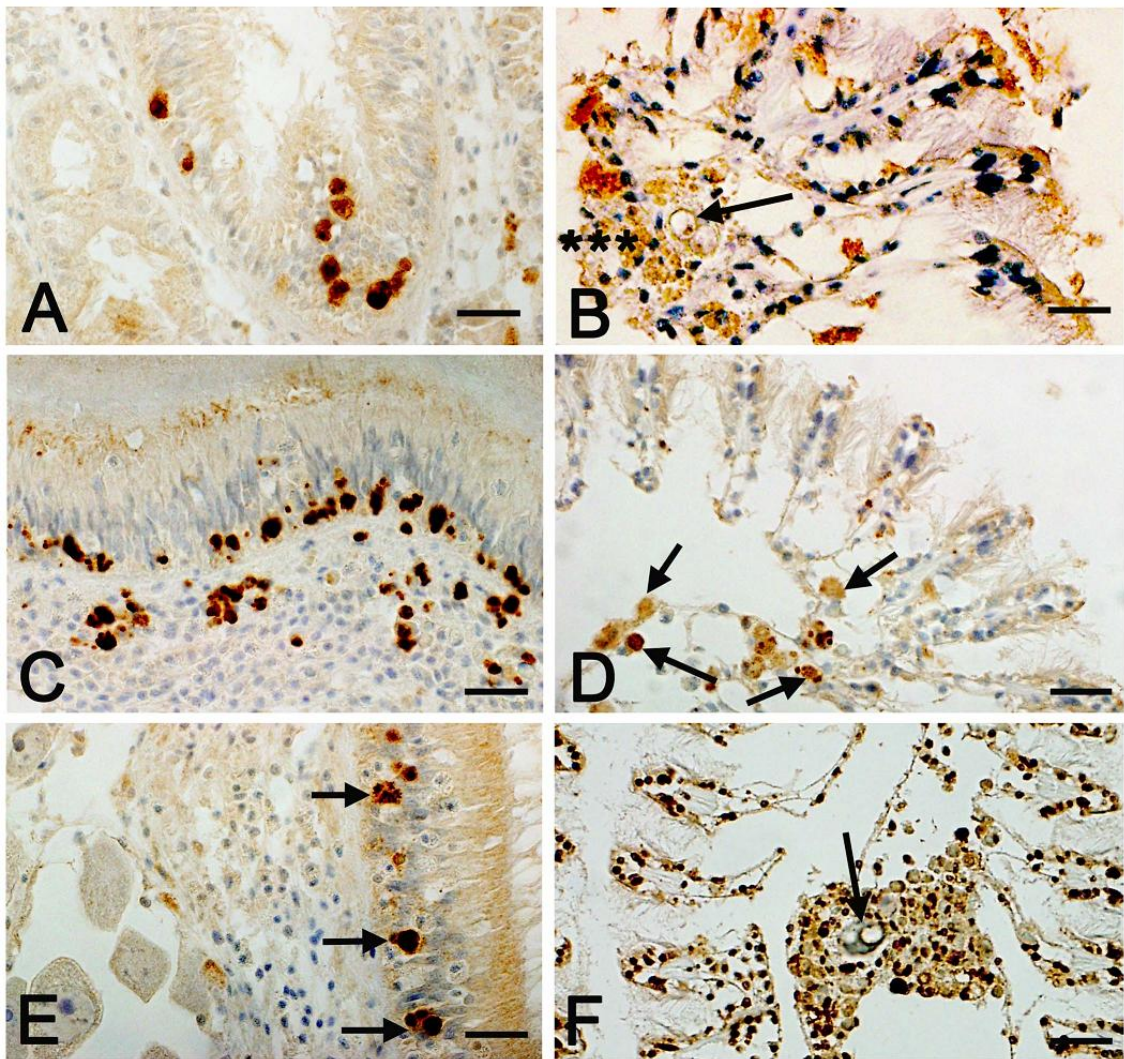


Fig. 4. Analisi immunistochemica con anticorpi anti-CYP1A, NT, HNE e HSP70 in differenti tessuti di *V. philippinarum*. (contro colorazione con ematossilina). A) Ghiandola digestiva di una vongola pescata a Val di Brenta con immunoreattività all'anticorpo anti-HSP70 nel citoplasma degli emociti. B) Branchie di una vongola proveniente da Ca' Roman con un parassita *P. olsenii* indicato dalla freccia. Il parassita è circondato da emociti con un'intensa immunopositività all'anticorpo anti-CYP1A (asterischi). C) Intestino di un animale di Palude del Monte con intensa immunopositività all'anticorpo anti-NT negli emociti dell'epitelio e del tessuto connettivo. D) Emociti (freccie) immunopositivi all'anticorpo anti-NT nelle branchie di un animale proveniente da Val di Brenta E) Intestino di un mollusco pescato a Val di Brenta con emociti positivi all'anticorpo anti-HNE (freccie) F) Branchie di una vongola di Marghera con presenza di un parassita *P. olsenii* (freccia) circondato da emociti immunopositivi all'anticorpo anti-HNE. Barre: A-F 20 μ m.

3.3.4 TBARS

Il contenuto di MDA è risultato significativamente più elevato nella ghiandola digestiva degli animali provenienti da Palude del Monte rispetto a quello osservato negli animali provenienti dagli altri siti (Fig. 5). Le vongole pescate a Ca' Roman presentavano invece il contenuto significativamente più basso.

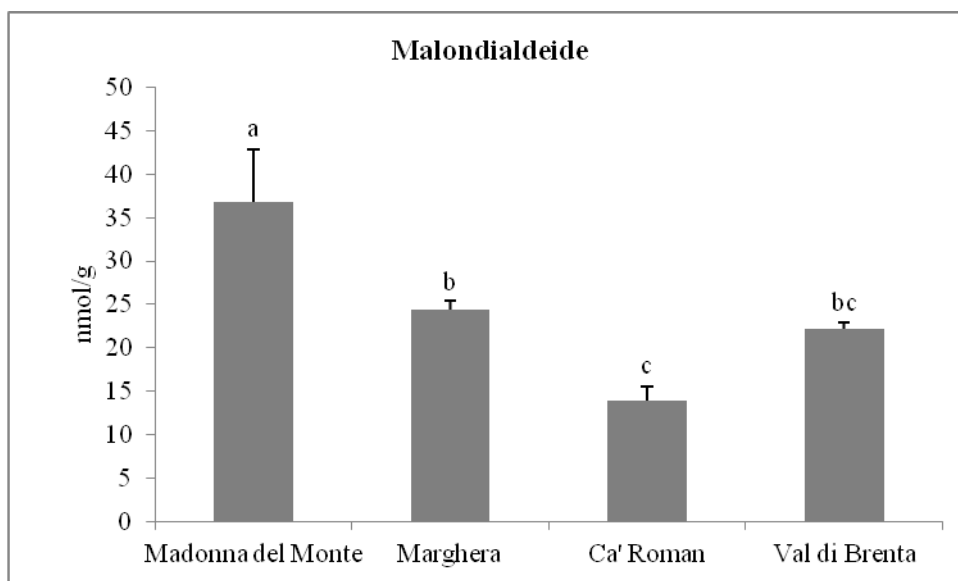


Fig. 5. Contenuto di malondialdeide (nmol/g) nella ghiandola digestiva. Risultati espressi come media \pm ES. Lettere differenti indicano diverse significatività fra le medie; $p < 0,05$

3.3.5 Metallotioneine

Il contenuto significativamente più elevato di metallotioneine è stato riscontrato nei molluschi provenienti da Ca' Roman, mentre il quantitativo più basso era presente negli animali di Val di Brenta (Fig.6).

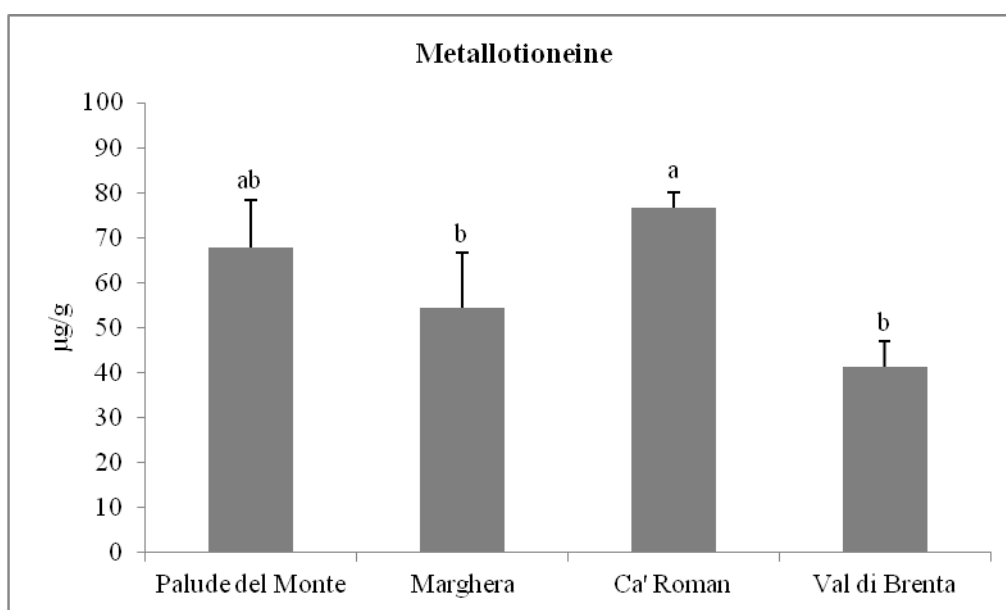


Fig. 6. Quantitativi di metallothioneine espressi come µg/g nella ghiandola digestiva (media ± ES). A lettere diverse corrispondono differenze significative fra le medie; $p < 0,05$

3.4 DISCUSSIONE

I molluschi bivalvi sono molto spesso utilizzati quali animali sentinella nei programmi di monitoraggio ambientale per la loro ampia distribuzione, la scarsa mobilità e la tendenza ad accumulare inquinanti; per queste caratteristiche sono in grado di fornire informazioni utili sul livello di inquinamento del loro habitat. (Viarengo *et al.*, 1999b; Widdows *et al.*, 2002; Banni *et al.*, 2005; Narbonne *et al.*, 2005). Attraverso lo studio delle risposte biologiche degli organismi a differenti condizioni ambientali e la valutazione del loro stato fisiologico è possibile determinare la qualità dell'ambiente in cui vivono (Akcha *et al.*, 2000; Banni *et al.*, 2009; Banni *et al.*, 2010).

La presente ricerca ha avuto come obiettivo quello di valutare la morfologia generale e lo stato di stress ossidativo di *V. philippinarum* campionati in quattro siti della Laguna di Venezia a diverso impatto antropico.

Negli animali prelevati è stato valutato il contenuto di IPA e metalli pesanti con analisi chimica per determinare il grado di inquinamento dell'area di provenienza. Con analisi istologica è stata valutata la morfologia generale e lo stato patologico degli animali.

Mediante analisi dei livelli di MDA e MT e tramite indagine immunohistochimica

(anticorpi anti-CYP1A, HNE, HSP70 e NT) è stato infine determinato lo stress ossidativo. La variazione di alcuni di questi parametri è stata spesso utilizzata nei lavori di biomonitoraggio (Winston e Di Giulio, 1991; Sanders, 1993; Lyons et al., 2003; Solé e Livingstone, 2005; Vergani et al., 2005; Lehtonen et al., 2006)

Dall'analisi chimica, il sito di Marghera è risultato quello maggiormente impattato decretando nuovamente questa zona della Laguna come una tra le più inquinate per la presenza del polo industriale, nonostante la riduzione delle attività verificatasi negli ultimi anni.

L'analisi istologica ha evidenziato la presenza del parassita *Perkinsus sp.* negli animali provenienti da tutti i siti campionati. Questo parassita è stato caratterizzato in un precedente lavoro su animali provenienti dal Nord Adriatico (Abollo *et al.*, 2006) e classificato come *P. olseni* con analisi PCR-RFLP.

Perkinsus sp., come riportato in letteratura, causa riduzione dell'accrescimento, inibizione della gametogenesi e di conseguenza una riduzione del seme in natura, riduzione delle difese immunitarie e in caso di elevata infestazione anche mortalità (Da Ros e Canzonier, 1985; Villalba, 2005; Ceschia, 2007; Gomez-Leon, 2007). La Perkinsosi affligge una vasta varietà di molluschi (ostriche, vongole, mitili) in tutti e cinque i continenti provocando elevate perdite economiche (Soudant *et al.*, 2013). Esistono 7 specie di *Perkinsus* accettate, *P. olseni* e *marinus* sono quelle che causano maggiori problemi negli allevamenti con elevate perdite economiche (Soudant *et al.*, 2013). La prima specie di *Perkinsus* identificata è stata il *marinus*, riscontrato nel 1946 nell'ostrica del Golfo del Messico e classificato erroneamente come fungo. *P. olseni* è stato identificato dapprima nel gasteropode *Haliotis ruber* e poi in *V. decussata* nel sud del Portogallo (dapprima classificato come *P. atlanticus*) (Azevedo, 1989). In seguito è stato identificato nelle coste spagnole, francesi ed italiane (Da Ros e Canzonier, 1985; Ceschia *et al.*, 1991; Figueras *et al.*, 1992; Goggin, 1992; Canestri –Trotti *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 2002). Probabilmente è stato trasportato dall'Asia all'Europa tramite il commercio verso l'Europa degli esemplari di *V. philippinarum* (Hine, 2001). Le mortalità maggiori, sia in natura che in allevamento, sono state riscontrate in *V. decussata* con casi fino all'80% e in *V. philippinarum* con mortalità del 40% (Ruano e

Cachola, 1986; Villalba *et al.*, 2005).

Il parassita possiede quattro stadi di vita, due nell'ospite chiamati trofozoita e ipnospora (prezoosporangio), e due nell'ambiente marino, chiamati zoo sporangio e zoospore. Il trofozoita o meronte è una cellula sferica che possiede un vacuolo che occupa la maggior parte della cellula che presenta pertanto un nucleo periferico. Va incontro a proliferazione vegetativa con successive divisioni e formazione di uno schizonte che contiene da 2 a 64 cellule (fase a rosetta). Da questo escono numerosi trofozoiti immaturi che ripetono il ciclo all'interno dell'ospite. Alla morte dell'ospite, o in condizioni di anaerobiosi, si formano le ipnospore che, una volta nell'acqua, si trasformano in zoo sporangio e liberano zoospore bi-flagellate. Non ci sono ospiti intermedi e sia i trofozoiti che le ipnospore e le zoospore possono infettare i molluschi. (Villalba *et al.*, 2004; De Vico e Carella, 2012; Soudant *et al.*, 2013).

Le difese cellulari del sistema immunitario dei molluschi sono proprie degli emociti che circondano il parassita incapsulandolo e degradandolo con l'ausilio degli enzimi lisosomiali (Soudant *et al.*, 2013).

Come riportato da Choi e Park (2010), nelle vongole i trofozoiti di *Perkinsus* sono spesso aggregati nelle branchie, che si ritiene siano uno dei principali accessi all'ospite (Casas *et al.*, 2002), nei diverticoli digestivi e nel mantello, mentre sono meno comuni nel piede, muscoli adduttori e sifoni. Negli animali altamente infestati i parassiti causano una riduzione della capacità di filtrazione delle branchie, atrofia dei tubuli digestivi con conseguente riduzione dell'apporto energetico, ritardo nell'accrescimento e minori riserve energetiche a disposizione per la riproduzione (Choi *et al.*, 1989; Dittman, 2001; Choi e Park, 2010).

La distribuzione del parassita è influenzata sia dalla temperatura che dalla salinità dell'acqua (Villalba *et al.*, 2004). E' stato dimostrato un aumento dell'infestazione e della prevalenza della parassitosi con un aumento della salinità e della temperatura dell'acqua (Andrews, 1988; Chu *et al.*, 1993; Chu e La Peyre, 1993; Burreson e Ragone-Calvo, 1996; Ragone Calvo *et al.*, 2000; Villalba *et al.*, 2004; Bushek *et al.*, 2012).

Gli animali campionati a Ca' Roman presentavano il livello di infestazione maggiore

con il 100% degli animali parassitati. Meneghetti *et al.* (2004) in un lavoro su *V. philippinarum* della Laguna di Venezia hanno riscontrato una infestazione elevata da *Perkinsus* in animali provenienti dallo stesso sito di Ca' Roman; gli autori hanno giustificato il risultato sostenendo che in quel sito la densità delle vongole è maggiore rispetto alle altre zone della laguna. Come riportato da Park *et al.* (2010) il livello di infestazione può essere correlato con la densità degli animali presenti nell'area, in quanto essendo il parassita eliminato attraverso il sifone esalante, una elevata densità animale facilita la diffusione del parassita. D'altro canto, la maggior incidenza del parassita potrebbe essere determinata dal grado di salinità maggiore che caratterizza questa zona essendo collocata in prossimità della bocca di porto di Chioggia, per cui più vicina al mare che, come è noto, possiede una salinità più elevata degli ambienti lagunari.

Gli altri siti della Laguna presentavano un livello di infestazione inferiore con il 90% degli animali campionati a Val di Brenta e Marghera, e l'80% di Palude del Monte. Il parassita è stato individuato in tutti i tessuti dell'ospite ad eccezione del tessuto nervoso; quasi sempre il trofozoita ha indotto una intensa risposta immunitaria con numerosi emociti nelle zone circostanti il parassita.

Dalle analisi istologiche è stata evidenziata in alcune vongole la presenza di ectoparassiti, tricodine ed altri peritrichi sessili ciliati, senza coinvolgimento di una risposta immunitaria e presenza di lesioni a carico dei tessuti. L'assenza di risposta immunitaria nei confronti di ectoparassiti come le tricodine è riportata anche da altri autori (Bower *et al.*, 1992). I peritrichi ciliati rimangono un gruppo di parassiti poco studiati nei molluschi e poche pubblicazioni riportano la loro presenza nei bivalvi (Uzmann e Stickney, 1954; Xu e Song, 2008; Xu *et al.*, 2011).

Riguardo i vari indicatori utilizzati nel nostro studio, l'analisi immunoistochimica ha evidenziato una immunopositività agli anticorpi anti-: CYP1A, HSP70, HNE e NT nel mantello, nell'intestino, nella ghiandola digestiva e nelle branchie. Non sono state evidenziate differenze in termini di intensità e distribuzione di immunoreattività tra i siti campionati. L'immunoreattività era localizzata nel citoplasma degli emociti che spesso erano organizzati in gruppi di cellule distribuiti attorno l'epitelio e il tessuto

connettivo. Gli emociti nei bivalvi rappresentano la prima linea di difesa dell'organismo ad agenti esterni. Il materiale non-self viene incapsulato o fagocitato dagli emociti con produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Cheng *et al.*, 1981; Pipe, 1992; Anderson, 1994).

Lo stato ossidativo è stato valutato anche attraverso analisi TBARS, metodica molto spesso utilizzata per determinare il livello di perossidazione lipidica (Armstrong e Browne, 1994; Duran e Talas, 2009; El-Sharaky *et al.*, 2009; Pascoli *et al.*, 2011). In questo studio gli animali campionati a Palude del Monte presentavano i livelli più alti di MDA, mentre quelli provenienti da Ca' Roman i più bassi. Questi risultati sono in accordo con quelli di un precedente lavoro condotto su esemplari di *Mytilus galloprovincialis* campionati nella Laguna di Venezia (Pampanin *et al.*, 2005).

Gli animali provenienti da Ca' Roman presentavano i valori più alti di metallotioneine, apparentemente in contrasto con i valori più alti di metalli pesanti riscontrati negli animali provenienti da Marghera. Le metallotioneine non sono solo indotte da alti livelli di metalli pesanti ma anche da differenti sostanze chimiche, stressogeni e agenti ossidanti (Viarengo *et al.*, 1999b).

In conclusione l'analisi istopatologica ha evidenziato che le popolazioni di vongole della Laguna di Venezia erano interessate da una severa infestazione da *Perkinsus* che, in condizioni di stress, può causare gravi mortalità. Sebbene la Perkinsosi aumenti con l'esposizione ai metalli pesanti e IPA, poiché l'inquinamento influisce negativamente sulle difese immunitarie dell'ospite (Chu *et al.*, 2002), nel nostro lavoro il parassita è stato riscontrato in tutti i siti campionati, suggerendo che altri fattori come la salinità e la temperatura possano influenzare la diffusione del *Perkinsus* (Soudant *et al.*, 2013). I parassiti si presentavano circondati molto spesso da una intensa risposta emocitaria, caratterizzata da una forte immunopositività a CYP1A, HSP70, HNE e NT evidenziando una risposta immunitaria attiva nel combattere la infestazione parassitaria.

4. TRATTAMENTO CON B(a)P

4.1 INTRODUZIONE

Il benzo(a)pirene (B(a)P) è considerato il “marker” di una classe di inquinanti organici denominati Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA). Gli IPA sono presenti molto spesso ad elevate concentrazioni nell’ambiente marino costiero nelle vicinanze di aree maggiormente industrializzate. Una volta rilasciati nell’ambiente marino sono assorbiti dal materiale in sospensione e dai sedimenti e diventano biodisponibili ai vertebrati e invertebrati marini attraverso la catena alimentare. Negli animali acquatici sono responsabili di numerosi effetti tra cui danni genetici, disfunzioni immunitarie ed endocrine, malformazioni, fibrosi e cancro (Akcha *et al.*, 2000; Gomez-Mendikute *et al.*, 2002; Aas *et al.*, 2005; Marigomez *et al.*, 2005; Frouin *et al.*, 2007; Matozzo *et al.*, 2007).

Il primo sistema di detossificazione degli IPA è il citocromo P450 (P450 o CYP), composto da numerose famiglie di emoproteine strutturalmente e funzionalmente correlate (Snyder, 2000). Gli enzimi CYP costituiscono un importante sistema metabolico che catalizza, nei confronti di composti endogeni, le reazioni di ossidazione e riduzione della fase I, ma sono anche attivi nel metabolismo di agenti xenobiotici quali gli IPA. Recentemente l’espressione del CYP4, che rappresenta una delle più vecchie famiglie del P450, è stata riscontrata in numerosi tessuti della vongola *Venerupis philippinarum* ed il CYP4 è stato indicato come potenziale biomarcatore dell’inquinamento marino da IPA (Pan *et al.*, 2011).

Gli enzimi denominati Glutazione S-transferasi (GSTs) rappresentano degli enzimi della seconda fase coinvolti nella detossificazione di sostanze xeno biotiche, giocando pertanto un importante ruolo nei meccanismi di difesa antiossidanti. I GSTs sono stati raggruppati in 15 classi sulla base delle loro caratteristiche strutturali e immunologiche (Hayes *et al.*, 2005). Diversi studi condotti in anni recenti hanno preso in considerazione l’espressione dell’mRNA di alcuni enzimi GST in organismi acquatici esposti ad inquinanti (Li *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Nail e Choi, 2011; Won *et al.*, 2011). Di recente uno studio ha evidenziato l’induzione del GST ρ nella vongola *V. philippinarum* esposta a B(a)P (Zhang *et al.*, 2012).

A livello cellulare il metabolismo degli xenobiotici causa molto spesso la formazione di

specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Halliwell e Gutteridge, 2011). Sono prodotte naturalmente durante il metabolismo e i loro effetti tossici sono limitati da enzimi antiossidanti. In caso di condizione di forte stress ossidativo la loro produzione è molto elevata e l'organismo non riesce ad eliminarle causando ossidazione lipidica, formazione di carbonili proteici e morte cellulare (Winston e Di Giulio, 1991; Davies, 1995;). Dalla ossidazione dei lipidi si forma la malondialdeide (MDA), che rappresenta una aldeide molto tossica per DNA e proteine (Aldini *et al.*, 2007).

Nei molluschi bivalvi, un altro indicatore di inquinamento è rappresentato dall'aumento numerico delle cosiddette *brown cells* (cellule brune). Si tratta di cellule contenenti vescicole, identificate come lisosomi, il cui contenuto rappresenta probabilmente materiale digerito dagli enzimi lisosomiali (Haigler, 1964; Ruddell e Wellings, 1971). Oltre ad essere attive come sistema di degradazione degli xenobiotici, secondo alcuni autori le *brown cells* costituirebbero anche un importante sistema di difesa contro le malattie parassitarie (Mackin, 1951; Stein e Mackin, 1955; Cheng e Burton, 1965;1966). Alcuni autori hanno riportato una correlazione tra la presenza di *brown cells* nel tessuto connettivo dei diverticoli digestivi di *Crassostrea virginica* e l'inquinamento ambientale (Zarogian e Yevich, 1993). Inoltre le vescicole contenute in queste cellule assumono una colorazione più scura nei tessuti degli animali provenienti da zone maggiormente inquinate, probabilmente per il sequestro degli inquinanti a livello cellulare (Zarogian e Yevich, 1993). Anche in *Mytilus edulis* è stato riscontrato un aumento delle *brown cells* nei soggetti provenienti da un sito con maggiore inquinamento da rame rispetto agli animali controllo (Zorita *et al.*, 2006). Questo tipo di cellule accumula lipofuscine che possono essere considerate un indicatore di esposizione agli inquinanti (Kagley *et al.*, 2003; Mariogomez e Baybay-Villacorta, 2003) in quanto è stato dimostrato che nei molluschi aumentano non solo con l'età degli animali ma anche con l'esposizione ad inquinanti (Viarengo e Nott, 1993). Le lipofuscine originano anche dalla perossidazione degli acidi grassi polinsaturi delle membrane cellulari (Agius, 1981).

La maggior parte dei molluschi bivalvi prima di essere commercializzati devono essere sottoposti ad un processo di depurazione. La depurazione dei molluschi bivalvi è

regolamentata a livello Europeo dai Regolamenti CE n. 853-854/04 del “Pacchetto Igiene” e 2073/05. I suddetti regolamenti prevedono la classificazione sanitaria delle zone marine in base al grado di inquinamento.

Le zone di classe A sono aree in cui i molluschi possono essere raccolti per il consumo diretto da parte dell'uomo; i molluschi provenienti dalle zone di classe B possono essere raccolti ma non possono essere commercializzati per il consumo umano senza prima aver subito un trattamento di depurazione; i molluschi delle zone di classe C possono essere raccolti ma devono essere sottoposti ad un periodo di purificazione di almeno due mesi prima di essere commercializzati per il consumo da parte dell'uomo. La classificazione delle zone marine si basa soprattutto sul grado di contaminazione batterica degli animali pescati in una determinata area. Ai molluschi provenienti dalle zone classificate come A sono imposti i seguenti limiti di tossine algali: PSP ("Paralytic Shellfish Poison") 800 µg/kg; ASP ("Amnesic Shellfish Poison") 20 mg/kg di acido domoico; acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine complessivamente 160 µg di equivalente acido okadaico/kg; 1 mg di equivalente yessotossine/kg; 160 µg di equivalente azaspiracido/kg; livelli di *Escherichia coli* minori di 230 per 100 g di polpa e di liquido intervalvare; quantitativi di B(a)P inferiori a 10 µg/kg (Reg. 1881/06). I molluschi allevati nelle zone classificate come B non devono superare i 6000 coliformi fecali per 100 g di polpa o di 4600 E. coli per 100 g di polpa nel 90 % dei campioni e devono per cui essere sottoposti a depurazione per diminuire il livello di contaminazione fino ai limiti imposti per le zone A. I molluschi della zona C non devono superare i 60000 coliformi fecali per 100 g di polpa e devono pertanto essere sottoposti ad un lungo periodo di purificazione prima di poter essere venduti per il consumo umano. Il tempo di depurazione medio diffuso in Italia, per raggiungere i requisiti indicati dai regolamenti, varia tra le 18-24h, anche se in alcuni casi le ore di depurazione possono essere molto inferiori (Lee *et al.*, 2008a).

In questo lavoro i molluschi *V. philippinarum* sono stati sottoposti ad una esposizione acuta con B(a)P della durata di 24 ore e ad un successivo periodo di depurazione di 24 h allo scopo di valutare la variazione di due geni della detossificazione: il CYP4 e il GSTr. Inoltre è stato valutato il grado di ossidazione lipidica con metodica TBARS.

Infine, sugli stessi animali è stata eseguita un'analisi istologica per verificare gli effetti a livello tissutale con particolare riferimento alle *brown cells*.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 Animali

Gli animali utilizzati per questa sperimentazione sono stati ottenuti dal centro di depurazione “Consorzio Cooperative Pescatori del Polesine Scardovari”. Le vongole *V. philippinarum* possedevano una lunghezza della conchiglia compresa tra i 3e i 4 cm. Gli animali sono stati trasferiti in laboratorio e acclimatati in acquari per una settimana prima di essere sottoposti al trattamento con B(a)P. Le vongole sono state alimentate con un mix di microalghe durante il periodo di sperimentazione e mantenute in acqua aerata preparata con sale marino per acquari (Prodac, Italia). Dopo l'acclimatemento, 520 molluschi sono stati suddivisi in modo casuale in quattro gruppi sperimentali con due replicati ed esposti a differenti concentrazioni di B(a)P: 0 mg/l, 0,03 mg/l, 0,5 mg/l e 1 mg/l. Le concentrazioni di B(a)P tra 0,03 mg/l e 0,5 mg/l sono quelle comunemente impiegate per le prove di stress acuto, mentre la concentrazione di 1 mg/l è stata scelta al fine di garantire una risposta negli animali esposti a B(a)P. Vista la bassa solubilità del B(a)P, per facilitare l'assorbimento da parte dei molluschi, questo composto è stato dapprima legato alla celite 545 (Merck & Co) utilizzando una soluzione contenente acetone (Monari *et al.*, 2007). Dopo aver sciolto il B(a)P, l'acetone è stato fatto evaporare e la celite è stata introdotta negli acquari e mantenuta in sospensione utilizzando delle pompe elettriche. Gli animali di controllo sono stati mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali con la presenza della celite non legata al B(a)P. Un gruppo di 260 animali è stato campionato dopo 24h di esposizione e i restanti animali sono stati riportati al centro di depurazione per un periodo di depurazione di 24h. Per l'analisi istopatologica sono stati utilizzati 80 animali *in toto* e fissati per 24h a 4°C in formaldeide al 4%. Per le analisi chimiche sono stati utilizzati 120 animali *in toto* conservati a -80°C, mentre per le analisi di Real Time PCR e TBARS sono state estratte 320 ghiandole digestive e conservate separatamente a -80°C.

4.2.2 Analisi chimiche

Le analisi chimiche sono state effettuate su *V. philippinarum in toto* dopo l'esposizione e dopo 24h di depurazione. L'estrazione è stata eseguita utilizzando il kit SampliQ Buffered QuEChERS AOAC (Agilent, CA, USA). Sono stati utilizzati 3g di omogenato in provette di 50ml a cui sono stati aggiunti 10ml di acqua deionizzata e 12 ml di acetonitrile e agitati per 15 minuti. Dopo l'aggiunta di 6g di MgSO₄ e 1,5g di NaOAC le provette sono state agitate per 1 minuto e in seguito centrifugate a 4000 rpm per 10 minuti. Il *Clean-up* è stato eseguito utilizzando 4 ml del campione estratto e trasferito in una provetta con 15 ml di kit Agilent Dispersive 15 ml SPE Fatty Sample AOAC. Dopo essere stati centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti e filtrati utilizzando filtro a siringa (Millipore), gli estratti erano pronti per essere utilizzati nell'analisi HPLC-FLD.

4.2.3 Analisi istologica

Dopo la fissazione, i campioni sono stati disidratati in una scala graduata ascendente di etanolo e in seguito inclusi in paraffina. Sezioni di 4 µm, ottenute con il microtomo, sono state sparaffinate e colorate con ematossilina e eosina al fine di valutare la morfologia generale e il conteggio delle *brown cells*.

Per la valutazione delle *brown cells* sono state effettuate altre colorazioni: la Schmorl (Mazzi, 1977) che permette di colorare di verde le sostanze riducenti come la melanina; Blu di Nilo solfato per evidenziare in blu le lipofuscine (Mazzi, 1977); PAS (acido periodico reattivo di Schiff) per evidenziare i gruppi glicolici o amminoidrossilici adiacenti).

Visti i tempi brevi di depurazione, il conteggio delle *brown cells* è stato eseguito solo sugli animali sottoposti ad esposizione al B(a)P, ma non su quelli post-depurati. Il conteggio delle cellule ha interessato l'epitelio intestinale eseguendo tre sezioni sullo stesso animale e tre foto casuali su ogni sezione.

4.2.4 Estrazione RNA ed espressione GSTr e CYP4 con RT-PCR

I quantitativi di mRNA di GSTr e CYP4 sono stati misurati nella ghiandola digestiva attraverso Real-Time PCR (qRT-PCR). L'RNA è stato estratto da 50 mg di ghiandola

digestiva di *V. philippinarum* utilizzando il reagente TRIzol (Invitrogen) seguendo il protocollo del reagente. Tutti i campioni sono stati trattati con DNase I (Amp Grade Invitrogen) per eliminare le contaminazioni di DNA. I quantitativi di RNA sono stati determinati utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop (Thermo Scientific) e la qualità è stata valutata con elettroforesi su gel. Il cDNA è stato sintetizzato utilizzando 1 µg di RNA totale utilizzando SuperScript II RT (Invitrogen). La Real Time quantitativa è stata eseguita utilizzando lo strumento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem) in 25 µl di reazione contenente 1X Power SYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystem), 300 nM di ogni primer reverse e forward e 10ng di cDNA. I primer specifici per GSTr provenivano dal lavoro di Zhang *et al.*, 2012 (forward 5'-CCACCACATTGGAAAGAAGGG-3' reverse 5'-ATGGCACCGAGTCAGTTCAG-3'); quelli per CYP4 provenivano dal lavoro di Pan *et al.*, 2011 (forward 5'-TGTGTCATCCAGATACCGTCAAA-3' reverse 5'-TTCCCCTAACCATGGCAAAC-3'), mentre per β-actina sono stati disegnati con il software Primer Express 3.0 (Applied Biosystem) (forward 5'-CACTTTACGCTTCCGGTCGTA-3' reverse 5'-TTCATAGATAGGTACAGTGTGCGATACTC-3') utilizzando la sequenza disponibile sul database GenBank (β-actina EF520696.1). Le amplificazioni sono state eseguite in triplicato su piastra da 96 pozzetti con le seguenti condizioni: step iniziale di denaturazione e attivazione degli enzimi dalla durata di 2 min a 50°C e 10 min a 95°C, seguiti da 40 cicli a 95°C per 15s, 55°C per 45s e 60°C per 1 min. Successivo step di dissociazione di 95°C per 15s, 60°C per 1 min, 95°C per 15s e 60°C per 15s. Dopo amplificazione, l'acquisizione dei dati e l'analisi è stata eseguita con Software 7500 vers. 2.0.5 (Applied Biosystem). Il metodo utilizzato dal software è stato il metodo comparativo Ct ($\Delta\Delta Ct$).

4.2.5 Analisi TBARS

L'ossidazione lipidica nelle ghiandole digestive è stata determinata misurando i valori di malondialdeide (MDA) mediante analisi con acido tiobarbiturico in accordo con Yoshida *et al.* 2005. La reazione è stata ottenuta aggiungendo a 200 mg di omogenato di ghiandola digestiva 0,2 ml di sodio dodecil solfato (8,1% w/v), 1,5 ml di acido acetico

(20% v/v, pH 3,5) 1,5 ml di acido tiobarbiturico (1% v/v), 0,775 ml di acqua e 0,05 ml di etanolo contenente Butil idrossitoluene allo 0,8%. Il tutto è stato incubato a 100°C per 60 minuti e poi immediatamente raffreddato in ghiaccio, in seguito i campioni sono stati agitati vigorosamente con l'aggiunta di 1 ml di acqua e 5 ml di alcool n-butilico e piridina, in rapporto 15/1. Dopo essere stati centrifugati a 1400 g a 0°C per 10 minuti è stato prelevato il surnatante e sottoposto a lettura con spettrofotometro a 535 nm (V-630, Jasco Europe, Italia). Come standard è stato utilizzato il tetrametossipropano (0,5 µM/10 ml) per stimare la formazione di TBARS. I risultati sono stati espressi come nmoli di MDA per g di ghiandola digestiva.

4.2.6 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando STATISTICA 9.1 (StatSoft, Inc). Le differenze tra le variabili dipendenti ovvero concentrazione di B(a)P, espressione di CYP4 e GSTr e concentrazione di MDA sono state valutate con modello bifattoriale GLM considerando quali variabili indipendenti l'esposizione al B(a)P e la depurazione. Per l'analisi del conteggio delle *brown cells* è stata effettuata una ANOVA non parametrica. In tutte le analisi i valori di $p < 0,05$ sono stati accettati come significativi.

4.3 RISULTATI

4.3.1 Concentrazione di B(a)P

La Tab. 1 riporta le concentrazioni di B(a)P dopo 24h di esposizione e dopo 24h di depurazione. I quantitativi di B(a)P sono risultati massimi (6910 ± 1009 ng/g ww) dopo l'esposizione degli animali a 1 mg/l di B(a)P e minimi negli animali di controllo ($1,5 \pm 0,5$ ng/g). L'analisi bifattoriale GLM ha evidenziato un effetto significativo derivante dall'esposizione a concentrazioni crescenti di B(a)P ($p < 0,01$) e nessuna differenza significativa prima e dopo la depurazione. Non sono state riscontrate interazioni significative tra le variabili dipendenti.

Concentrazione di B(a)P nell'acqua mg/l	B(a)P negli animali dopo l'esposizione ng/g	B(a)P negli animali dopo la depurazione ng/g
0	1,5 ± 0,5 ^a	1,0 ± 0,2 ^a
0.03	443,2 ± 148,7 ^a	215,6 ± 142,8 ^a
0.5	5040 ± 2182 ^b	2740 ± 1506 ^b
1	6910 ± 1009 ^c	7020 ± 2047 ^c

Tab. 1 Concentrazione di B(a)P nei molluschi dopo 24h di esposizione a differenti dosi di B(a)P e dopo depurazione. I risultati sono espressi come media ± DS. Lettere differenti indicano significatività diverse fra le medie; p<0,01

4.3.2 Istopatologia

L'analisi istopatologica ha evidenziato la presenza di cellule brune (*brown cells*) in particolare nell'epitelio intestinale. Gli animali sottoposti a depurazione non hanno mostrato una variazione del numero di queste cellule rispetto agli animali trattati. Nella Fig. 1 è riportato il numero di *brown cells* negli animali dopo 24h di esposizione al B(a)P.

Le brown cells sono risultate positive alle colorazioni Blu di Nilo, Schmorl e PAS, confermando la presenza di lipofuscine, pigmenti melanici e glicconiugati in queste cellule (Fig. 2).

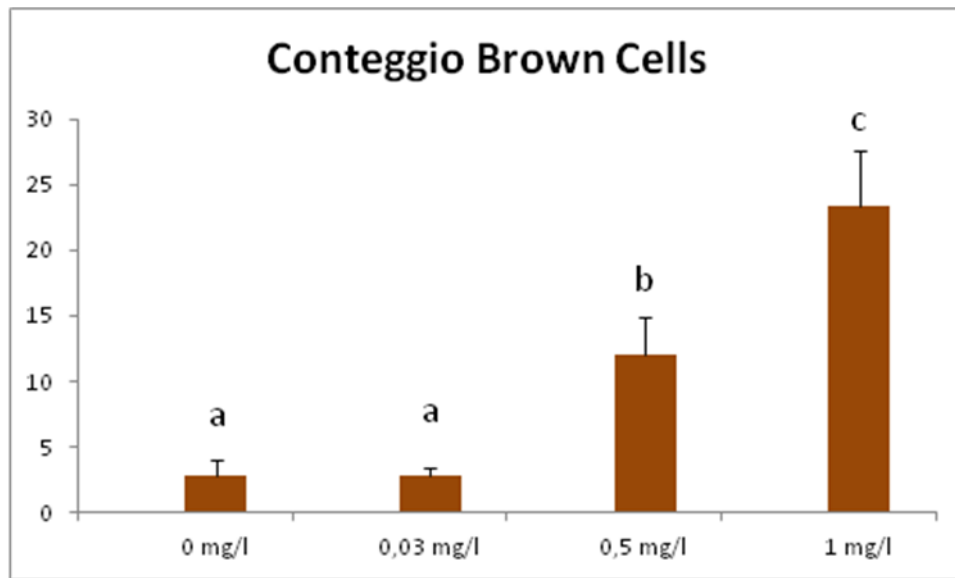


Fig.1. Numero di *brown cells* negli animali dopo 24 di esposizione al B(a)P. Lettere diverse indicano differenze significative fra le medie. Valori indicati come media \pm DS; $p < 0,05$

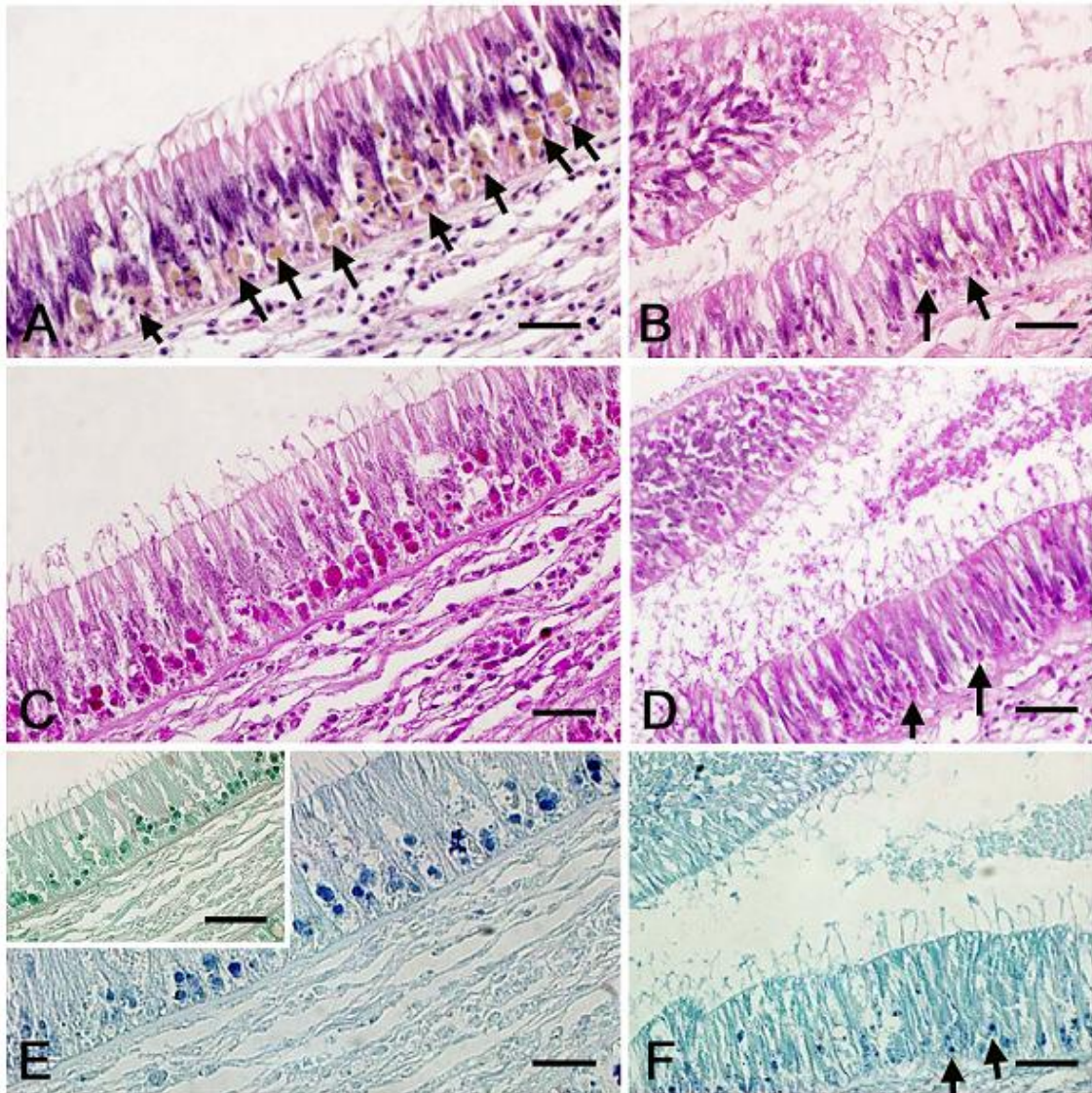


Fig. 2. Sezioni istologiche dell'intestino di vongole *V. philippinarum* esposte a 1mg/l di B(a)P (A,C,E) e controlli (B, D, F). A, B ematossilina eosina; C, D PAS (acido periodico reattivo di Schiff); E e F colorazione Blu di Nilo per le lipofuscine; riquadro in E colorazione Schmorl. A) *Brown cells* indicate dalle frecce nell'epitelio intestinale degli animali esposti a B(a)P; le stesse cellule sono PAS positive (C), presentano accumuli di lipofuscine nel citoplasma (E) e sono reattive alla colorazione di Schmorl per i pigmenti della melanina (riquadro in E). B) Nei molluschi di controllo le *brown cells* sono presenti in minori quantità (frecce) e sono meno positive alle colorazioni PAS (D) e per le lipofuscine (F). Scala di riferimento A-F 20 μ m, riquadro in E 40 μ m.

4.3.3 Espressione CYP4

L'espressione del CYP4 è stata stimata nella ghiandola digestiva con l'utilizzo di Real-Time PCR. Non sono state evidenziate differenze significative tra i differenti trattamenti (risultati non riportati). Negli animali soggetti a depurazione, l'espressione del messaggero per CYP4 è risultata più bassa rispetto a quella osservata negli animali dopo il trattamento, anche se le differenze non erano significative.

4.3.4 Espressione GSTr

Dopo l'esposizione a differenti concentrazioni di B(a)P l'espressione del messaggero per GSTr, stimato nella ghiandola digestiva, ha mostrato un andamento crescente con una differenza significativa alla dose più alta di B(a)P (Fig. 3). Dopo la depurazione, non sono state evidenziate differenze significative tra i vari trattamenti (Fig. 4). Non sono inoltre state osservate differenze significative tra gli animali dopo l'esposizione e i depurati.

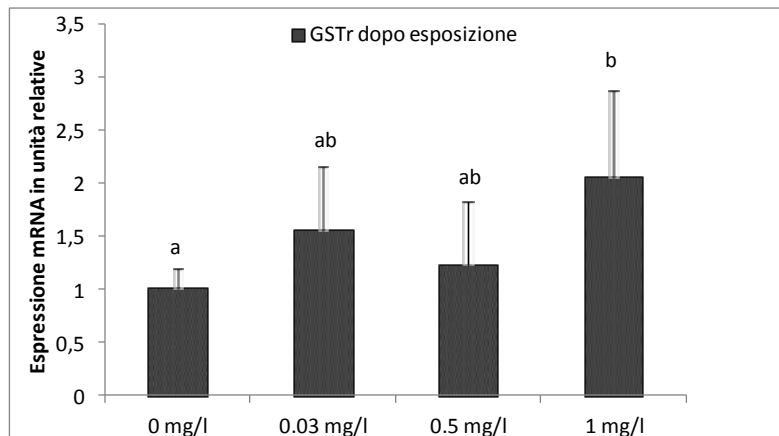


Fig. 3. Analisi di Real Time PCR del messaggero di GSTr in *V. philippinarum* esposte a differenti concentrazioni di B(a)P. Risultati espressi come media \pm DS. A lettere diverse corrispondono differenze significative fra le medie; $p < 0,05$

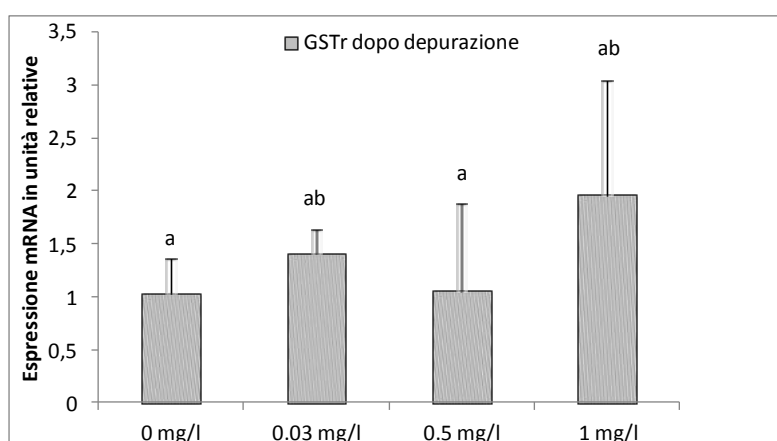


Fig. 4. Analisi di Real Time PCR del messaggero di GSTr in *V. philippinarum* dopo la depurazione. Risultati espressi come media \pm DS. Differenze significative fra le medie sono indicate da lettere differenti; $p < 0,05$

4.3.5 Analisi TBARS

La malondialdeide (MDA), dopo esposizione degli animali a differenti concentrazioni di B(a)P, ha mostrato un trend in aumento, anche se non significativo (Tab. 2). Negli animali sottoposti a depurazione la concentrazione di MDA è diminuita in tutti i trattamenti ad esclusione del gruppo di controllo. Questa variazione non è comunque risultata significativa.

Concentrazione di B(a)P nell'acqua mg/l	MDA dopo l'esposizione nmol/g	MDA dopo la depurazione nmol/g
0	36,7 \pm 0,9	37,6 \pm 4,4
0,03	37,2 \pm 2,4	32,8 \pm 1,4
0,5	39,2 \pm 1,6	26,9 \pm 1,5
1	40,2 \pm 3,1	34,3 \pm 2,2

Tab. 2 Valori di MDA determinati nella ghiandola digestiva di *V. philippinarum*. Risultati espressi come media \pm DS.

4.4 DISCUSSIONE

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto acuto del B(a)P, sull'espressione di due geni della detossificazione (CYP4, GSTr), in vongole *V. philippinarum* esposte a differenti concentrazioni di B(a)P e sottoposte a successiva depurazione per 24h. Per verificare l'effetto del B(a)P sull'ossidazione lipidica è stata determinata la concentrazione della malondialdeide nelle ghiandole digestive con metodica TBARS. Lo stato morfologico generale è stato determinato con analisi istologica.

Le concentrazioni di B(a)P determinate con analisi HPLC-FLD sono risultate massime negli animali esposti a 1mg/l di B(a)P e minime negli animali di controllo. Anche se l'analisi statistica non ha evidenziato nessuna differenza significativa, la concentrazione di B(a)P si è di fatto dimezzata negli animali sottoposti a depurazione ad esclusione di quelli sottoposti ad esposizione con la dose massima (1 mg/l). Questi risultati sono di notevole interesse in quanto indicano che, in seguito ad una esposizione acuta, anche sole 24h di depurazione, producono una riduzione dell'inquinante negli animali trattati con dose bassa e media. Precedenti studi sui molluschi bivalvi hanno dimostrato un rapido accumulo di B(a)P solo dopo poche ore di trattamento (Durand *et al.*, 2002; Monari *et al.*, 2007). In particolare Monari *et al.* (2009) hanno osservato negli emociti di *Chamelea gallina* un aumento di B(a)P dopo 24h con una progressiva diminuzione dopo 7 e 12 giorni di trattamento.

A livello istologico gli animali sottoposti a trattamento con B(a)P hanno mostrato un aumento delle *brown cells*. Si tratta di cellule contenenti lipofuscine e melanine (confermato dalle colorazioni specifiche eseguite) molto spesso implicate nei processi di detossificazione degli xenobitici (Haigler, 1964; Ruddell e Wellings, 1971; Zaroogian e Yevich, 1993; Zorita *et al.*, 2006). Nei bivalvi, è stato dimostrato che le lipofuscine aumentano in seguito ad esposizione ad inquinanti (Viarengo e Nott, 1993), mentre le melanine sono implicate nei processi di eliminazione di agenti tossici per l'organismo (Zuasti *et al.*, 1989). Le melanine sono polimeri complessi che possono assorbire e neutralizzare i radicali liberi i cationi e gli altri agenti potenzialmente tossici (Zuasti *et al.*, 1989) e potrebbero essere importanti per la produzione di composti

battericidi come il perossido di idrogeno (Wolke *et al.*, 1985)

Il conteggio delle *brown cells* nel nostro studio ha messo in evidenza un aumento significativo negli animali esposti ai dosaggi 0,5 e 1 mg/l di B(a)P rispetto a quelli esposti alle concentrazioni più basse. Questi risultati sembrano indicare un effettivo ruolo delle *brown cells* nella detossificazione del B(a)P dopo un'esposizione acuta. Il citocromo P450 è stato dimostrato essere un buon biomarcatore di esposizione a contaminanti ambientali negli ecosistemi acquatici (Bucheli e Fent, 1995). Sebbene nei pesci il CYP1A è ampiamente accettato come biomarcatore ambientale (Nebert e Gonzalez, 1987; Sarasquete e Segner, 2000), non ci sono risultati chiari a riguardo nei molluschi. Recentemente è stata evidenziata la possibile implicazione del CYP4 nei processi di detossificazione da IPA (Pan *et al.*, 2011). Il CYP4 è una delle più antiche famiglie di P450 e i suoi geni sono stati isolati sia nei mammiferi che negli invertebrati indicando una certa conservazione nella scala evolutiva (Simpson, 1997; Nelson, 1998). In *V. philippinarum* e *P. viridis* sono stati identificati trascritti di CYP4 in numerosi tessuti con maggiore espressione nella ghiandola digestiva (Zhou *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2011). Nel nostro studio, l'espressione del CYP4, stimata nella ghiandola digestiva con Real-Time PCR, non è variata in modo significativo a seguito delle diverse esposizioni a B(a)P, suggerendo che l'espressione del messaggero di CYP4 non è indotta dall'esposizione acuta. Miao *et al.* (2011) hanno evidenziato una diminuzione dell'espressione del messaggero di CYP4 nella ghiandola digestiva di *C. farreri* esposte a B(a)P per 10 giorni, mentre Pan *et al.* (2011) in un lavoro su *V. philippinarum* hanno dimostrato un aumento dell'espressione del CYP4 dopo un'esposizione a B(a)P della stessa durata. Nel nostro studio, una diminuzione dell'espressione del CYP4 si è verificata negli animali sottoposti ad una depurazione di 24h rispetto agli animali prelevati subito dopo l'esposizione al B(a)P, anche se l'analisi statistica non ha rilevato differenze significative.

L'induzione del GST, da parte di xenobiotici, è stata ampiamente studiata negli invertebrati acquatici, ed è stato dimostrato che il GST gioca un ruolo importante nei processi di detossificazione e nella risposta allo stress ossidativo (Boutet *et al.*, 2004; Hoarau *et al.*, 2006; Rhee *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008b). In un recente lavoro, Zhang *et*

al. (2012), hanno dimostrato una induzione dei geni GST2, GST3 e GSTr dopo esposizione di 10 giorni a B(a)P. Nel nostro lavoro, l'esposizione a B(a)P ha indotto un aumento dell'espressione del GSTr con differenze significative negli animali esposti al dosaggio più elevato (1 mg/l). Questi risultati sono in accordo con Zhang *et al.* (2012) che hanno osservato un aumento dell'espressione del GSTr dopo una esposizione a B(a)P per 24h. Anche in *M. galloprovincialis* è stato dimostrato un aumento dell'attività del GST dopo 24h di esposizione (Banni *et al.* 2010). Nel bivalve *Laternula elliptica* una esposizione di 24h ad un mix di PCB (Aroclor 1254) ha indotto una elevata espressione del GSTr rispetto ai controlli (Park *et al.*, 2009).

Nel presente studio, le alterazioni da stress ossidativo sono state valutate nella ghiandola digestiva con metodica TBARS. Sebbene la specificità del TBARS per la malondialdeide è controversa, questa tecnica continua ad essere molto utilizzata per determinare la perossidazione lipidica indotta da stress ossidativo (Armstrong e Browne, 1994; Duran e Talas, 2009; El-Sharaky *et al.*, 2009; Pascoli *et al.*, 2011). Nel nostro studio il contenuto di MDA, nella ghiandola digestiva delle vongole, è aumentato dopo esposizione a B(a)P ed è diminuita dopo la depurazione anche se in modo non significativo. In un lavoro di Kamel *et al.* (2012) è stato evidenziato un aumento della MDA dopo 7 giorni di esposizione al B(a)P.

Questi risultati dimostrano che l'esposizione al B(a)P determina un aumento del contaminante stesso nei tessuti del mollusco e dell'espressione del GSTr confermando il ruolo di quest'ultimo come possibile biomarcatore di esposizione al B(a)P. Il processo di depurazione di 24h ha prodotto una diminuzione del contenuto del B(a)P, anche se in modo non significativo, avvalorando l'importanza e la validità della depurazione dei molluschi prima della commercializzazione per uso umano. La depurazione tuttavia non ha influenzato l'espressione dei geni CYP4 e GSTr suggerendo la necessità di effettuare altri studi per verificare gli effetti di un periodo di depurazione più lungo. L'aumento significativo delle brown cells negli animali trattati con le dosi maggiori di B(a)P ha evidenziato il ruolo di queste cellule nei processi di detossificazione di questo composto.

5. STUDIO SULLA RIPRODUZIONE

5.1 INTRODUZIONE

Una caratterizzazione morfologica delle diverse fasi di maturazione delle gonadi e dei livelli di steroidi sessuali ad essi correlati possono essere un ottimo strumento per poter determinare e monitorare lo stato riproduttivo degli animali utilizzati come riproduttori in allevamento. Per mettere a punto e migliorare i programmi di riproduzione di *Venerupis philippinarum* e *Venerupis decussata* in allevamento è pertanto fondamentale conoscere il ciclo riproduttivo gametogenico (Matias, 2013).

La conoscenza del ciclo riproduttivo ed in particolare lo studio degli ormoni coinvolti nella riproduzione in specie di molluschi bivalvi come quelle appartenenti al genere *Venerupis* può risultare utile anche negli studi di biomonitoraggio ambientale dove questi sono spesso utilizzati come animali sentinella. Visto che negli organismi acquatici i livelli degli steroidi endogeni, soprattutto quelli sessuali, possono variare a causa dall'esposizione a sostanze xenobiotiche (Porte, 2006), una loro valutazione può dare indicazioni della esposizione di questi organismi a fattori inquinanti. In alcuni studi è stata evidenziata una alterazione della struttura del tessuto riproduttivo e una degenerazione dei gameti in animali provenienti da zone altamente inquinate e sottoposti sperimentalmente in laboratorio a varie concentrazioni di metalli pesanti, policlorobifenili (PCB) e idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Alterazioni nella struttura e della composizione del tessuto riproduttivo sono state associate anche ad avverse condizioni ambientali e ad attività antropiche (Meneghetti *et al.*, 2004).

L'attività riproduttiva nei bivalvi è influenzata da numerosi fattori sia endogeni che esogeni. Alcuni autori sostengono che sia la temperatura il principale fattore ambientale implicato nel ciclo gonadico (Meneghetti *et al.*, 2004). Inoltre la temperatura, essendo strettamente legata alla zona geografica, influenza indirettamente la disponibilità di cibo che risulta essere un altro importante fattore coinvolto nella durata del ciclo riproduttivo e nel numero di emissioni per anno (Delgado e Camacho, 2005; Matias, 2013). Naturalmente anche altri parametri come il fotoperiodo e la salinità rivestono un ruolo rilevante nello sviluppo dei gameti (Drummond *et al.*, 2006; Baron, 1992).

Il ciclo riproduttivo in *Venerupis philippinarum* e *Venerupis decussata* è soprattutto influenzato dalla latitudine alla quale questi organismi vivono (Drummond *et al.*, 2006).

Alle latitudini delle zone lagunari del Nord Adriatico, la temperatura aumenta in primavera fino al periodo estivo, diminuisce durante l'autunno e rimane bassa in inverno e questo determina una maggiore disponibilità di fitoplancton durante il periodo primaverile-estivo pertanto la stagione riproduttiva si concentra in questa parte dell'anno. In *V. philippinarum* infatti si estende da maggio a settembre con variazioni annuali legate alla temperatura (Meneghetti *et al.*, 2004). Nel Mar Mediterraneo, la produzione di gameti inizia a gennaio-febbraio e la maturità sessuale è raggiunta in primavera (aprile-maggio). L'emissione in natura dura fino a settembre-ottobre (Devauchelle, 1990). In *Venerupis decussata* invece la gametogenesi inizia a marzo e a maggio gli animali sono maturi sessualmente (Delgado e Camacho, 2007).

Le due specie sono caratterizzate da cicli riproduttivi molto simili, che differiscono di qualche mese nella maturazione delle gonadi. L'emissione dei gameti avviene di continuo durante l'estate, ma è più breve che in *V. philippinarum*, con termine ad inizio settembre (Breber, 1980; Ojea, 2004).

Questa specie sembra essere caratterizzata da una serie di emissioni incomplete che si susseguono durante l'estate (Meneghetti *et al.*, 2004).

Durante il ciclo riproduttivo, i neuro ormoni come la serotonina, la dopamina e l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) sono i principali messaggeri coinvolti nella riproduzione dei molluschi (Martinez e Rivera, 1994; Pazos e Mathieu, 1999). Anche la presenza degli steroidi sessuali nei molluschi bivalvi è ormai associata ma l'origine e il ruolo che questi rivestono nella riproduzione sono ancora oggetto di dibattito nel mondo della ricerca (Croll e Wang, 2007; Fernandes *et al.*, 2011; Scott, 2011).

In passato si pensava che i molluschi li ricavassero dall'alimentazione ma attualmente numerosi studi hanno dimostrato che sono in grado di sintetizzare gli steroidi, nei tessuti steroidogenici quali gonadi e ghiandola digestiva (Croll e Wang, 2007), partendo da alcuni precursori come il colesterolo e il pregnenolone. Gli enzimi chiave della steroidogenesi sono stati identificati anche in numerose specie di bivalvi indicando una certa conservazione nella linea evolutiva degli organismi (Siah 2002; Fernandes *et al.* 2011). La presenza degli steroidi sessuali nei molluschi bivalvi e la loro capacità di

sintetizzarli è pertanto stata dimostrata da numerosi autori, tuttavia non è ancora ben chiaro il loro ruolo nella maturazione gonadica (Scott, 2012).

5.2 MATERIALI E METODI

5.2.1 Campionamento degli animali

Lo studio è stato condotto su individui adulti di *V. philippinarum* e *V. decussata* provenienti dalla laguna di Scardovari (Rovigo). Gli animali sono stati forniti dal centro di depurazione molluschi del Consorzio Cooperative Pescatori del Polesine di Scardovari nel mese di febbraio 2011.

Una parte di animali (40 molluschi) è stata subito campionata per verificare lo stato di sviluppo delle gonadi e i relativi livelli di steroidi sessuali, mentre la parte restante è stata trasportata in contenitori refrigerati allo schiuditoio sperimentale di Pellestrina di Veneto Agricoltura. Presso l'impianto gli animali sono stati sottoposti ad un periodo di stabulazione in condizioni ambientali tali da consentire la loro maturazione gonadica.

Le condizioni di temperatura, fotoperiodo e salinità applicate hanno seguito i protocolli normalmente utilizzati dall'impianto per la produzione delle larve di mollusco. In particolare, gli animali sono stati mantenuti in vasche (con sistema d'acqua a ricircolo) senza sedimento a 22°C, 6-7 ppm O₂ e alimentati con un mix di alghe *Isochrysis sp*, *Chaetoceros sp*, *Pavlova sp*. Per valutare lo sviluppo gonadico, questi animali sono stati campionati dopo 30 giorni dall'arrivo in impianto e successivamente dopo altri 30 giorni dopo l'emissione dei gameti indotta artificialmente mediante sbalzo termico. In ciascuno dei tre campionamenti sono stati raccolti 20 animali per specie (*V. philippinarum* e *V. decussata*) e di questi, 10 sono stati utilizzati per l'analisi istologica delle gonadi e 10 per il dosaggio degli steroidi sessuali mediante metodo radioimmunologico (RIA).

Gli animali campionati sono stati pertanto fissati e processati in maniera diversa a seconda dell'analisi effettuata: in paraformaldeide per l'analisi istologica e tal quale a -20°C per il dosaggio ormonale.

5.2.2 Preparati istologici

I molluschi destinati all'analisi istologica sono stati fissati overnight a 4°C in paraformaldeide al 4% preparata in PBS (*phosphate buffer saline* (0,1M pH 7,4). Il giorno seguente sono stati lavati utilizzando PBS e processati (disidratazione, chiarificazione, infiltrazione) per poi essere inclusi in paraffina. Dopo l'inclusione in paraffina sono stati sezionati al microtomo ad uno spessore di 4 µm. Al fine di poter valutare una parte sufficientemente rappresentativa delle gonadi, per ciascun campione, sono state eseguite tre sezioni a diverse profondità. Le sezioni ottenute sono state colorate con ematossilina-eosina e da queste sono state acquisite alcune immagini utilizzando una videocamera collegata al microscopio ottico (Olympus *photomicroscope* Vanox, Giappone). Per ciascuna sezione sono state fotografate 5 aree casuali delle gonadi con ingrandimento 10x e le immagini ottenute sono state analizzate con software Adobe Photoshop CS4. Su ciascuna immagine si sono valutate oltre alla morfologia generale, l'area follicolare e su 6 oociti è stato misurato il diametro medio (ottenuto dalla media tra diametro massimo e minimo di ciascun oocita).

5.2.3 Valutazione dello stadio gonadico

Il grado di sviluppo delle gonadi è stato classificato seguendo, con leggere modifiche, le indicazioni riportate da altri autori in bibliografia sulle stesse specie di molluschi bivalvi ovvero *V. philippinarum* e *V. decussata* (Meneghetti *et al.*, 2004; Delgado e Perez-Camacho, 2007). La stadiazione utilizzata è la seguente:

Stadio 1: inattività sessuale, gameti assenti; impossibile distinguere il sesso.

Stadio 2: inizio dello sviluppo gonadico, le pareti dei follicoli cominciano a riempirsi di cellule germinali; lo stesso negli individui di sesso maschile.

Stadio 3: intenso accrescimento degli oociti (elevata presenza di oociti pedunculati) nelle femmine, aumento di spermatozoi nel lume degli acini nei maschi.

Stadio 4: generale maturazione dell'intera gonade, assenza di tessuto di riserva, questa fase si conclude con la totale emissione dei gameti.

Stadio 5: parziale emissione dei gameti, con presenza di oociti in regressione.

5.2.4 Analisi RIA

Il dosaggio degli ormoni sessuali (17β estradiolo, testosterone e progesterone) nella ghiandola digestiva di *V. philippinarum* e *V. decussata*, è stato effettuato mediante analisi radioimmunologica (*Radioimmunoassay* – RIA) come descritto nel capitolo relativo al dosaggio del cortisolo. In breve, anche in questo caso si è proceduto con l'estrazione degli steroidi, con il coating della piastra con anticorpo secondario anti- γ globuline di coniglio e successiva incubazione con l'anticorpo specifico. Gli anticorpi utilizzati ad opportune diluizioni sono i seguenti: anti-testosterone-3-CMO (Centro Medico Diagnostico Emilia s.r.l., Bologna, Italia), anti-estradiolo-6CMO (Gabai et al., 2004), anti-progesterone-7-CMO (Battocchio et al., 1999). Le caratteristiche di specificità degli anticorpi sono riportate di seguito:

- a) Anticorpo anti-testosterone-3-CMO: testosterone 100%, 5α -diidrotosterone 38%, 5α -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diolo 13,7%, 5α -androstano- $3\beta,17\beta$ -diolo 13,6%, androstenedione 1,7%, 5α -androstano- $3\beta,17\beta$ -diolo 1,2%, deidroepiandrosterone 0,01%, cortisolo < 0,001%, colesterolo < 0,001%.
- b) Anticorpo anti-estradiolo-6-CMO: 17β -estradiolo 100%, estrone 2,55%, estriolo 0,12%, deidroepiandrosterone 0,007%, 17α -estradiolo < 0,004%, progesterone < 0,004%, testosterone < 0,004%, androstenedione < 0,004%.
- c) Anticorpo anti-progesterone-7-CMO: progesterone 100%, 11α -idrossiprogestosterone 77%, 11β -idrossiprogestosterone 65%, 17α -idrossiprogestosterone 2,9%, 20α -idrossiprogestosterone 0,01%, 20β -idrossiprogestosterone < 0,001%.

La validità dei dosaggi è stata testata mediante i test di diluizione, ripetibilità e resa estrattiva.

5.2.5 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante il software STATISTICA 9.1 (StatSoft, Inc). Sono stati utilizzati test di tipo parametrico nei casi in cui non vi fossero significative deviazioni dagli assunti di normalità e omogeneità delle varianze fra i gruppi in esame. In caso contrario si è fatto uso di test non parametrici. In tutte le analisi, differenze fra

le medie associate a probabilità $p < 0,05$ sono state considerate significative. I risultati sono stati espressi come media \pm errore standard (ES)

5.3 RISULTATI

5.3.1 Gametogenesi

Con l'analisi istologica è stato possibile classificare lo stato di sviluppo delle gonadi dei vari individui (Fig. 1-2) e quindi seguirne l'evoluzione alle condizioni di stabulazione adottate dall'impianto di Veneto Agricoltura per le due specie. Al tempo 0 la maggior parte degli individui di *V. philippinarum* si presentavano in fase iniziale di gametogenesi ovvero all'inizio della maturazione (stadio 2) quindi con presenza di piccoli oociti nella parete dei follicoli e assenza di oociti liberi; dopo 30 giorni si assiste ad uno sviluppo molto rapido dei gameti e circa il 60% degli animali si trova in piena maturazione gonadica con i follicoli pieni di oociti (la maggior parte liberi nel lume) nelle femmine e gli acini delle gonadi maschili pieni di spermatozoi (Fig. 2 riquadro 4a-4b).

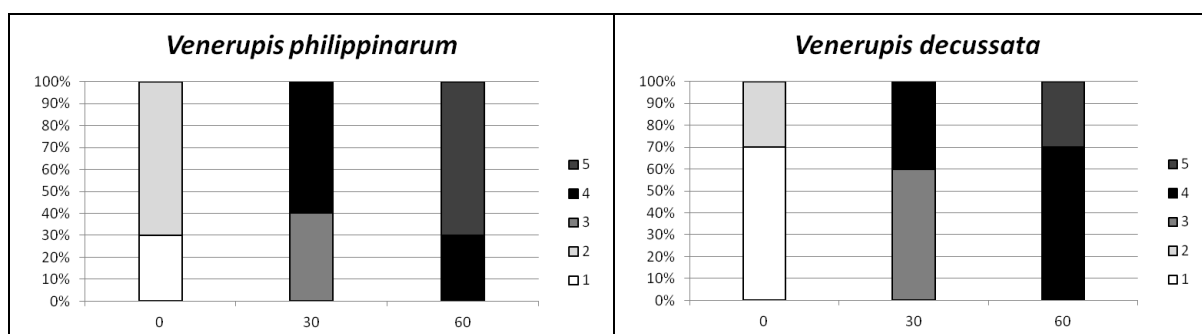
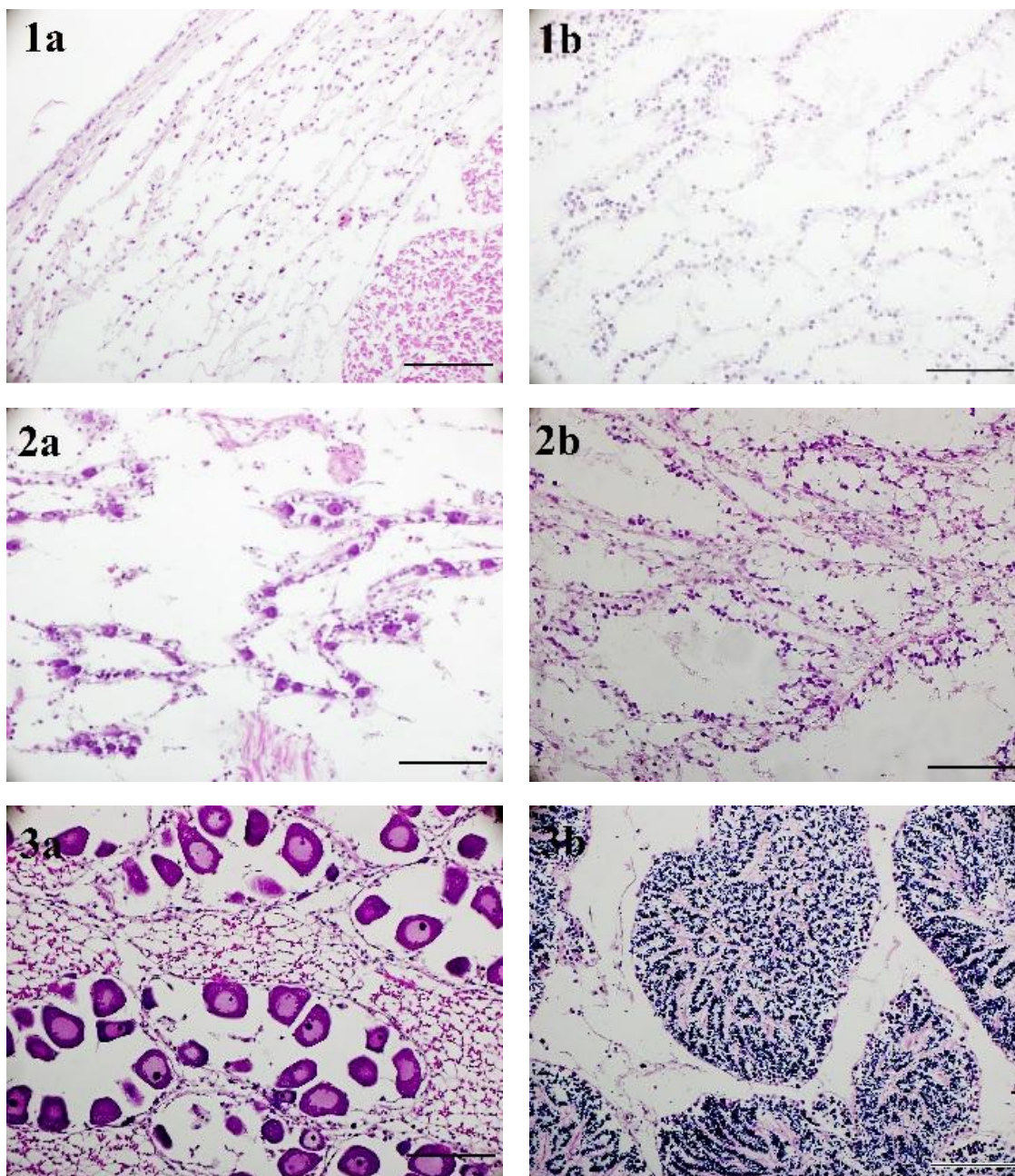


Fig 1. Valutazione dello stadio gonadico di *V. philippinarum* e *V. decussata* nei diversi campionamenti (0, 30, 60 giorni di stabulazione). Stadio 1: riposo sessuale, stadio 2: inizio gametogenesi, stadio 3: gametogenesi avanzata, stadio 4: gametogenesi completata, stadio 5: emissione dei gameti con regressione di alcuni oociti.

Dopo 60 giorni, dopo l'induzione all'emissione mediante sbalzo termico, la maggior parte degli animali (70%) presenta chiari segni di emissione dei gameti con riduzione

degli oociti liberi nei follicoli.

In *V. decussata* si assiste ad una maturazione più tardiva dei gameti; all'inizio della sperimentazione infatti il 70% degli individui si trovava in fase di riposo sessuale con le gonadi composte principalmente da tessuto connettivo. Questo stadio fortemente prematuro ha prodotto i suoi effetti dopo 60 giorni di stabulazione in impianto, riducendo al 30% il numero degli animali in fase di post emissione caratterizzati da oociti in regressione e gonadi maschili parzialmente svuotate (Fig. 2 riquadro 5a-5b).



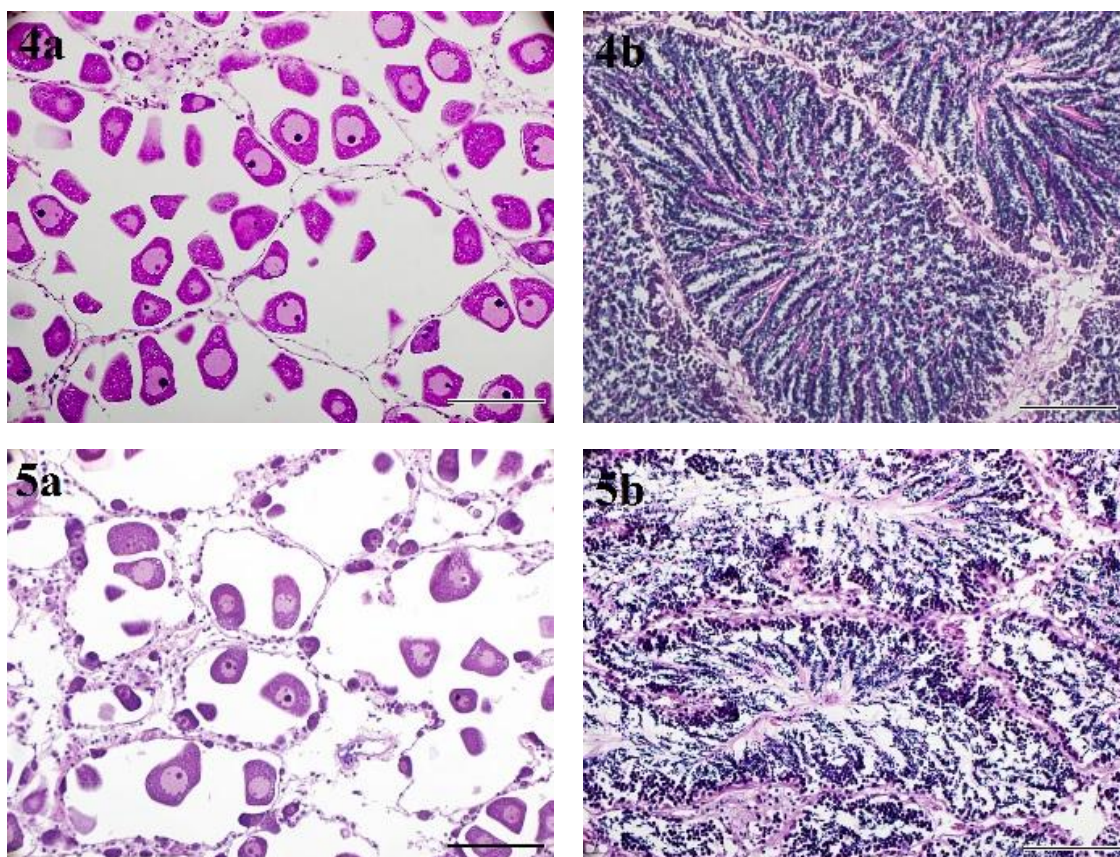


Fig 2. Immagini rappresentative dello stadio gonadico di *V. philippinarum* e *V. decussata*. La lettera **a** indica gli individui di sesso femminile mentre la lettera **b** gli individui di sesso maschile. I numeri da 1 a 5 indicano i vari stadi di maturazione. Microscopio ottico 10x, colorazione ematossilina eosina. Scala di riferimento 100 μ m.

Le misure dell'area follicolare e del diametro degli oociti effettuate sulle sezioni di gonadi mostrano un aumento delle dimensioni dopo i primi 30 giorni di stabulazione e una diminuzione successivamente all'emissione dei gameti (Tab. 1). , L'analisi statistica ha evidenziato una differenza significativa fra i diametri degli oociti nei diversi campionamenti (0,30 e 60 giorni di stabulazione, GLM-ANOVA $p < 0,001$) ma nessuna differenza fra le due specie mentre l'analisi delle aree follicolari non ha evidenziato differenze significative né fra le diverse specie né fra i diversi campionamenti intraspecie.

	Giorno 0	30° Giorno	60° Giorno
Area follicolare media (μm^2)			
<i>V. philippinarum</i>	19432±5053	39450±5906	18800±2224
<i>V. decussata</i>	6761±801	31236±4019	35925±4453
Diametro medio oociti (μm)			
<i>V. philippinarum</i>	14,5±0,4 ^a	45,5±0,8 ^b	30,7±1,3 ^c
<i>V. decussata</i>	12,6±0,4 ^a	33,5±1,6 ^b	36,1±0,7 ^b

Tab. 1. Misure dell'area follicolare e del diametro oociti. Valori espressi come media \pm ES. Le lettere diverse indicano differenze significative fra le medie all'interno della stessa specie.

I risultati istologici sono confermati anche dall'analisi della frequenza del diametro degli oociti . Il numero delle classi di frequenza dei diametri presenti all'inizio della sperimentazione è infatti ridotto con la maggior parte degli oociti compresi tra 10-15 μm . Durante la maturazione delle gonadi e dopo l'emissione dei gameti si assiste invece all'aumento del numero delle classi presenti coerentemente con lo sviluppo dei gameti.

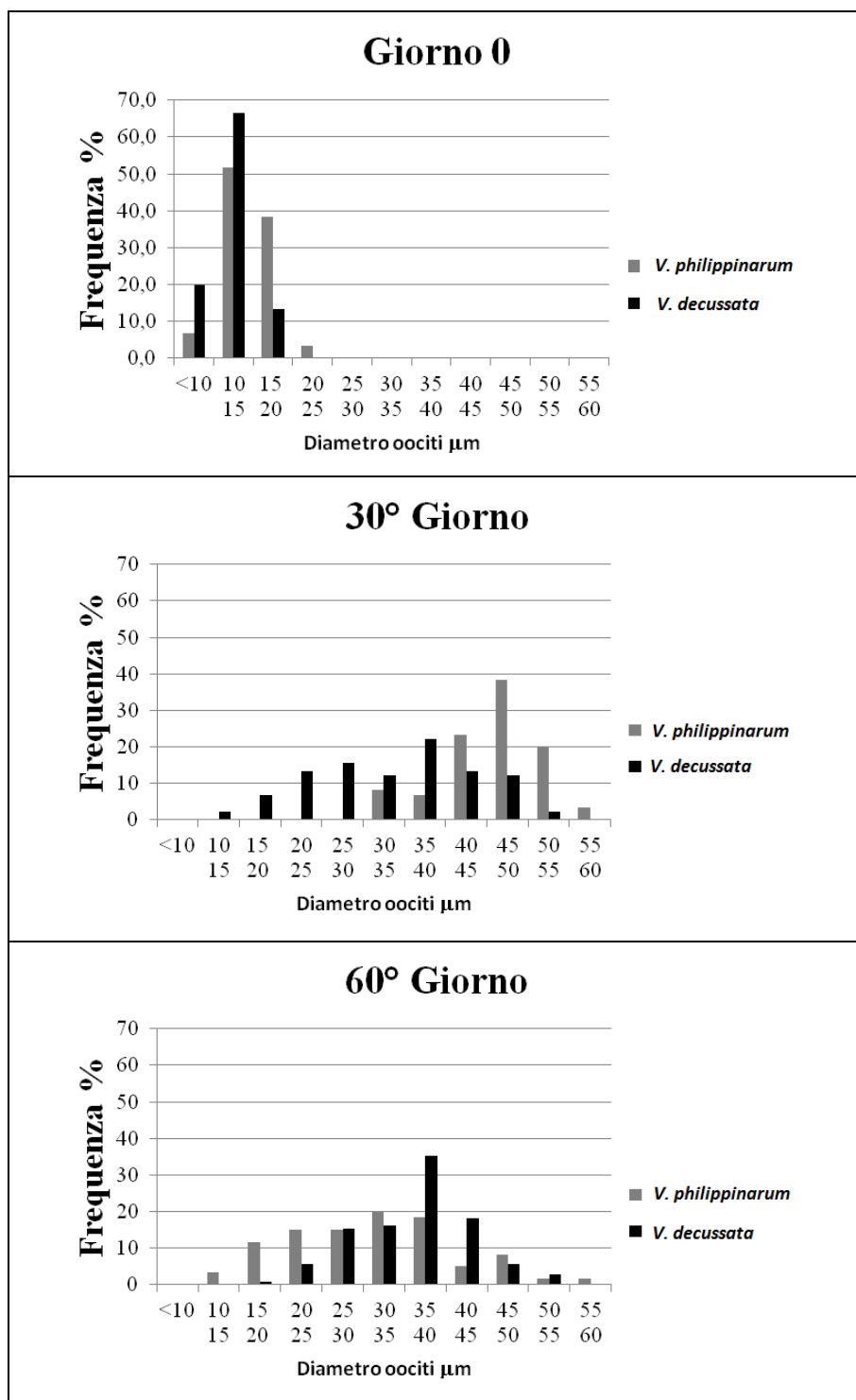


Fig. 3. Frequenza di distribuzione del diametro medio degli oociti in *V. philippinarum* e *V. decussata* ad inizio sperimentazione e dopo 30 e 60 giorni di stabulazione.

5.3.2 Dosaggio degli steroidi

Il dosaggio ormonale eseguito con metodica RIA, sulla ghiandola digestiva dei molluschi, ha consentito la quantificazione di steroidi sessuali quali estradiolo, progesterone e testosterone. I risultati dei test di validazione del dosaggio (diluizione, ripetibilità e resa estrattiva) effettuati esclusivamente per la specie *V. philippinarum* sono riportati in Tab.2 Il coefficiente di determinazione (r^2) evidenzia una ridotta dispersione dei punti e il valore medio del coefficiente di variazione intra-assay (C.V. %) conferma la buona riproducibilità del sistema di dosaggio per tutti e 3 gli steroidi.

Ormone	$y = ax + b$	r^2	C.V. %	ER%
Testosterone	$y = 16,36x - 0,13$	0,983	7,23	66,5
17 β -estradiolo	$y = 7,70x - 0,17$	0,997	8,40	55,8
Progesterone	$y = 16,28x - 0,28$	0,996	4,82	68,4

Tab. 2. Risultati dei test di validazione in *V. philippinarum*.

L'analisi è stata effettuata non differenziando gli animali per sesso perché nel periodo di riposo sessuale, questa distinzione risulta impossibile. I valori di estradiolo, progesterone e testosterone nelle due specie nei diversi campionamenti sono riportati in Fig 4. I livelli di progesterone seguono un andamento decrescente significativo e molto simile in entrambe le specie: elevati all'inizio della sperimentazione e diminuiscono al 60° giorno (Kruskal Wallis $p < 0,05$ per entrambe le specie). I quantitativi di estradiolo e testosterone invece seguono un andamento diverso nelle due specie. In *V. philippinarum*, i valori diminuiscono anche se non in maniera significativa dall'inizio della sperimentazione al 60° giorno (Kruskal Wallis, $p > 0,05$). In *V. decussata* si assiste invece ad una variazione significativa con aumento sia del testosterone che dell'estradiolo dopo 30 giorni di sperimentazione e diminuzione dopo che è avvenuta

l'emissione dei gameti (60° giorno) (Kruskal Wallis, $p < 0,001$; $p < 0,05$ rispettivamente). Il confronto fra i livelli degli ormoni delle due specie nei diversi momenti di campionamento ha mostrato differenze significative solamente nello stadio di post emissione (Mann Whitney, per testosterone $p < 0,001$; per estradiolo $p < 0,05$; per progesterone $p < 0,001$).

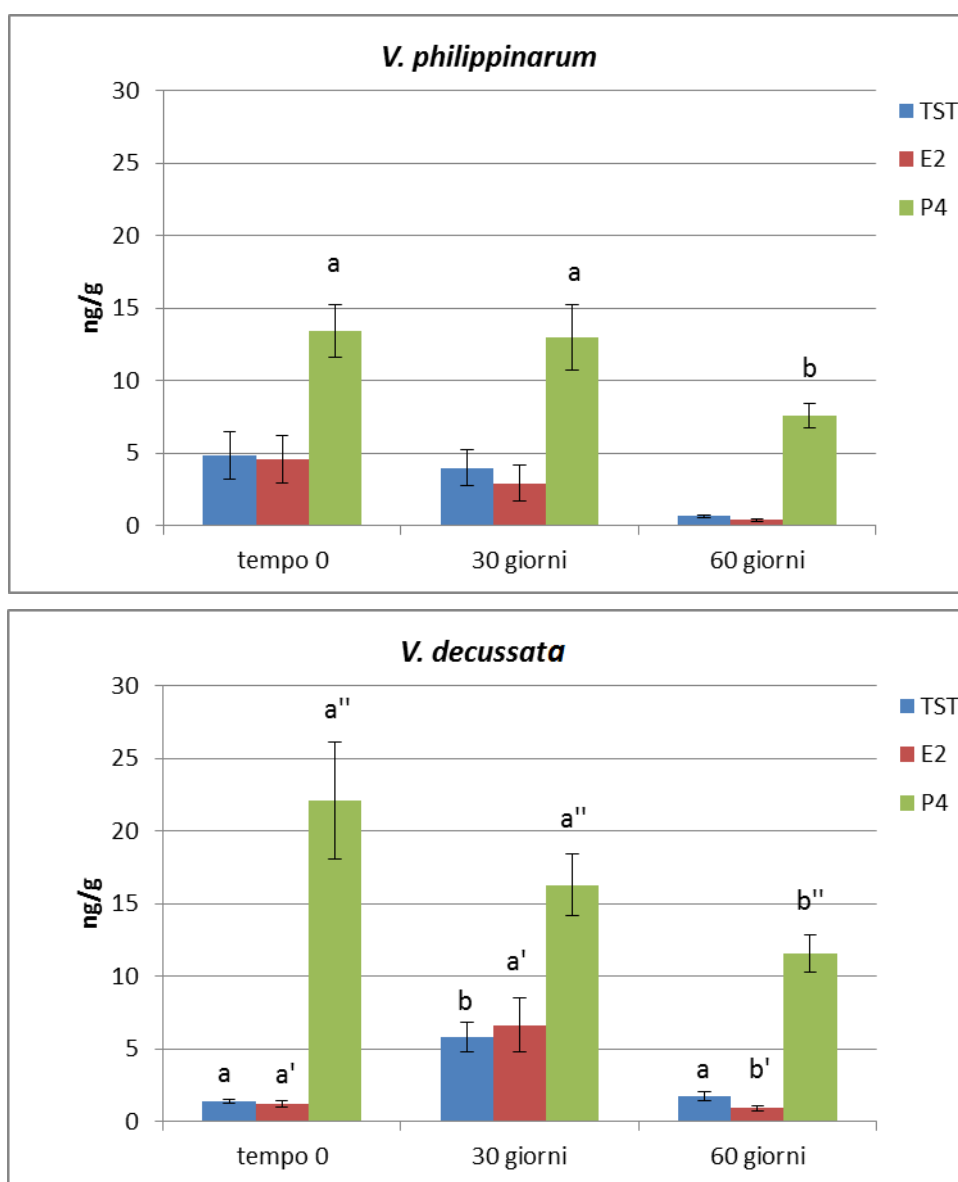


Fig. 4. Livelli di testosterone (TST), estradiolo (E2) e progesterone (P4) in *V. philippinarum* e *V. decussata* al giorno 0, 30° e 60° di sperimentazione.

5.4 DISCUSSIONE

Lo studio della maturazione gonadica di specie d'interesse per l'allevamento come *V. philippinarum* e *V. decussata* sia dal punto di vista morfologico che endocrino è molto importante perché fornisce strumenti utili alla messa a punto di protocolli di riproduzione artificiale in cattività. Allo stato attuale, esistono alcuni studi che hanno operato un confronto fra il ciclo gametogenico delle due specie in natura (Perez-Camacho, 1980; Rodriguez-Moscoso *et al.*, 1992; Villalba *et al.*, 1993; Rodriguez-Moscoso e Arnaiz, 1998; Meneghetti *et al.*, 2004; Drummond *et al.*, 2006) ma pochi hanno indagato su entrambe le specie in condizioni controllate (Delgado e Perez-Camacho, 2007).

Nel nostro studio, si è valutato lo sviluppo gonadico di animali di entrambe le specie prelevati in ambiente e condizionati in impianto per 60 giorni. L'approccio metodologico ha previsto una valutazione morfologica dello sviluppo delle gonadi su preparati istologici ed una endocrina, con dosaggio dei principali ormoni sessuali nella ghiandola digestiva (testosterone, 17 β -estradiolo e progesterone).

L'analisi istologica ha permesso di identificare i vari stadi di sviluppo e apprezzare la loro evoluzione durante la stabulazione in impianto alle condizioni di induzione alla maturazione. Il raggiungimento della maturità completa con effettiva emissione dei gameti ha confermato che il protocollo applicato presso l'impianto di Pellestrina è efficace sia per *V. philippinarum* che per *V. decussata*. Una caratteristica evidenziata dall'analisi istologica è la maturazione asincrona degli individui, con la presenza contemporanea di individui totalmente maturi e individui ad inizio maturazione.

Questa asincronia si ripercuote anche nella variabilità nel diametro degli oociti e come hanno sottolineato altri autori c'è una grande variabilità inter- e intra- individuale che rende difficile l'interpretazione dei risultati ottenuti. La presenza di asincronismo tra gli individui comporta una difficoltà nell'assegnazione di una fase riproduttiva ad una popolazione. Questo problema si presenta soprattutto *V. philippinarum* in cui, oltre alla variabilità fra individui esiste anche una variabilità nello stesso individuo con presenza di fasi diverse che scompaiono con il completamento della maturazione delle gonadi

(Meneghetti *et al.*, 2004, Delgado e Perez-Camacho, 2007).

Un'altra differenza tra le due specie evidenziata da alcuni lavori è che in *V. decussata* i gameti sono emessi continuamente durante il periodo di maturità sessuale, mentre in *V. philippinarum* c'è un accumulo di oociti prima di una parziale o totale emissione (Laruelle *et al.*, 1994; Delgado e Perez-Camacho, 2007).

In entrambe le specie si assiste ad un processo di riassorbimento particolarmente evidente nel periodo di riposo sessuale, dove risulta visibile una moltitudine di emociti che riassorbono i gameti non emessi nella precedente maturazione gonadica e ripuliscono, i follicoli che, una volta puliti possono creare dalle loro pareti delle nuove linee germinali.

Vi è pertanto una rigenerazione gonadica grazie alla lisi delle cellule vescicolari che appaiono all'inizio della gametogenesi e alla degenerazione della muscolatura liscia che fornisce l'energia per la gametogenesi (glucosio e prodotti del catabolismo dei lipidi). All'inizio della sperimentazione è stato evidenziato un diverso grado di maturazione delle due specie in natura, con un numero più elevato di individui in fase di gametogenesi in *V. philippinarum* rispetto a *V. decussata*. Dopo 30 giorni di stabulazione in impianto il 60% di *V. philippinarum* ha raggiunto la piena maturazione delle gonadi (fase 4), mentre in *V. decussata* la maggior parte degli individui è risultata in fase 3 di maturazione raggiungendo la fase 4 solamente a 60 giorni. Valori molti simili a questi e pertanto una maturazione gonadica più veloce in *V. philippinarum* è già stata riportata da Delgado e Perez-Camacho (2007).

Gli stessi autori sottolineano una parziale emissione dei gameti dopo 78 giorni con parziale invasione di emociti nelle zone di emissione. Nel nostro caso invece dopo l'induzione dell'emissione al 60° giorno a 22°C circa il 70% degli individui di *V. philippinarum* presentavano chiari segni di emissione mentre solo il 30% di *V. decussata* aveva emesso la maggior parte dei gameti, mantenendo per cui il gap dovuto al diverso tempo di maturazione.

Anche il diametro degli oociti e la dimensione dell'area follicolare variano in base al grado di maturazione delle gonadi. In individui immaturi sia l'area follicolare che il diametro degli oociti hanno dimensioni ridotte rispetto a quando la maturazione è

completa. Meneghetti *et al.* (2004) in uno studio su *V. philippinarum* campionati durante un anno nella Laguna di Venezia, hanno riscontrato dimensioni degli oociti molto simili alle nostre nel periodo di riposo sessuale, compresi tra i 15-20 μm . Gli stessi autori hanno evidenziato un aumento delle dimensioni fino al raggiungimento dei valori massimi tra giugno ed agosto quando la gonade risulta completamente matura, e questi sono risultati coerenti con quelli registrati nella nostra sperimentazione al 30° giorno di stabulazione per *V. philippinarum* e al 60° per *V. decussata*. Anche l'area follicolare in genere aumenta nel periodo riproduttivo e poi diminuisce nel periodo di riposo sessuale. Nella nostra sperimentazione l'area follicolare aumenta con il procedere dello sviluppo in entrambe le specie ma in maniera non significativa probabilmente a causa dell'elevata variabilità individuale. Meneghetti *et al.* nel 2004 hanno riscontrato un'area follicolare massima in estate con valori molto simili a quelli riscontrati nella nostra sperimentazione in *V. philippinarum* al 60° giorno di stabulazione.

Per quanto riguarda le modalità di emissione dei gameti, la differenza che viene riportata per le due specie è che in *V. decussata* sono emessi continuamente mentre in *V. philippinarum* si assiste ad un accumulo prima di una parziale o totale emissione (Delgado e Camacho, 2007). Nel nostro studio si è riscontrato che, a riposo, le classi di frequenza della lunghezza del diametro degli oociti sono molto simili fra le due specie, mentre dopo 30 giorni di stabulazione, a gonade matura, *V. philippinarum* mostra una maturazione più omogenea della gonade mentre in *V. decussata* la gonade matura presenta oociti più eterogenei. Dopo 60 giorni si assiste ad una emissione quasi completa dei gameti in *V. philippinarum*, mentre in *V. decussata* c'è la presenza di gameti ancora da emettere con oociti più numerosi tra i 40-50 μm .

Nel nostro studio, oltre alla valutazione morfologica dello sviluppo gonadico di animali di entrambe le specie in cattività si è effettuata una valutazione dei principali ormoni sessuali nella ghiandola digestiva: testosterone, 17 β -estradiolo e progesterone.

I livelli di ormone riscontrati sono risultati coerenti con quelli riportati da altri autori (Ketata *et al.*, 2007; Negrato *et al.*, 2008) e lo steroide presente in quantità più elevata è risultato il progesterone come già evidenziato anche in altre specie di bivalvi (Ketata *et*

al., 2007; Negrato *et al.*, 2008). I livelli elevati di questo steroide riscontrati all'inizio della gametogenesi o in fase di riposo e il loro decremento nel post emissione confermano l'ipotesi che sia coinvolto nella regolazione della gametogenesi forse come messaggero gonadico di neuro-ormoni (Ketata *et al.*, 2007). Questo potrebbe essere anche dovuto al suo potenziale ruolo di precursore nella sintesi di altri steroidi (Reis-Henriques e Coimbra, 1990).

Anche il decremento di testosterone ed estradiolo riscontrato negli animali dopo l'emissione dei gameti, sebbene non significativo nel caso di *V. philippinarum*, indica che anche nei molluschi questi steroidi sono implicati fortemente nello sviluppo della gonade. Nel nostro studio, in *V. decussata* dopo 30 giorni, quindi negli animali ancora in maturazione si è assistito ad un aumento del testosterone e dell'estradiolo. Una simile variazione è stata riportata anche da altri autori su lavori inerenti altri molluschi (De Longcamp, 1974; Moss, 1989; Lubet e Mathieu, 1990; Gauthier-Clerc, 2006) e può essere spiegata con il ruolo di questi ormoni nella mobilitazione delle riserve energetiche verso le cellule germinali per lo sviluppo degli spermatozoi e oociti. La riduzione dei livelli di estradiolo e testosterone, dopo 60 giorni di stabulazione in *V. decussata* e dopo 30 giorni in *V. philippinarum*, quando gli animali apparivano all'analisi istologica in piena maturità quindi pieni di gameti è stata riportata anche da Ketata *et al.* (2007) durante il periodo estivo in animali campionati in natura.

Le differenze nei livelli di steroidi sessuali riscontrati nel nostro studio in entrambe le specie nei diversi momenti di campionamento sono molto probabilmente dovute ai differenti tempi di maturazione che caratterizzano le due specie e che si sono evidenziati anche nel nostro studio. Dopo 30 giorni di sperimentazione *V. philippinarum* si trovava infatti in una fase di maturazione più avanzata rispetto a *V. decussata*.

La presenza di questi steroidi anche nella fase in cui la gonade apparentemente non era presente (stadio1) e il loro rinvenimento nella ghiandola digestiva suggerisce che questa possa avere anche ruolo steroidogenico.

6. SVILUPPO LARVALE

6.1 INTRODUZIONE

La vongola *Venerupis philippinarum* è stata introdotta in Italia negli anni '90 per aumentare la produttività della molluschicoltura. Questa specie si è diffusa velocemente nelle lagune italiane, grazie alla formazione di banchi di vongole che riuscivano a riprodursi naturalmente in aree chiamate *nursery*. In queste zone i molluschicoltori pescavano gli esemplari giovani (seme) e li distribuivano nelle aree in concessione dove raggiungevano la taglia commerciale nutrendosi di microalghe e microrganismi presenti nell'acqua lagunare. Negli ultimi anni si è assistito ad un impoverimento della produzione naturale di vongole; la mancanza di seme in natura ha costretto gli allevatori a rifornirsi da strutture specializzate (schiuditoi) nella produzione di giovani vongole. La regione Veneto, attraverso Veneto Agricoltura, il suo ente di ricerca in agricoltura, ha deciso di avviare uno schiuditoio per la produzione di vongole, per riuscire così a fornire, ad imprenditori interessati, le conoscenze e il supporto per l'avvio e la gestione di strutture specializzate nella produzione di seme di vongola.

I bivalvi veneridi sono caratterizzati da una prima fase larvale planctotrofica in cui possono nuotare e spostarsi liberamente nell'acqua. In questi primi stadi di vita gli organismi dapprima hanno una forma tondeggiante e vengono chiamati trocofora, poi assumono una forma più schiacciata e diventano veliger. Il passaggio critico in queste forme larvali è caratterizzato dalla metamorfosi, in quanto da forme di vita in grado di nuotare diventano animali bentonici caratterizzati da scarsi spostamenti grazie ad un organo chiamato piede. Le successive forme larvali sono dapprima classificate come pediveliger, in cui l'individuo riesce ancora a nuotare grazie al velum, ma presenta anche il piede; in seguito diventa giovane esemplare che possiede gli stessi organi dell'individuo adulto e perde per cui la capacità di nuotare (Helm e Pellizzato, 1990). Lo scopo di questa ricerca è stato quello di descrivere nel dettaglio, con l'utilizzo di uno stereomicroscopio (larve molto piccole) e di un microscopio ottico (larve più grandi), lo sviluppo larvale di *V. philippinarum* in preparati freschi o fissati. In questo modo sarà possibile fornire un supporto con indicazioni dettagliate dei tempi di sviluppo di questa specie.

6.2 MATERIALI E METODI

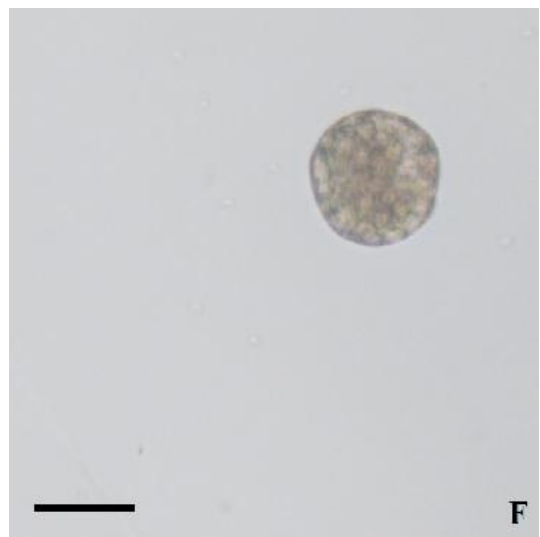
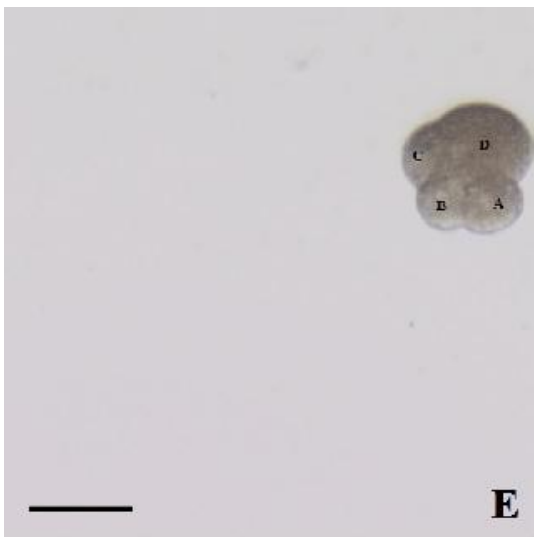
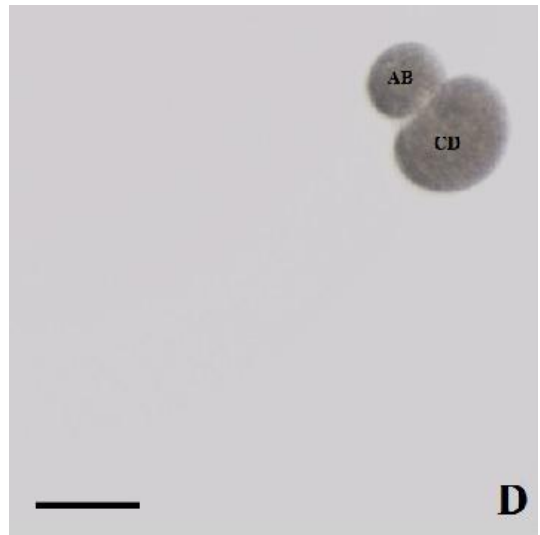
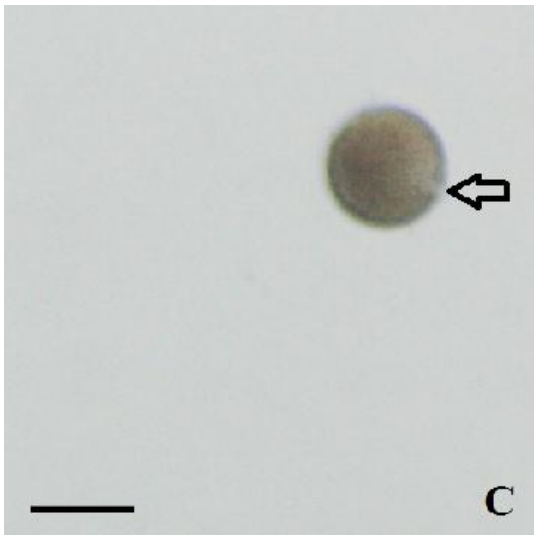
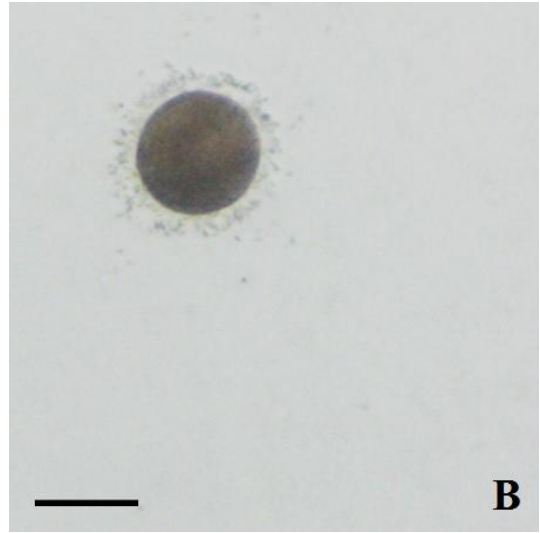
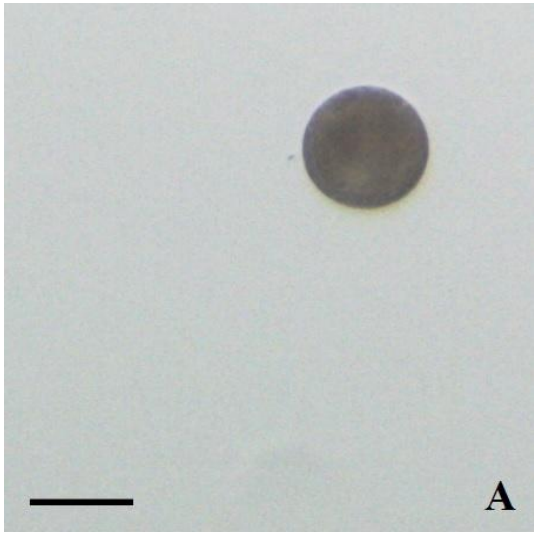
Le larve utilizzate per lo studio morfologico sono state ottenute da riproduttori di *Venerupis philippinarum* stabulati presso lo schiuditoio di Veneto Agricoltura a Pellestrina (Venezia). Raggiunta la maturazione gonadica, per ottenere l'emissione dei gameti, i riproduttori sono stati sottoposti ad uno sbalzo termico trasferendoli in contenitori con acqua riscaldata a 28-30°C per almeno 30 minuti. Dopo l'emissione dei gameti, si è proceduto alla fecondazione delle uova diluendo gli spermatozoi per evitare problemi di polispermia. Le larve ottenute sono state mantenute a 25°C in vasche aerate e alimentate con alghe unicellulari (*Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Thalassiosira pseudonana*) fino al raggiungimento delle sembianze di adulto (20 giorni dalla fecondazione), poi la temperatura è stata abbassata a 22°C. La valutazione dello sviluppo larvale è stata eseguita su animali *in toto* fino al raggiungimento dello stadio di giovanile, cioè quando avviene il passaggio da individuo planctonico a stanziale. Per poter acquisire le immagini con lo stereomicroscopio limitando il movimento dei molluschi, le larve sono state anestetizzate in un piccolo volume d'acqua a -20°C (anestesia da freddo) (Silberfeld e Gros, 2006).

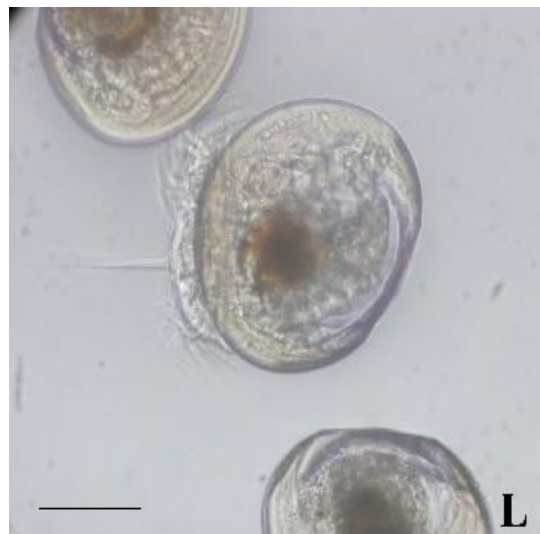
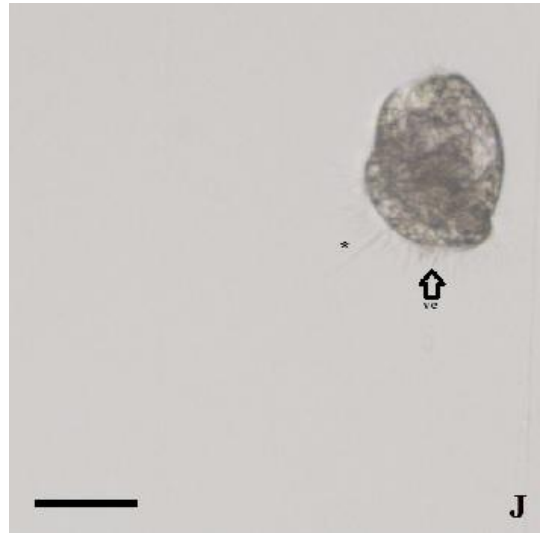
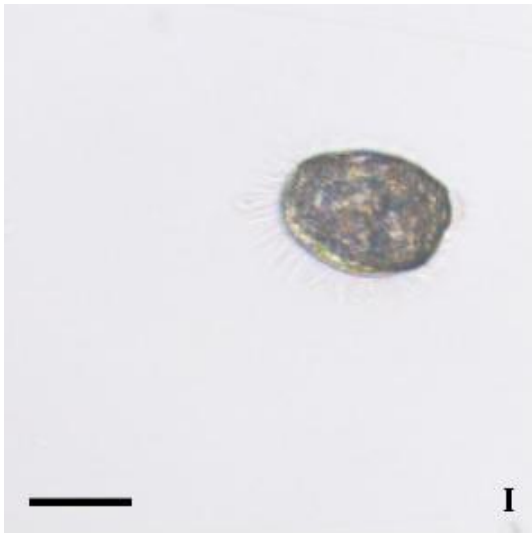
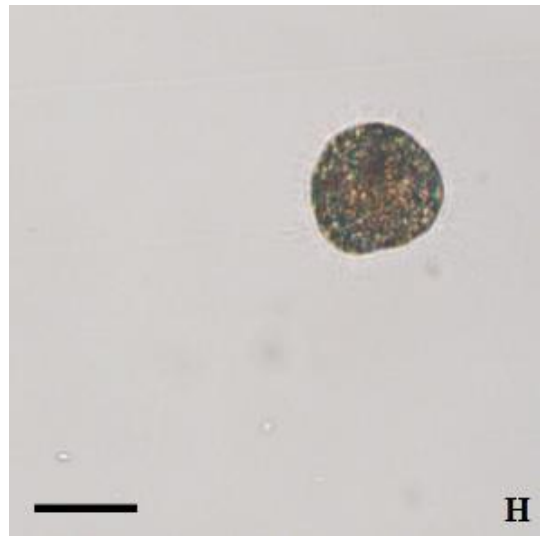
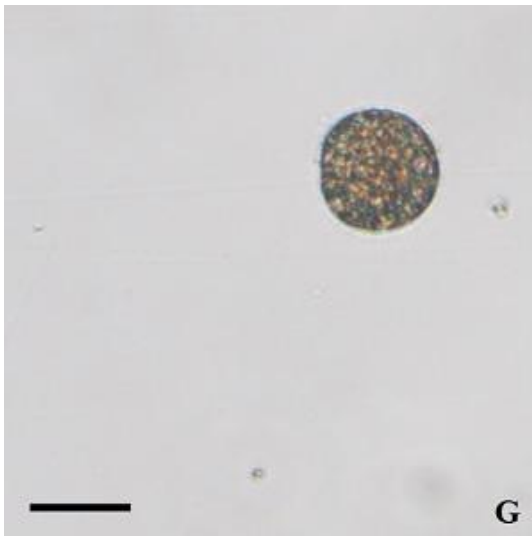
La valutazione dello sviluppo negli individui di dimensioni maggiori a 500 µm è stata effettuata mediante analisi istologica. Pertanto, gli animali sono stati fissati overnight a 4°C in paraformaldeide al 4% preparata in PBS (*phosphate buffer saline* 0,1M pH 7,4). Il giorno seguente, gli animali sono stati lavati in PBS e immersi in decalcificante (EDTA: Acido Etilen Diammino Tetracetico) per una settimana al fine di facilitare il taglio della conchiglia. In seguito sono stati processati in una scala ascendente di alcool e poi inclusi in paraffina. Dopo l'inclusione, i campioni sono stati sezionati al microtomo ad uno spessore di 4 µm e colorati con ematossilina-eosina.

6.3 RISULTATI

I riproduttori utilizzati per questa sperimentazione presentavano una lunghezza della conchiglia compresa tra i 4-4,5 cm.

Le uova emesse avevano un diametro medio di $60\pm 5 \mu\text{m}$ (Fig. A). Dopo 30 minuti dalla fecondazione si è assistito alla espulsione del globulo polare nella parte opposta al sito di penetrazione dello spermatozoo (Fig. 1C). La prima divisione mitotica ha portato alla formazione di due blastomeri di dimensioni differenti AB e CD (Fig. 1D). La seconda divisione ha prodotto quattro cellule, A B e C di uguale dimensione ed una più grande D; ciò avviene entro un'ora dalla fecondazione (Fig. 1E). Nei successivi stadi di sviluppo si è verificato un aumento delle cellule fino allo stadio di blastula e di gastrula ciliata (Fig. G) che è stato raggiunto circa 8 ore dopo la fecondazione. La gastrula si è differenziata in seguito in trocofora che possiede una forma più allungata. La parte anteriore della trocofora ha una corona ciliare con al centro un flagello apicale, mentre nella parte posteriore è presente un ciuffo di ciglia. In 24h si è sviluppato il *velum* che possiede ciglia utilizzate per la locomozione e per la raccolta di cibo; questo stadio viene chiamato *veliger* (Fig. 1I-L). Progressivamente si è assistito alla formazione della conchiglia e la larva ha assunto la forma umbonata. Il *setting* (fissazione al fondo) è avvenuto in 15 giorni, ma già dopo 10 giorni si è sviluppato il piede e si parla di *pediveliger* (Fig. 1M). In questo stadio è ancora presente il *velum*, che perde gradualmente la sua funzione e viene riassorbito dal mantello. A circa 20 giorni di età le larve hanno assunto la conformazione di adulto e la metamorfosi è stata completata (Fig. 1N).





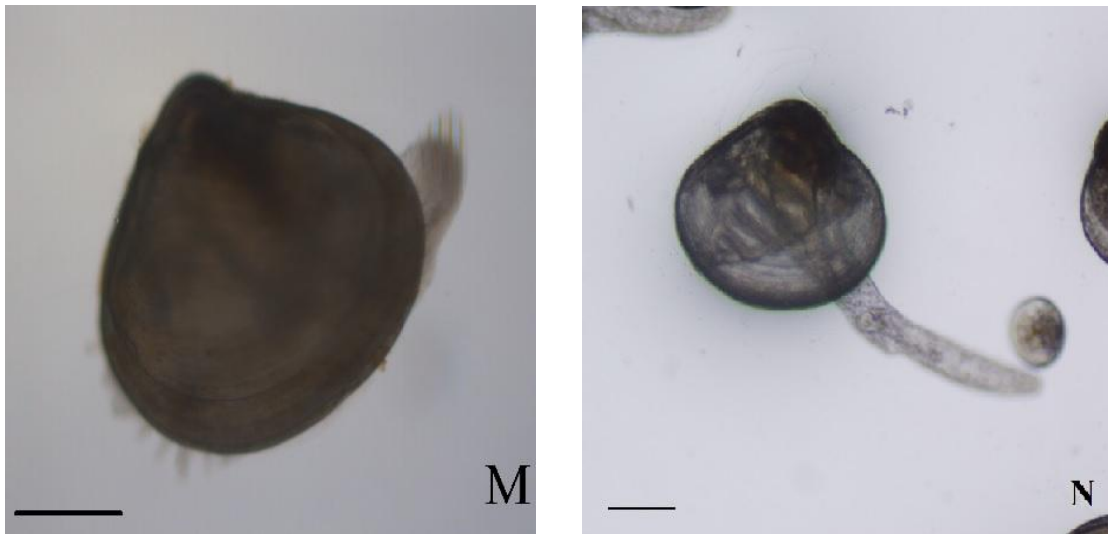


Fig.1 (A-N) Primi stadi di sviluppo di *V. philippinarum*. A cellula uovo. B uovo e spermatozoi. C espulsione del globulo polare indicato dalla freccia. D: prima divisione mitotica con formazione di due blastomeri AB-CD. E: seconda divisione mitotica con formazione di quattro blastomeri A, B, C, D. F: formazione della blastula. G: gastrula ciliata. H: stadio iniziale di *trocofora*. I: primo stadio di *veliger*. J: *veliger* con *velum* esposto. K: *veliger* con *velum* retratto. L: particolare del *velum*. M: *pediveliger*. N: giovane esemplare (*spat*). Barra di riferimento 50 μ m.

Avvenuta la metamorfosi *V. philippinarum* possiede le strutture e gli organi tipici degli individui adulti. Nelle immagini istologiche che seguono, sono evidenziati i vari organi.



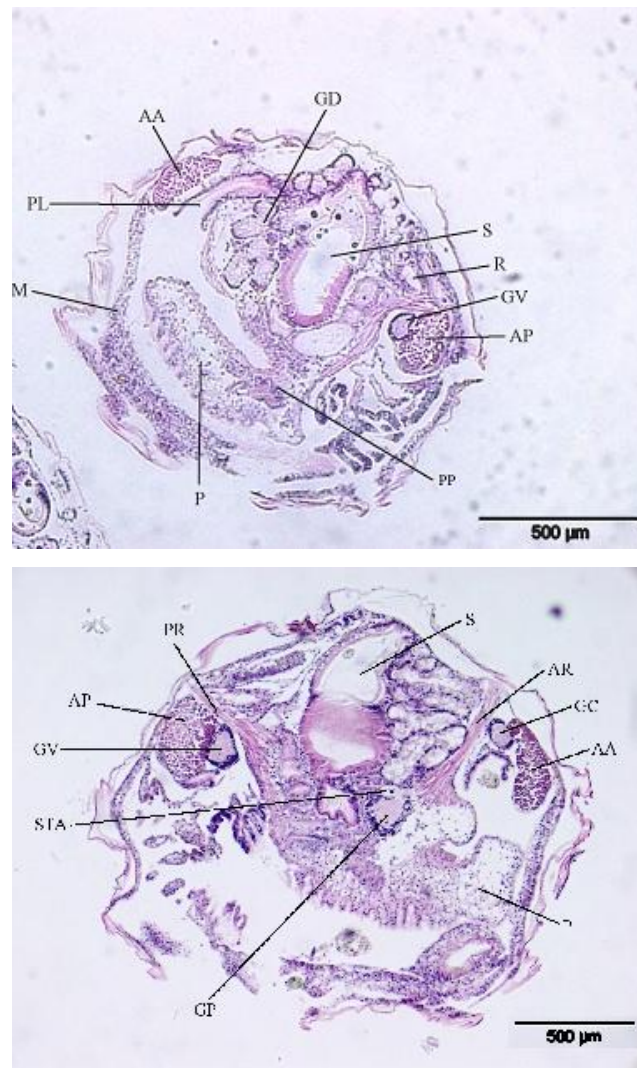


Fig. 2 (A-C). Sezioni istologiche di giovanili di *V. philippinarum*. Colorazione ematossilina-eosina. AA muscolo adduttore anteriore, AP muscolo adduttore posteriore, AR muscolo anteriore retrattile, GC ganglio cerebrale, GD ghiandola digestiva, GP ganglio pedale, GV ganglio viscerale, M mantello, P piede, PL palpi labiali, PP parte posteriore del piede, PR muscolo posteriore retrattile, R rene, S stomaco, STA statocisti.

6.4 DISCUSSIONE

La fecondazione in *V. philippinarum* avviene esternamente, con l'emissione dei gameti da parte delle femmine e dei maschi direttamente nell'acqua. In alcune specie come *Ostrea edulis*, *Truncilla truncata*, *Lampsilis cardium* gli spermatozoi sono rilasciati organizzati in una struttura che si distacca dal maschio e si muove verso la camera di

cova della femmina dove avviene la fecondazione interna (Waller, 1981). In *V. philippinarum* gli individui sono gonocorici (a sessi separati), anche se alcuni autori segnalano la presenza di rari casi di ermafroditismo (Drummond *et al.*, 2006; Delgado e Perez-Camacho, 2007). Alcune specie di bivalvi sono invece ermafrodite, possiedono pertanto entrambi gli organi riproduttivi, la fecondazione avviene di solito tra individui diversi, anche se sono stati documentati alcuni casi di auto-fecondazione (Heller, 1993). L'emissione dei gameti nei molluschi bivalvi avviene in modo spontaneo in natura, mentre in allevamento viene indotta artificialmente, negli individui adulti che hanno raggiunto la maturità sessuale, tramite stress osmotici, termici o trattamenti ormonali (Moueza *et al.*, 1999). Nello studio in oggetto per quanto riguarda *Venerupis philippinarum* è stata eseguita una stimolazione mediante sbalzo termico, portando la temperatura di stabulazione dei riproduttori da 22°C a 28°C per mezz'ora. In questa prova le vongole hanno emesso rapidamente, ma nel caso in cui non avvenga l'emissione, si può ripetere la stimolazione termica abbassando la temperatura fino a 22°C per poi rialzarla a 28°C e ripetendo la procedura più volte fino all'emissione dei gameti. Per evitare problemi di polispermia, nel momento in cui ha inizio l'emissione dei gameti gli individui sono trasferiti in contenitori singoli contenenti un piccolo volume d'acqua; in questo modo è possibile ridurre la concentrazione degli spermatozoi diluendo il volume d'acqua per evitare la fecondazione della cellula uovo da parte di più spermatozoi contemporaneamente. Solitamente, il maschio emette prima della femmina e per favorire l'emissione da parte degli altri individui un maschio in emissione viene mantenuto nella vasca con gli altri riproduttori. Nella nostra ricerca, gli oociti di *V. philippinarum* possedevano un diametro medio di 60 ± 5 μm , molto simile alle dimensioni di oociti riscontrati in altri veneridi quali: *Anomalocardia brasiliensis* (Moueza *et al.*, 1999) e *Tivela mactroides* (Silberfeld e Gros, 2006), mentre *Mercenaria mercenaria* e *Chione cancellata* possiedono oociti con un diametro compreso tra i 60-70 μm (Loosanoff e Davis, 1950; D'Asaro, 1967; Moueza *et al.*, 2006). Le uova dei veneridi hanno una dimensione intermedia tra quelle riscontrate negli altri molluschi bivalvi e una limitata disponibilità di nutrimento vitellino tipica di uno sviluppo planctotrofico (Ockelmann, 1965)

I primi stadi dell'embriogenesi sono abbastanza rapidi in tutti i molluschi bivalvi. Lo stadio di blastula cigliata viene raggiunto dopo 3 ore in *A. brasiliana* e *T. mactroides* (Moueza *et al.*, 1999; Silberfeld e Gros, 2006), mentre in *Codakia orbicularis* sono necessarie circa 9 ore (Gros *et al.*, 1997). In *V. philippinarum* si sono rese necessarie circa 7-8 ore affinché quasi tutti gli individui raggiungessero lo stadio di blastula cigliata. I diversi tempi di sviluppo embrionale sono probabilmente legati al differente contenuto vitellino della cellula uovo (Moueza *et al.*, 1999).

Il passaggio a gastrula cigliata è molto rapido: in circa 8 ore dalla fecondazione il 90% degli animali raggiunge questo stadio. Successivamente si assiste ad un allungamento della forma sferica e alla comparsa di un flagello apicale (stadio di trocofora). *V. philippinarum* ha impiegato poco più di 15 ore per raggiungere lo stadio di trocofora tempi molto simili a quelli riportati da Hodgson e Burke, (1988) e Gros *et al.*, (1997) per *Chlamys hastata* e *Codakia orbicularis*, rispettivamente. In altre specie di bivalvi allevati alla stessa temperatura lo stadio di trocofora viene raggiunto molto prima; ad esempio, per *Tivela mactroides* sono necessarie solo 6 ore dopo la fecondazione (Silberfeld e Gros, 2006).

Nella nostra ricerca, le larve di *V. philippinarum* mantenute a 25°C hanno raggiunto lo stadio di veliger in 24 ore, dopo aver passato lo stadio di larva a forma a D con velum. La larva veliger è caratterizzata dall'inizio della formazione della conchiglia. Il nome velum, che rappresenta l'organo di alimentazione e locomozione, deriva dal fatto che presenta due grandi lobi ciliati che si estendono nella zona mediana della larva e che nel loro complesso ricordano la forma di un velo. Allo stadio di veliger, il velum, che occupa la metà anteriore della cavità del mantello possiede un flagello apicale circondato da ciglia mobili di varia lunghezza. Le ciglia più lunghe servono per il nuoto e creano una corrente che trasporta il cibo verso quelle più piccole, localizzate nella parte periferica e coinvolte nel trasporto del cibo verso la bocca (Millar, 1955; Moueza *et al.*, 1999).

Alcuni autori sostengono che le ciglia abbiano anche funzione di recettori tattili (Waller, 1981). Il flagello apicale, costituito da ciglia non mobili, è presente dallo stadio di trocofora a quello di veliger ed è comune in numerose specie di bivalvi, ha

funzione di organo sensoriale e presenta recettori di tipo chimico e meccanico (Tardy e Dongard, 1993). Il flagello apicale sembra sia anche responsabile dell'attrazione per la luce, come evidenziato da Bayne (1964) che ha dimostrato la mancanza di fototropismo positivo nelle larve di *Mytilus edulis* a cui viene asportato l'organo apicale.

Dopo 10 giorni dalla fecondazione, *V. philippinarum* ha raggiunto lo stadio di pediveliger (170-200 μm), caratterizzato dalla comparsa del piede (Loosanoff *et al.*, 1996). Il pediveliger delle larve di bivalvi è accomunato da una serie di caratteristiche: un grande velum utilizzato per il nuoto e per raccogliere il cibo, un piede che serve per strisciare, un palpo cigliato (bocca) in cui le particelle di cibo sono selezionate prima di passare attraverso l'esofago e lo stomaco che è caratterizzato dal sacco dello stilo, una grande ghiandola digestiva, un intestino semplice, un mantello sottile, un sistema nervoso con ganglio cerebrale, pedale e viscerale, un piccolo paio di filamenti branchiali primari e una conchiglia esterna (Allen, 1961; D'Asaro, 1967; Alatalo *et al.*, 1984).

Lo sviluppo del piede rappresenta una fase molto importante della metamorfosi, in quanto consente alla larva di insediarsi nel terreno (D'Asaro, 1967). In questo stadio la larva riesce a nuotare e a utilizzare il piede per strisciare sul fondo o attaccarsi alle pareti della vasca. La larva si sposta sul fondo grazie alla estensione e contrazione della muscolatura del piede che, attraverso le ciglia, aderisce alla superficie. Alcuni autori hanno identificato tre muscoli retrattori del piede mentre altri solamente due (Quayle, 1952; Creek, 1960; Ansell, 1962). La comparsa del piede e il raggiungimento della piena funzionalità è molto variabile tra le diverse specie di bivalvi; molto spesso fra individui della stessa specie e all'interno della stessa vasca di allevamento ci possono essere delle differenze anche di alcuni giorni nel raggiungimento dello stadio di pediveliger (Moueza *et al.*, 1999). In *Mytilus spp.* il piede appare ad una lunghezza della conchiglia di circa 200-210 μm e diventa funzionale a circa 260 μm (Bayne, 1971). In *Placopecten magellanicus* sono necessari 28 giorni affinché metà delle larve possiedano un piede funzionale (Culliney, 1974).

A circa 20 giorni dalla fecondazione le larve di *V. philippinarum* perdono il velum, non sono più in grado di nuotare, assumono le sembianze di giovanili che prendono il nome

di “spat” e si insediano sul fondo. In questa specie la metamorfosi avviene senza la presenza di un particolare substrato. La capacità di raccogliere il cibo, che era tipica del velum, viene ora acquisita dalle branchie grazie all’allungamento e sviluppo dei filamenti branchiali (Moueza *et al.*, 1999; Da Costa *et al.*, 2008). I filamenti branchiali non hanno funzione di alimentazione durante la fase larvale; la corrente ciliare dei filamenti non è in grado di raccogliere l’alimento fino a quando non si stabilisce una connessione tra i filamenti e la bocca che avviene solo quando scompare il velum. La degenerazione del velum e la formazione dei palpi labiali avviene rapidamente durante la metamorfosi, in 2-3 giorni nella maggior parte delle specie l’intero apparato costituito da branchie e palpi labiali diventa funzionale (Moueza *et al.*, 1999). Pochi giorni dopo la metamorfosi le post larve della maggior parte delle specie hanno spessore inferiore a 2 mm; in queste condizioni è necessario un rapido raggiungimento di una efficiente corrente di alimentazione per consentire il passaggio di volumi adeguati di acqua attraverso le branchie (Ansell, 1962; Moueza *et al.*, 1999). Per facilitare il passaggio dell’acqua, dal mantello si formano i sifoni esalante ed inalante. In letteratura viene riportato che i sifoni e il piede non si estendono assieme, probabilmente perché l’emolinfa non è sufficiente per permettere l’estensione contemporanea di entrambi (Ansell, 1962; Moueza *et al.*, 1999).

I giovani esemplari di dimensioni maggiori di 1mm possiedono gli stessi organi degli adulti. Dalle immagini istologiche sono evidenti i principali organi dei molluschi bivalvi. È possibile distinguere il piede che è l’organo utilizzato per la locomozione. Viene esteso grazie all’afflusso di emolinfa e permette ai bivalvi fossori come *V. philippinarum* di scavare i substrati molli per potersi infossare. Il piede presenta due muscoli retrattori, anteriore e posteriore, utilizzati per ritirare il piede all’interno della conchiglia.

Quando questi bivalvi sono infossati nella sabbia possono estendere i sifoni oltre la superficie del terreno potendo così continuare a far entrare l’acqua all’interno delle valve. L’acqua entra dal sifone inalante passa attraverso le branchie ed esce dal sifone esalante (Gosling, 2003). Le branchie oltre ad essere utilizzate per la respirazione, grazie alle ciglia di cui sono rivestite creano una corrente che convoglia l’acqua

all'interno dell'animale e in questo modo raccolgono il cibo e lo convogliano verso la bocca, le branchie assumono per cui la funzione del velum.

Ciascuna branchia termina con un paio di palpi triangolari che si trovano in ciascuna parte della bocca (quattro strutture anatomiche, due per ciascun lato della bocca). La funzione dei palpi labiali è quella di rimuovere il materiale dalle branchie per prevenire la saturazione delle branchie; nel caso di elevate quantità di cibo la componente in eccesso e più grossa è eliminata come pseudo feci affinché possa continuare la filtrazione. La bocca è collegata, attraverso l'esofago, allo stomaco; entrambi gli organi sono ciliati per facilitare il passaggio del cibo. (De Vico e Carella, 2012)

Le particelle di cibo più piccole passano dallo stomaco ai dotti della ghiandola digestiva, mentre quelle più grandi vengono indirizzate all'intestino che si sviluppa in due o più circonvoluzioni e termina con l'ano nella cavità posteriore del mantello.

Dalle immagini istologiche sono ben visibili i due muscoli adduttori anteriore e posteriore che, quando contratti, mantengono chiuse le valve che costituiscono la conchiglia che ricopre il corpo dell'animale. La prima conchiglia larvale viene secreta durante gli stadi larvali; dopo la metamorfosi viene secreta la conchiglia molto simile a quella degli individui adulti. Questa conchiglia è maggiormente calcificata, possiede una differente pigmentazione e maggiori "sculture" rispetto alla conchiglia della larva. I bivalvi possiedono un sistema nevoso semplice e non hanno un capo differenziato (Cesari e Pellizzato, 1990), dalle immagini istologiche sono visibili le tre coppie di gangli principali: gangli cerebrali, pedali e viscerali.

Questi risultati forniscono utili informazioni sullo sviluppo larvale di *V. philippinarum* che possono essere un buon riferimento nell'allevamento degli stadi larvali di questa specie.

7. CONCLUSIONI

Con questa ricerca si è cercato di identificare parametri in grado di valutare lo stato di benessere di riproduttori di *Venerupis philippinarum* e *Venerupis decussata* e di approfondire le conoscenze sulla riproduzione e sulle prime fasi dello sviluppo larvale. Nello studio che ha riguardato l'analisi dei livelli di cortisolo in animali sottoposti a digiuno e ad anossia, è stato possibile verificare un trend in aumento con l'anossia e in diminuzione con il digiuno ma non è stata riscontrata nessuna evidenza significativa che questo ormone sia coinvolto nella risposta allo stress in questi animali, quanto piuttosto nel loro metabolismo.

L'analisi dello stato di salute di individui adulti di *V. philippinarum* presenti in Laguna di Venezia ha consentito di evidenziare una condizione diffusa di parassitosi da *Perkinsus olseni*. Nel nostro lavoro non è stata evidenziata una correlazione tra la presenza del parassita e l'inquinamento, ma probabilmente la presenza del parassita è influenzata da altri fattori come la salinità e la temperatura. Le analisi spettrofotometriche hanno permesso di evidenziare i livelli maggiori di metallotioneinae negli animali provenienti dal sito di Ca' Roman, animali che presentavano anche il maggior grado di infestazione da *Perkinsus olseni*. Tramite analisi spettrofotometriche inoltre sono stati riscontrati i livelli più alti di malondialdeide negli animali pescati a Palude del Monte. L'analisi immunocitochimica ha evidenziato una forte immunopositività agli anticorpi anti: CYP1A, HSP70, HNE e NT nel citoplasma degli emociti coinvolti nella risposta infiammatoria alla parassitosi da *Perkinsus* evidenziando una risposta immunitaria attiva nel combattere la infestazione parassitaria.

Nel lavoro di esposizione degli animali a B(a)P è stato dimostrato che l'esposizione all'inquinante determina un aumento dell'espressione del GSTr confermando il ruolo di quest'ultimo come possibile biomarcatore di esposizione al B(a)P. La depurazione di 24h, a cui sono stati sottoposti gli animali dopo il trattamento con B(a)P, ha prodotto una diminuzione del contenuto del B(a)P, anche se in modo non significativo, dimostrando l'importanza e la validità del processo di depurazione dei molluschi prima della commercializzazione per uso umano. La depurazione tuttavia non ha influenzato

l'espressione dei geni CYP4 e GSTr. L'aumento significativo delle brown cells negli animali trattati con le dosi maggiori di B(a)P ha evidenziato il ruolo di queste cellule nei processi di detossificazione da questo xenobiotico.

L'analisi sui riproduttori ha permesso di evidenziare che gli ormoni progesterone, testosterone ed estradiolo sono coinvolti nelle fasi della riproduzione di *V.*

philippinarum e *V. decussata*. La stadiazione gonadica ha sottolineato che la specie *V. decussata* matura più lentamente rispetto a *V. philippinarum*.

Lo studio sullo sviluppo larvale fornisce informazioni utili sui tempi di maturazione delle larve.

8. BIBLIOGRAFIA

Aas E., Baussant T., Balk L., Liewenborg B., Anderson O.K. (2005). PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquat Toxicol* 51:241-258.

Abollo E., Casas S.M., Ceschia G., Villalba A. (2006). Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol Cell Probes* 20:323-329.

Agius C. and Agbede S. A. (1984). Electron microscopical studies on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *J Fish Biol* 24:471-488.

Akcha F., Izuel C., Venier P., Budzinski H., Burgeot T., Narbonne J. (2000). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 49: 269-287.

Alatalo P., Berg C.J., D'Asaro C.N. (1984). Reproduction and development in the lucinid clam *Codakia orbicularis* (Linnè, 1758). *Bull Mar Sci* 34:424-434.

Aldini G., Dalle-Donne I., Maffei Facino R., Milzani A., Carini M. (2007). Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med Res Rev* 27:817-868.

Allen J.A. (1961). The development of *Pandora inaequalvis* (Linnè). *J Embryol Exp Morpho* 9:252-268

Anderson R.S. (1994). Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev Comp Immunol* 18:89-96.

Andrews J.D., Ray S.M. (1988). Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. *Amer Fish Soc Spec Publ* 18:47-63.

Ansell A.D. (1962). The functional morphology of the larva, and the post-larval development of *Venus striatula* (da Costa). *J Mar Biol Ass U.K.* 42:419-443.

Armstrong D., Browne R. (1994). The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol* 366:43-58.

Azevedo C. (1989). Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (*Apicomplexa*, *Perkinsea*) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J Parasitol* 75:627-635.

Banni M., Jebali, J., Daubeze M., Clerandau C., Guerbej H., Narbonne J.F., Boussetta H. (2005). Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers* 10:105-116.

Banni M., Negri A., Dagnino A., Jebali J., Ameer S., Boussetta H. (2010). Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:842-848.

Banni M., Negri A., Rebelo M., Rapallo F., Boussetta H., Viarengo A., Dondero F. (2009). Expression analysis of the molluscan p53 protein family mRNA in mussels (*Mytilus spp.*) exposed to organic contaminants. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 149:414-418.

Barcellos L.J.G., Marquezeb A., Trappc M., Quevedoa R.M., Ferreirad D. (2010). The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 300:231-236.

Baron J. (1992). Reproductive cycles of the bivalve molluscs *Atactodea striata* (Gmelin), *Gafrarium tumidum* Roding and *Anadara scapha* (L.) in New Caledonia. *Aust J Mar Freshwater Res* 43:393-402.

Battocchio M., Gabai G., Mollo A., Veronesi M.C., Soldano F., Bono G., Cairoli F. (1999). Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. *Theriogenology* 51:1059-1069.

Bayne B.L. (1964). The responses of the larvae of *Mytilus edulis* L. to light and to gravity. *Oikos*, 15:162-174.

Bayne B.L. (1971). Some morphological changes that occur at the metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis*. Fourth European Marine Biology Symposium, Crisp D.J.

Bernier N.J., Gorissen M., Flik G. (2012). Differential effects of chronic hypoxia and feed restriction on the expression of leptin and its receptor, food intake regulation and the endocrine stress response in common carp. *J Exp Biol* 215:2273-2282

Bertotto D., Poltronieri C., Negrato E., Richard J., Pascoli F., Simontacchi C., Radaelli G. (2011). Whole body cortisol and expression of HSP70, IGF-I and MSTN in early development of sea bass subjected to heat shock. *Gen Comp Endocrinol* 174:44-50.

- Blom S., Andersson T.B., Forlin L. (2000). Effects of food deprivation and handling stress on head kidney 17 α -hydroxyprogesterone 21-hydroxylase activity, plasma cortisol and the activities of liver detoxification enzymes in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 48:265-274
- Boatto V., Pellizzato M. (2005). La filiera della vongola. *Tapes philippinarum* in Italia. Editore Franco Angeli, pp 192.
- Boutet I., Tanguy A., Moraga D. (2004). Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. *Mar Biol* 146:53-64.
- Boutin S., Bernatchez L., Audet C., Derome N. (2013). Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota PLoS One. 8(12): e84772.
- Bower S.M., Blackburn J., Meyer G.R. (1992). Parasite and symbiont fauna of Japanese littlenecks, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850), in British Columbia. *J Shellfish Res* 11:13-19.
- Breber P. (1980). Annual gonadal cycle in the carpet-shell clam *Venerupis decussata* in Venice Lagoon, Italy. *Proc Natl Shellfish Ass* 70:31–35.
- Bucheli T.D., Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit Rev Env Sci Tech* 25: 201-268.
- Burreson E.M., Ragone-Calvo L.M. (1996). Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res* 15:17–34.
- Bushek D., Ford S.E., Burt I. (2012). Long-term patterns of an estuarine pathogen along a salinity gradient. *J Mar Res* 70: 2–3.
- Canestri-Trotti G., Baccarani E.M., Paesanti F., Turolla E. (2000). Monitoring of infections by protozoa of the genera *Nematopsis*, *Perkinsus* and *Porospora* in the smooth venus clam *Callista chione* from the North-Western Adriatic Sea (Italy). *Dis Aquat Org* 42:157-161.
- Casas S.M., Villalba A., Reece K.S. (2002). Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent

and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis Aquat Org* 50:51-65.

Cesari P., Pellizzato M. (1990). Biology of *Tapes philippinarum*. In: *Tapes philippinarum* biologia e sperimentazione. Regione Veneto ESAV 40-46.

Ceschia G., Sgro L., Ramirez Tafur R., Sello M., Zentilin A. (2007). Relationship between presence of *Perkinsus olseni* and mortality in manila clam (*Ruditapes philippinarum*) cultivated in Marano Lagoon (Italy). *Ittiopatologia* 4:215-225.

Ceschia G., Zentilin A., Giorgetti G. (1991). Presenza di *Perkinsus* in vongole veraci (*Ruditapes philippinarum*) allevate nel Nord-Est Italia. *Boll Soc It Patol Ittica* 5:101-108.

Chang L.L., Kau M.M., Wun W.S.A., Ho L.T., Wang P.S. (2002). Effects of fasting on corticosterone production by zona fasciculata-reticularis cells in ovariectomized rats *J Invest Med* 50:86-94

Cheng T.C. e Burton R.W.(1965). Relationships between *Bucephalus* sp and *Crassostrea virginica*. *Histopathology and sites of infection. Chesapeake Sci* 6:3-16

Cheng T.C. e Burton R.W.(1966). Relationships between *Bucephalus* sp and *Crassostrea virginica*. A histochemical study of some carbohydrates and carbohydrate complexes occurring in the host and parasite. *Parasitology* 56:111:152

Cheng TC, Bui MN, Howland KH, Schoenberg DA, Sullivan JT (1981). Effect of pre-injection of *Crassostrea virginica* with bacteria on subsequent chemotactic response by its hemocytes. *J Invertebr Pathol* 38:122-126.

Choi K.S., Park K. (2010). Review on the Protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters. *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China sea.*1:269-281.

Choi K.S., Wilson E.A., Lewis D.H., Powell E.N., Ray S.M. (1989). The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. *J Shellfish Res* 8:125-131.

Chu F.L.E., La Peyre J.F. (1993). Development of disease caused by the parasite, *Perkinsus marinus* and defense-related hemolymph factors in three populations of oysters from Chesapeake Bay, USA. *J Shellfish Res* 12:21–27.

- Chu F.L.E., La Peyre J.F., Burreson C.S. (1993). Perkinsus marinus infection and potential defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica* – salinity effects. J Invertebr Pathol 62:226–232.
- Chu F.L.E., Volety A.K., Hale R.C., Huang. Y. (2002). Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field contaminated sediments. Mar Environ Res 53:17-35.
- Creek G. A. (1960). The development of *Cardium edule* L. Proc Zool Soc Lond 135:243-260.
- Croll R.P., Wang C. (2007). Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs. Aquaculture 272:76-86.
- Culliney J.L. (1974). Larval development of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). Biol Bull 174:321-332.
- D'Asaro C. N. (1967). The morphology of larval and postlarval, *Chione Cancellata* Linné (Eulamellibranchia: Veneridae) reared in the laboratory. Bull Mar Sci 17:949-972.
- Da Costa F., Darriba S., Martinez-Patino D. (2008). Embryonic and larval development of *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) (Bivalvia: Pharidae). J Mollus Stud 74:103-10.
- Da Ros L., Canzonier W.J. (1985). *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the Mediterranean basin. B Eur Assoc Fish Pat 5:23-25.
- Da Ros L., Nesto N. (2005). Cellular alterations in *Mytilus galloprovincialis* (LMK), *Tapes philippinarum* (Adams, Reeve, 1850) as biomarkers of environmental stress: field studies in the Lagoon of Venice (Italy). Environ Int 31: 1078-1088.
- Davies K.J.A. (1995). Oxidative stress, the paradox of aerobic life. In: Rice Evans, C., Halliwell, B., Land, G.G., (Eds.), Free radical and oxidative stress: environment, drugs and food additives, Portland Press, London, 1-31.
- Davis S.R., Cousins R.J. (2000). Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. J Nutr 130:1085-1088.
- De Loncamp D., Lubet P., Drodowsky M. (1974). The in vitro biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). Gen Comp Endocrinol 22:116-127.
- De Vico G., Carella F. (2012). Argomenti di patologia comparata dei molluschi. Aspetti ecologici e sanitari. Loffredo Editore pp 351.

Delgado M., Perez Camacho A. (2005). Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia) and its relationship with available food. *Sci Mar* 69: 87-97.

Delgado M., Perez-Camacho A. (2007). Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. *Sci Mar* 71:471-484.

Depledge M.H. e Fossi M.C. (1994). The role of biomarker in environmental assessment: invertebrates. *Ecotoxicology*. 3:173-179.

Devauchelle N. (1990). Sexual development and maturity of *Tapes philippinarum*. In: *Tapes philippinarum* biologia e sperimentazione. Regione Veneto ESAV 59-62.

Dittman D.E., Ford S.E., Padilla D.K. (2001). Effects of *Perkinsus marinus* on reproduction and condition of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, depend on timing. *J Shellfish Res* 20:1025-1034.

Drummond L., Mulcahy M., Culloty S. (2006) The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* from the North-West of Ireland. *Aquaculture* 254:326-340.

Duran A., Talas Z.S. (2009) Biochemical changes and sensory assessment on tissues of carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) during sale conditions. *Fish Physiol Biochem* 35:709-714.

Durand F., Peters L.D., Livingstone D.R. (2002). Effect of intertidal compared to subtidal exposure on the uptake, loss and oxidative toxicity of water-born benzo[a]pyrene in the mantle and whole tissues of the mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar Environ Res* 54:271-274.

Eder K.J., Köhler H.R., Werner J. (2007). Pesticide and pathogen: heat shock protein expression and acetylcholinesterase inhibition in juvenile Chinook salmon in response to multiple stressors. *Environ Toxicol Chem* 26:1233-1242.

Ellman G.L. (1958). A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys* 74:443-450.

El-Sharaky A.S., Wahby M.M., Bader El-Dein M.M., Fawzy R.A., El-Shahawy I.N. (2009). Mutual anti-oxidative effect of gossypol acetic acid and gossypol-iron complex on hepatic lipid peroxidation in male rats. *Food Chem Toxicol* 47:2735-2741.

FAO (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations, fishery resources. www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_philippinarum/en Gennaio 2014.

Feder M.E., Hofmann G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Ann Rev Physiol* 61:243-282.

Fernandes D., Loi B., Porte C. (2011). Biosynthesis and metabolism of steroids in molluscs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127:189-195.

Figueras A., Robledo J.A.F., Novoa B. (1992). Occurrence of haplosporidian and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758), of the Ría de Vigo (Galicia, NW Spain). *J Shellfish Res* 11:377-382.

Frouin H., Pellerin J., Fournier M., Pelletier E., Richard P., Pichaud N., Rouleau C., Garnerot F. (2007). Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on soft-shell clam *Mya arenaria*. *Aquat Toxicol* 82:120-134.

Gabai G., Marinelli L., Simontacchi C., Bono G. (2004). The increase in plasma C₁₉Δ⁵ steroids in subcutaneous abdominal and jugular veins of dairy cattle pregnancy in unrelated to estrogenic activity. *Steroids* 69:121-127.

Gauthier-Clerc S., Pellerin J., Amiard J.C. (2006). Estradiol-17beta and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 145:133-139.

Goggin C.L. (1992). Occurrence of parasites of the genus *Perkinsus* in France. *Bull. Eur. Ass Fish Pathol* 12:174-176.

Gomez-Leon J., Aranguren R., Gestal C., Novoa B., Figueras A. (2007). Temporal distribution of potentially pathogenic agents detected on carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus* cultured in Galicia (NW Spain). *Aquat Living Resour* 20:185-189.

Gómez-Mendikute A., Etxeberria A., Olabarrieta I., Cajaraville M.P. (2002). Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. *Mar. Environ. Res.* 54: 431-436.

Gosling E. (2003). Bivalve molluscs. Biology, Ecology and culture John Wiley and Sons Ltd pp 443.

Gros O.L., Frenkiel L., Moueza M. (1997). Embryonic, larval, and post-larval development in the symbiotic clam *Codakia orbicularis*. *Invertebr Biol* 116:86-101.

- Haigler S.A. (1964). A histochemical and cytological study of the “brown cells” found in “auricular pericardial gland” and other tissues of the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Master’s thesis, University of Delaware.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2007). Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford, Oxford University Press pp 888.
- Hansen B.H., Garmo O.A., Olsvik P.A., Andersen R.A. (2007). Gill metal binding and stress gene transcription in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to metal environments: the effect of pre-exposure in natural populations. *Environ Toxicol Chem* 26:944-953.
- Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey L.R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-58.
- Heller J. (1993). Hermaphroditism in molluscs. *Biol J Linn Soc* 48:19-42.
- Helm M.M, Pellizzato M. (1990). Hatchery breeding and rearing of the *Tapes philippinarum* species. In: *Tapes philippinarum* biologia e sperimentazione. Regione Veneto ESAV 134-140.
- Herbert N.A., Steffensen J.F. (2005). The response of Atlantic cod, *Gadus morhua*, to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. *Mar Biol* 147:1403-1412
- Hine P.M. (2001). Problems of applying risk analysis to aquatic organisms. In: *Proceedings of the International Conference on Risk Analysis in Aquatic Animal Health*, Paris, France, 71-82.
- Hoarau P., Damiens G., Roméo M., Gnassia-Barelli M., Bebianno M.J. (2006). Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 143:196-203.
- Hodgson C.A., Burke R.D (1988). Development and larval morphology of the Spiny Scallop, *Chlamys hastate*. *Biol Bull* 174:303-318.
- Ischiropoulos H., Zhu L., Chen J., Tsai M., Martin J.C., Smith C.D., Beckman J.S. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298:431-437.
- Iwama G.K., Alfonso L.O.B., Vijayan M.M. (2006). Stress in Fish, In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. (Eds.), *The Physiology of Fishes*, Third edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, 319–342

- Iwama G.K., Thomas P.T., Forsyth R.B., Vijayan M.M. (1998). Heat shock protein expression in fish. *Rev Fish Biol Fish* 8:35-56.
- Jarzebski A. (1985). Major sterols of bivalve molluscs from the inner Puck bay, southern Baltic. *Comp Biochem Physiol* 81:989-991
- Kagi J.H.R. (1993). In: Suzuki K, Imura N, Kimura M (eds) *Metallothionein III. Biological roles and medical implications*. Birkhauser-Verlag, Basel, 29–55.
- Kagley A.N., Snider R.G., Krishnakumar P.K., Casillas E.(2003). Assessment of seasonal variability of cytochemical responses to contaminant exposure in the blue mussel *Mytilus edulis* (Complex). *Arch Environ Contam Toxicol* 44:43-53
- Kamel N., Attig H., Dagnino A., Boussetta H., Banni M. (2012). Increased temperatures affect oxidative stress markers and detoxification response to benzo[a]pyrene exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 63:534-543.
- Kelley K.M., Haigwood J.T., Perez M., Galima M.M. (2001). Serum insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as markers for anabolic/catabolic condition in fishes *Comp Biochem Physiol B* 129:229-236
- Ketata I., Guerhazi F., Rebai T., Hamza-Chaffai A. (2007). Variation of steroid concentrations during the reproductive cycle of the clam *Ruditapes decussatus*: A one year study in the gulf of Gabes area. *Comp Biochem Physiol A Mol Int Physiol* 147:424-431.
- Kim J.H., Dahms H.U., Rhee J.S., Lee Y.M., Lee J., Han K.N., Lee J.S. (2010). Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 151:99-106.
- Kubasik N. P. (1984). Il dosaggio radioimmunologico. In *Caleidoscopio Italiano. Tipolitografia Nuova ATA Genova* 9:1-73
- Laruelle F. J., Guillou J., Paulet Y. M. (1994). Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* on intertidal flats in Brittany. *J Mar Biol Assoc U.K.* 74:351-366.
- Le Curieux-Belfond O., Fievet B., Seralini G.E., Mathieu M. (2005). Short-term bioaccumulation, circulation and metabolism of estradiol-17 β in the oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Biol Ecol* 325:125-133.

- Le Pennec M., Benninger P.G. (2000). Reproductive characteristics and strategies of reducing-system bivalves. *Comp. Biochem Physiol* 126:1-16.
- Lee K.W., Raisuddin S., Rhee J.S., Hwang D.S., Yu I.T., Lee Y.M., Park H.G., Lee J.S. (2008b). Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. *Aquat Toxicol* 89: 158-166.
- Lee R., Lovatelli A., Ababouch L. (2008a). Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. FAO Fisheries Technical Paper. No. 511. Rome, FAO.
- Lehtonen K.K., Leiniö S., Schneider R., Leivuori M. (2006). Biomarkers of pollution effects in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* collected from the southern coast of Finland (Baltic Sea). *Mar Ecol Prog Ser* 322:155-168.
- Li X., Zhang X., Zhang J., Zhang X., Starkey S.R., Zhu K.Y. (2009). Identification and characterization of eleven glutathione S-transferase genes from the aquatic midge *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Insect Biochem Mol Biol* 39:745-754.
- Loosanoff V., Davis H.C. (1950). Conditioning *V. mercenaria* for spawning in winter and breeding its larvae in the laboratory. *Biol Bull* 98:60-65.
- Loosanoff V.L., Davis H.C., Chanley P.E. (1996). Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. *Malacologia* 4:351-435.
- Lowe D.M. (1988). Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar Ecol Prog* 46:91-100.
- Lubet P., Mathieu M. (1990). Les régulations endocriniennes chez les Mollusques bivalves. *Ann Biol* 29: 235-252
- Lupo Di Prisco C. e Dessì Fulgheri F.(1975). Alternative pathways of steroid biosynthesis in gonads and hepatopancreas of *Aplysia Depilans*. *Comp Biochem Physiol* 50:191-195
- Lyons C., Dowling V., Tedengren M., Gardeström J., Hartl M.G., O'Brien N., van Pelt F.N., O'Halloran J., Sheehan D. (2003). Variability of heat shock proteins and glutathione S-transferase in gill and digestive gland of blue mussel, *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res* 56:585-97.
- Mackin J.G. (1951). Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* by *Dermocystidium marinum*. *Bull Mar Sci Gulf and Caribb* 1:72-87.

- Manning, W.J. e Feder W.A. (1980). Biomonitoring air pollutants with plants. Applied Science Pub. Ltd, London, UK pp 142.
- Maradonna F., Carnevali O. (2007). Vitellogenin, zona radiata protein, cathepsin D and heat shock protein 70 as biomarkers of exposure to xenobiotics. *Biomarkers* 12:240-255.
- Marigomez I., Baybay-Villacorta L.(2003). Pollutant specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquat Toxicol* 64:235-257.
- Marigómez I., Izagirre U., Lekube X. (2005). Lysosomal enlargement in digestive cells of mussels exposed to cadmium, benzo[a]pyrene and their combination. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol* 141:188-193.
- Marin M.G., Moschino V., Doppieri M., Lucchetta L. (2003). Variation in gross biochemical composition, energy value and condition index of *T. philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture* 219:859-871.
- Martinez G., Rivera A. (1994). Role of monoamines in the reproductive process of (*Argiopesten purpuratus*). *Invetebr Reprod Dev* 25:167-174.
- Matias D., Joaquim S., Margarete Matias A., Moura P., de Sousa J.T., Sobral P., Leitao A. (2013). The reproductive cycle of the European clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758) in two Portuguese populations: Implication for management and aquaculture programs. *Aquaculture* 406-407:52-61.
- Matozzo V., Ballarin L., Marin M.G. (2004). Exposure of the clam *Tapes philippinarum* to 4-nonylphenol: changes in anti-oxidant enzyme activities and re-burrowing capability. *Mar Pollut Bull* 48:563-571.
- Matozzo V., Binelli A., Parolini M., Locatello L., Marin M.G. (2010). Biomarker responses and contamination levels in the clam *Ruditapes philippinarum* for biomonitoring the Lagoon of Venice (Italy). *J Environ Monit* 12:776-786.
- Matozzo V., Binelli A., Parolini M., Previato M., Masiero L., Finos L., Bressan M., Marin M.G. (2012). Biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* and contamination levels in sediments from seaward and landward sites in the Lagoon of Venice. *Ecol Indic* 19:191-205.
- Matozzo V., Deppieri M., Moschino V., Marin M.G. (2003). Evaluation of 4-nonylphenol toxicity in the clam *Tapes philippinarum*. *Environ Res* 91:179-185.

- Matozzo V., Marin M.G. (2007). First evidence of altered vitellogenin-like protein levels in clam *Tapes philippinarum* and in cockle *Cerastoderma glaucum* from the Lagoon of Venice. *Mar Pollut Bull* 55:494-504.
- Matozzo V., Marin M.G., (2005). Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? *Environ Res* 97:43-49.
- Matozzo V., Monari M., Foschi J., Cattani O., Serrazanetti G.P., Marin M.G. (2007). First evidence of altered immune responses and resistance to air exposure in the clam *Chamelea gallina* exposed to benzo(a)pyrene. *Arch Environ Contam Toxicol* 56:479-488.
- Matozzo V., Tomei A., Marin M.G. (2005). Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar Pollut Bull* 50:1686-1693.
- Mazzi V. (1977). *Tecniche istologiche e istochimiche*. Piccin, Padova pp 750.
- Meneghetti F., Moschino V., Da Ros L. (2004). Gametogenic cycle and variations in oocyte size of *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture* 240:473-488.
- Methling C., Alurub N., Vijayanb M.M., Steffensena J.F. (2010). Effect of moderate hypoxia at three acclimation temperatures on stress responses in Atlantic cod with different haemoglobin types. *Comp Biochem Physiol A* 156:485-490
- Miao J., Pan L., Liu N., Xu C., Zhang L. (2011). Molecular cloning of CYP4 and GSTpi homologues in the scallop *Chlamys farreri* and its expression in response to Benzo(a)pyrene exposure. *Mar Genomics* 4:99-108.
- Millar R.H. (1955). Notes on the mechanism of food movement in the gut of the larval oyster, *Ostrea edulis*. *Q J Microsc Sci* 96:539-544.
- Monari M., Cattani O., Serrazanetti G.P., Selli A., Pagliuca G., Zironi E., O'Hara S.C.M., Livingstone D.R. (2007). Effect of exposure to benzo[a]pyrene on SODs, CYP1A1/1A2- and CYP2E1 immunopositive proteins in the blood clam *Scapharca inaequivalvis*. *Mar Environ Res* 63:200-218.
- Monari M., Foschi J., Matozzo V., Marin M.G., Fabbri M., Rosmini R., Serrazanetti G.P. (2009). Investigation of EROD, CYP1A immunopositive proteins and SOD in haemocytes of *Chamelea gallina* and their role in response to B[a]P. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 149:382-392.

- Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C. (1990). Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY pp 450.
- Moss SM. (1989). Effects of exogenous androgens on growth, biochemical composition, and reproduction of the coot clam, *Mulinia lateralis*. Pac Sci 43:200
- Moueza M., Gros O., Frenkiel L. (1999). Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia Brasiliiana* (Bivalvia, Veneridae). J Moll Stud 65:73-88.
- Moueza M., Gros O., Frenkiel L. (2006). Embryonic development and shell differentiation in *Chione cancellata* (Bivalvia, Veneridae): an ultrastructural analysis. Invert Bio 125:21-33.
- Nail P.M., Choi J. (2011). Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathions S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. Aquat Toxicol 101:550-560.
- Narbonne J.F., Aarab N., Clérandeau C., Daubèze M., Narbonne J., Champeau O., Garrigues P. (2005). Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. Biomarkers 10:58-71.
- Nasci C., Da Ros L., Nesto N., Sperti L., Passarini F., Pavoni B. (2000). Biochemical, histochemical responses to environmental contaminants in clam, *Tapes philippinarum*, transplanted to different polluted areas of Venice Lagoon, Italy. Mar Environ Res 50:425-430.
- Nebert D.W., Gonzalez F.J. (1987). P450 genes: structure, evolution, and regulation. Annu Rev Biochem 56:945-993.
- Negrato E., Marin M.G., Bertotto D., Matozzo V., Poltronieri C., Simontacchi C. (2008). Sex steroids in *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve 1850) during gametogenic cycle: preliminary results. Fresen Environ Bull 17:1466-1470.
- Nelson D.R. (1998). Metazoan cytochrome P450 evolution. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 121:15-22.
- Ockelmann K.W. (1965). Redescription, distribution, biology and dimorphous sperm of *Montacuta tenella* (Mollusca, Leptonacea). Ophelia 2:211-221.

- Ojea J., Pazos A.J., Martinez D., Novoa S., Sanchez J.L., Abad M. (2004). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238:451-468.
- Ortiz R.M., Wade C.E., Ortiz C.L. (2001). Effects of prolonged fasting on plasma cortisol and TH in postweaned northern elephant seal pups. *Am. J. Physiol.-Regul Integrat Comp Physiol* 280:790-795
- Ottaviani E, Caselgrandi E, Fontanili P, Franceschi C. (1992). Evolution, immune responses and stress: studies on molluscan cells. *Acta Biol Hung* 43:293-298.
- Pampanin D.M., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci C. (2005). Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy) *Mar Pollut Bull* 50:1548–1557.
- Pan L., Liu N., Xu C., Miao J. (2011). Identification of a novel P450 gene belonging to the CYP4 family in the clam *Ruditapes philippinarum*, and analysis of basal- and benzo(a)pyrene-induced mRNA expression levels in selected tissues. *Environ. Pharmacol Toxicol* 32:390-398.
- Park H., Ahn I.Y., Kim H., Lee J., Shin S.C. (2009). Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 150:528-536.
- Park K.I., Yang H.S., Kang H.S., Cho M., Park K.J., Choi K.S. (2010). Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. *J Invertebr Pathol* 105:261-269.
- Pascoli F., Negrato E., Di Giancamillo A., Bertotto D., Domeneghini C., Mutinelli F., Simontacchi C., Radaelli G. (2011). Evaluation of oxidative stress biomarkers in *Zosterisessor ophiocephalus* from the Venice Lagoon, Italy. *Aquat Toxicol* 101:512-520.
- Pazos A.J., Mathieu M. (1999). Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. *Gen Comp Endocrinol* 133:112-120.
- Pellizzato M. (1990). Acclimatization of the *Tapes philippinarum* species and the first experimental rearing basins in Italy. In: *Tapes philippinarum* biologia e sperimentazione. Regione Veneto ESAV 167-170.

- Perez-Camacho A. (1980). Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) con especial referencia a factores determinantes de la producción. Biol Inst Esp Oceanogr 281:353-358.
- Pipe R.K. (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev Comp Immunol 16:111-122.
- Porte C., Biosca X., Solé M., Borghi V., Martínez M., Chamorro J., Torreblanca A., Ortiz M., Orbea A., Soto M., Cajaraville M.P. (2001). Chemical, biochemical and cellular responses in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Spanish Mediterranean coast. Biomarkers 6:335-350.
- Porte C., Janer G., Lorusso L.C., Ortiz-Zarragoitia M., Cajaraville M.P., Fossi M.C. e Canesi L. (2006). Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. Comp Biochem Physiol C 143:303-315.
- Pottinger T.G., Rand-Weaver M., Sumpter J.P. (2003). Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilization. Comp Biochem Physiol B 136:403-417.
- Quayle D. B. (1952). Structure and biology of the larva and spat of *Venerupis pullastra* (Montagu). Trans R Soc Edinb 62:255-297.
- Ragone Calvo L.M., Wetzel R.L., Burreson E.M. (2000). Development and verification of a model for the population dynamics of the protistan parasite, *Perkinsus marinus*, within its host, the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in Chesapeake Bay. J Shellfish Res 20:231-241.
- Reddy P.K., Vijayan M.M., Leatherland J.F., Moon T.W. (1995). Does RU486 modify hormonal responses to handling stressor and cortisol treatment in fed and fasted rainbow trout? J Fish Biol 46:341-359
- Reis-Henriques M.A., Le Guellec D., Remy-Martin J.P., Adessi G.L. (1990). Studies of endogenous steroids from marine mollusc *Mytilus edulis* (L.) by gas chromatography and mass spectrometry. Comp Biochem Physiol 95B:303-309.
- Rhee J.S., Lee Y.M., Hwang D.S., Lee K.W., Kim I.C., Shin K.H., Raisuddin S., Lee J.S. (2007). Molecular cloning and characterization of omega class glutathione S-transferase (GST-O) from the polychaete *Neanthes succinea*: biochemical comparison with theta class glutathione S-transferase (GST-T). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 146:471-417.

- Rodriguez-Moscoso E. e Arnaiz R. (1998). Gametogenesis and energy storage in a population of the grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus* (Linne, 1787) in northwest Spain. *Aquaculture* 162:125-139.
- Rodriguez-Moscoso E., Pazo J.P., Garcia A., Fernández- Cortes. F.(1992). Reproductive cycle of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in Ria of Vigo (NW Spain). *Sci Mar* 56:61-67.
- Rola R.C., Monteiro Mda C., Reis S.R., Sandrini J.Z. (2012). Molecular and biochemical biomarkers responses in the mussel *Mytilus edulis* collected from Southern Brazil coast. *Mar Pollut Bull* 64:766-771.
- Ruano F., Cachola R. (1986). Outbreak of a severe epizootic of *Perkinsus marinus* (Levin - 78) at Ria de Faro clam's culture beds. In: Proceedings of 2nd International Colloq Pathol Mar Aquac (PAMAQ II). Porto (Portugal), 41–42.
- Ruddell C.R. e Wellings S.R. (1971). The ultrastructure of the oyster brown cells; a cell with a fenestrated plasma membrane. *Z Zellforsch* 120:17-28.
- Sanders B.M. (1993). Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit Rev Toxicol* 23:49-75.
- Sarasquete C., Segner H. (2000). Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Sci Total Environ* 247:313-332.
- Scott A.P. (2012). Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids. *Steroids* 77:1450-1468.
- Serafim A., Bebianno M.J. (2010). Effect of a polymetallic mixture on metal accumulation and metallothionein response in the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquat Toxicol* 99:370-378.
- Shaffee M.S., Daouidi M. (1991). Gametogenesis and spawning in the carpet- shell clam, *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia), from the Atlantic coast of Marocco. *Aquacult Fish Manage* 22:203-216
- Siah A., Pellerin J., Benosman A., Gagné J.P., Amiard J.-C. (2002). Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Comp Physiol Biochem* 132:499-511.

- Silberfeld T., Gros O. (2006). Embryonic development of the tropical bivalve *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Veneridae: subfamily Meretricinae): a SEM study. *Cah Biol Mar* 47:243-251.
- Simao M.F., Leite R.B., Rocha C., Cancela M.L. (2010). Changes in bioturbation of iron biogeochemistry and in molecular response of the clam *Ruditapes decussates* upon *Perkinsus olseni* infection. *Arch Environ Contam Toxicol* 59:433-443.
- Simpson A.E.C.M. (1997). The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmacol* 28:351-359.
- Snyder M.J. (1998). Cytochrome P450 enzymes belonging to the CYP4 family from marine invertebrates. *Biochem Biophys Res Commun* 249:187-190.
- Snyder M.J. (2000). Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates recent advances and future directions. *Aquat Toxicol* 48:529-547.
- Solé M., Livingstone D.R. (2005). Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and 'NADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase' activity in a wide range of marine invertebrate species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 141:20-31.
- Soudant P., Chu F., Volety A. (2013). Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *J Invertebr Pathol* 114:196-216.
- Stegeman J.J., Hahn M.E. (1994). Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins DC, Ostrander GK, editors. *Aquatic toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, Boca Raton: Aquatic Publisher 87-206.
- Stein J.E., Mackin J.C. (1955). A study of the nature of pigment cells of oysters and the relation of their numbers to the fungus disease caused by *Dermocystidium marinum*. *Texas J Sci* 7:422-429
- Sumpter J.P., Le Bail P.Y., Pickering A.D., Pottinger T.G., Carragher J.F. (1991). The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 83:94-102
- Tardy J., Dongard S. (1993). Le complexe apical de la véligère de *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve, 1850) Mollusque Bivalve Vénéridé. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris Serie III* 316:177-184.

- Tcholakian R.K. e Eik-Nes K.B. (1969). Conversion of progesterone to 11-deoxycorticosterone by the androgenic gland of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun), *Gen Comp Endocrinol* 12:171-173
- Tcholakian R.K. e Eik-Nes K.B. (1971). Steroidogenesis in the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. *Gen Comp Endocrinol* 17:115-124.
- Teshima S. e Kanazawa A. (1970). Production of 11-ketotestosterone and other steroids by the sliced ovaries of crab, *Portunus trituberculatus*. *Bull Japan Soc Sci Fish* 36:246-249.
- Teshima S. e Kanazawa A. (1971). Bioconversion of progesterone by the ovaries of crab, *Portunus trituberculatus*. *Gen Comp Endocrinol* 17:152-157.
- Uzmann J.R., Stickney A.P. (1954). *Trichodina myicola* n. sp., a peritrichous ciliate from the marine bivalve *Mya arenaria* L. *J Protozool* 1:149-155.
- Van Raaij M.T., Pit D.S., Balm P.H, Steffens A.B., Van Den Thillart G.E. (1996). Behavioral strategy and the physiological stress response in rainbow trout exposed to severe hypoxia. *Horm Behav* 30:85–92
- Veneto Agricoltura (2013). La vongola verace in Laguna Veneta in: Osservatorio Socio Economico della Pesca e dell'Acquacoltura. Veneto Agricoltura.
- Vergani L., Grattarola M., Borghi C., Dondero F., Viarengo A. (2005). Fish and molluscan metallothioneins – A structural and functional comparison. *FEBS J* 272:6014-6023.
- Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M., Marchi B., Ponzano E., Blasco J. (1999a). Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am J Physiol* 277:1612-1619.
- Viarengo A., Burlando B., Dondero F., Marro A., Fabbri R. (1999b). Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* 4:455-466.
- Viarengo A., Nott J.A. (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 104:355-372.
- Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Mar Environ Res* 44:69-84.

- Villalba A., Carballal M.J., Lopez. M.C. (1993). Estudio del ciclo gonadal de tres especies de almeja, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* y *Venerupis rhomboides* de las rías gallegas. Actas IV Congreso Nac. Acuicultura 341-346.
- Villalba A., Casas S.M., López C., Carballal M.J. (2005). Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. Dis Aquat Organ 65:257-67.
- Villalba A., Reece K.S., Ordas M.C., Casas S.M., Figueras A. (2004). Perkinsosis in molluscs: a review. Aquat. Living Resour. 17:411–432.
- Waller T.R. (1981). Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster *Ostrea edulis* Linné. Smithson Contr Zool 328: 1-71.
- Weber T.E., Bosworth B.G. (2005). Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. Aquaculture 246:483-492
- Wendelaar Bonga S.E. (1997). The stress response in fish. Physiol Rev 77:591-625.
- Widdows J., Donkin P., Staff F.J., Matthiessen P., Law R.J., Allen Y.T., Thain J.E., Allchin C.R., Jones B.R. (2002). Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. Mar Environ Res 53:327-356.
- Winston G.W., Di Giulio R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat Toxicol 19:137-161.
- Wolke R. E., Murchelano R. A., Dickstein C. and George C. J. (1985). Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. Bull Environ Contam Toxicol 35:222-227.
- Won E.J., Kim R.O., Rhee J.S., Park G.S., Lee J.H., Shin K.H., Lee Y.M., Lee J.S. (2011). Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, *Perinereis nuntia*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 154:82-89.
- Xie Q., Burnell G.M. (1994). A comparative study of the gametogenic cycles of the clams *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Tapes decussatus* (Linnaeus) on the south coasts of Ireland. J Shellfish Res 13:467-472.

- Xu K., Lei Y., Al-Rasheid K., Song W. (2011). Two new ectoparasitic ciliates, *Sphenophrya solinis* sp. nov. and *Planeticovorticella paradoxa* sp. nov. (Protozoa: Ciliophora), from marine molluscs. *J Mar Biol Assoc UK* 91:265–274.
- Xu K., Song W. (2008). Two trichodinid ectoparasites from marine molluscs in the Yellow Sea, off China, with the description of *Trichodina caecellae* n. sp. (Protozoa: Ciliophora: Peritrichia.). *Syst Parasitol* 69:1-11.
- Yamashita M., Hirayoshi K., Nagata 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.
- Yoshida Y., Itoh N., Hayakawa M., Piga R., Cynshi O., Jishage K., Niki E. (2005). Lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride and its inhibition by antioxidant as evaluated by an oxidative stress marker, HODE. *Toxicol Appl Pharmacol* 208:87-97.
- Zarogian G., Yevich P. (1993). Cytology and biochemistry of brown cells in *Crassostrea virginica* collected at clean and contaminated stations. *Environ Pollut* 79:191-197.
- Zhang L., Qiu L., Wu H., Liu X., You L., Pei D., Chen L., Wang Q., Zhao J. (2012). Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo(a)pyrene. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 155:517-527.
- Zhou C., Li C.H., Zhang W.M., Jia X.P. (2010). CYP4 genes cloning and expression level analysis of *Perna viridis*. *J Trop Oceanogr* 29:82-88.
- Zorita I., Ortiz-Zarragoitia M., Soto M., Cajaraville M.P.(2006). Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquat Toxicol* 78:109-116.
- Zuasti A., Jara J. R., Ferrer C. and Solano F. (1989). Occurrence of melanin granules and melano synthesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigment Cell Res* 2:93-99.