

Parametri morfologici emocitari ed espressione mantellare di Heat Shock Protein a 70 kDa (HSP 70) quali possibili indicatori di stress in *Mytilus galloprovincialis*

Hemocyte morphological parameters and Heat Shock Protein 70 kDa (HSP 70) mantle expression as stress parameters in Mytilus galloprovincialis

Francesco Mosca¹, Luciano Mariano Spadaccini¹, Maria Grazia Finoia²,
Selene Marozzi¹, Valeria Narcisi¹, Pietro Giorgio Tiscar^{1*}

¹ Dpt. di Scienze Biomediche Comparate, Università degli Studi di Teramo, Piazza A. Moro, 45 - 64100 Teramo

² ICRAM, Via di Casalotti, 300 - 00166 Roma

RIASSUNTO – Scopo del presente studio è stato quello di valutare il ruolo di alcuni parametri morfologici emocitari (diametro e circolarità) e l'espressione mantellare di proteine dello shock termico a 70 kDa (HSP 70) quali indicatori di stress nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*). Gruppi di mitili sono stati stressati termicamente (40° C) per tempi differenti e poi riposti nelle condizioni originarie di controllo (18° C); i parametri emocitari sono stati valutati mediante analizzatore di vitalità cellulare sia al termine dello stress, mostrando un significativo aumento del diametro e della circolarità, sia durante il recupero a 18° C, evidenziando la relazione esistente tra la durata dello stress e la capacità degli organismi nel recuperare le loro condizioni omeostatiche. Inoltre, è stato osservato come emociti del gruppo di controllo, stimolati *in vitro* con *Vibrio alginolyticus*, mostravano un significativo decremento del diametro e della circolarità, mentre gli emociti del gruppo stressato mantenevano la conformazione fortemente rotondeggiante indotta dal trattamento termico, confermando così gli effetti inibitori dello stress sulla fagocitosi emocitaria o, più specificatamente, sulla loro attività pseudopodica e locomotoria. Inoltre, un terzo gruppo di mitili è stato mantenuto fuori dall'acqua a temperatura di refrigerazione (4° C per 24 ore), mostrando il medesimo aumento dei parametri indagati in maniera tempo-dipendente. L'aumentata sintesi di HSP 70 è stata riscontrata nei mitili stressati termicamente, soprattutto dopo 24 ore dal termine del trattamento, mentre le condizioni ipossiche e di refrigerazione hanno determinato, al contrario, un decremento della sintesi tempo-dipendente. In conclusione, i parametri studiati potrebbero rappresentare due importanti indicatori di stress sia in ricerche di campo che sperimentali, suggerendo così il loro uso nel monitoraggio ambientale, nella gestione della risorsa ed infine nella valutazione della qualità alimentare.

SUMMARY – *The present study aim of investigating the role of the hemocyte morphological parameters (diameter and circularity) and the mantle heat shock protein 70 kDa (HSP 70) as stress parameters in the mussel Mytilus galloprovincialis. The mussel specimens were exposed to the heat stress (40° C) for different times and then placed to the control temperature (18° C); after the stress and during the recovery, the hemocyte parameters were measured using a cell viability analyzer and the results showed the significant increase of the diameter and circularity, demonstrating also the relation between the treatment duration and the mussels ability to recover their homeostasis. Moreover, hemocyte stimulation with Vibrio alginolyticus was conducted in vitro and a significant decrease of the diameter and circularity was observed, whereas the stressed hemocytes maintained their roundish shape, so confirming the inhibitory effect of the stress on the cellular immune system. A third mussel group was also maintained out of the water at cooling temperature (4° C for 24 hours), showing the significant increase of the parameters investigated in a time-dependent manner. The HSP 70 synthesis increase was observed in the heat stressed mussels, particularly after 24 hours of recovery, whereas the cooling temperature exposure induced a time-dependent decrease of the protein expression. In conclusion, the two parameters investigated could represent important stress markers both in field and in experimental study, so suggesting their use in the environmental monitoring, shellfish culture or natural beds management and seafood quality assessment.*

Key words: Mussel, *Mytilus galloprovincialis*, Stress, Phagocytosis, Circularity, Heat Shock Proteins (HSPs)

* Corresponding Author: c/o Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Piazza A. Moro, 45 - 64100 Teramo – Italy. Tel.: 0861-266872; Fax: 0861-412868; E-mail: pgtiscar@unite.it

INTRODUZIONE

Lo stress rappresenta una perturbazione del normale equilibrio omeostatico degli organismi e numerosi settori di ricerca sono rivolti allo studio ed allo sviluppo di indicatori in grado di misurare sia lo squilibrio fisiologico indotto dagli agenti stressogeni che la risposta degli organismi ad esso. In tal senso si è sviluppata la scienza dei *biomarkers*, con lo scopo di mettere a punto dei parametri da utilizzare nella misurazione di variazioni biochimiche, cellulari e fisiologiche. Tali parametri dovrebbero essere in grado di fungere da indicatori di esposizione e/o di risposta ai numerosi fattori stressogeni, biotici ed abiotici (Vighi & Bacci, 1998).

La fagocitosi costituisce il principale evento immunitario nei molluschi bivalvi marini e gli emociti rappresentano le cellule deputate al riconoscimento, adesione, inglobamento, degradazione ed eliminazione del not-self (Bachère *et al.*, 1995). L'influenza negativa dello stress sul sistema immunitario dei molluschi bivalvi marini ed in particolare sulla fagocitosi emocitaria risulta ben documentata in bibliografia.

Le ripercussioni negative dello stress sul sistema immunitario dei molluschi bivalvi possono costituire quindi un importante fattore causale non solo durante episodi di mortalità naturale, ma anche in corso di eventi epidemici di natura infettiva. L'incidenza negativa delle variazioni termiche e saline sulla risposta immunitaria degli emociti risulta attribuibile ad una riduzione delle loro capacità fagocitarie in termini di aumento del TTS (Time to Hemocyte Spreading), ovvero gli emociti impiegano più tempo per assumere una conformazione ameboide, indispensabile per l'espletamento delle loro funzioni (Fisher, 1988).

Gli studi maturati finora sulla modulazione della fagocitosi emocitaria durante condizioni di stress sono stati effettuati su monostrati cellulari mediante microscopia ottica. I principali parametri indagati hanno fatto riferimento fondamentalmente alla valutazione delle attitudini locomotorie, pseudopodiche e fagocitarie degli emociti, misurate arbitrariamente come TTS, indice di adesività e di inglobamento di materiale not-self. A tali parametri valutabili microscopicamente e di natura prettamente morfologica si sono affiancate delle metodologie di studio a carattere più funzionale, come la misurazione della sintesi di radicali liberi dell'ossigeno (ROS).

Alcuni autori hanno evidenziato nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) come lo stress chimico attribuibile all'inquinamento possa influire negativamente sulla produzione dei ROS (Pipe *et al.*, 1995), così come lo stress meccanico nelle ostriche (*Crassostrea gigas*) diminuisca l'intensità del "burst respiratorio" in associazione ad altri parametri di funzionalità emocitaria (Lacoste *et al.*, 2002).

Nei mitili, come in altri molluschi bivalvi, gli emociti presentano una morfologia tendenzialmente rotondeggiante durante uno stato di inattività immunitaria. La trasformazione in cellule ameboidi mediante la produzione di pseudopodi permette loro di aumentare la capacità locomotoria e di subire quindi un'attivazione morfo-funzionale idonea all'espletamento delle funzioni fagocitarie (Carballal *et al.*, 1997a).

Nei mitili sono stati effettuati finora solo pochi studi inerenti le modificazioni indotte dallo stress sulle proprietà morfo-funzionali degli emociti e sulle eventuali ripercussioni ad esse legate, in termini di maggiore suscettibilità agli agenti patogeni. In particolare, gli studi condotti sugli effetti dello stress fisico hanno dimostrato come le alte e le basse temperature ambientali, e l'incremento della salinità influiscano negativamente sulla capacità degli emociti ad assumere l'aspetto ameboide, ad aumentare le loro capacità locomotorie, a produrre pseudopodi e, di conseguenza, a fagocitare (Carballal *et al.*, 1997b).

Le Heat Shock Proteins (HSPs) fungono da chaperoni molecolari della cellula, favorendo il corretto ripiegamento ed assemblaggio delle catene polipeptidiche nascenti, proteggendole

dai molteplici fattori denaturanti, restituendo loro la conformazione nativa in seguito a denaturazione ed infine favorendo il trasporto delle proteine danneggiate irreversibilmente verso i lisosomi (Feder & Hofmann, 1999). In virtù di tale funzione regolatoria sull'omeostasi proteica, le HSPs hanno trovato ampio utilizzo quali *biomarkers* di stress fisico, chimico, biologico e fisiologico (Chapple *et al.*, 1998; Zugel & Kaufmann, 1999; Ackerman *et al.*, 2000; Bierkens, 2000). Nei mitili, il ruolo protettivo dell'HSP 70 risulta ben documentato nell'ambito dei processi di adattamento o di resistenza alle alte temperature, sia di campo che sperimentali (Minier *et al.*, 2000; Buckley *et al.*, 2001).

Lo scopo della presente sperimentazione è stato quello di valutare gli effetti dello stress termico e dell'ipossia sulle variazioni morfologiche degli emociti di mitili attraverso un lettore di vitalità cellulare.

Se le variazioni morfologiche degli emociti rappresentano la conseguenza dell'esposizione allo stress, l'espressione di HSP 70 costituisce un processo di risposta degli organismi agli eventi stressogeni. Di conseguenza, nel lavoro effettuato si è cercato di valutare il ruolo di tali parametri quali indicatori di esposizione e di risposta allo stress, al fine di trovare una loro applicabilità sia in condizioni sperimentali che di campo.

MATERIALI E METODI

Campioni di mitili (*M. galloprovincialis*, 40-50 mm di lunghezza) sono stati stabulati per 24 ore in un sistema di acquari a circuito chiuso a temperatura (18° C) e salinità (32 ppt) costanti. Lo stress termico è avvenuto in acquari preventivamente isolati dal sistema e gli organismi sono stati esposti alla temperatura subletale di 40° C per un'ora (gruppo A) e per 4 ore (gruppo B), per poi essere riportati alla temperatura di origine. I prelievi di emolinfa sono stati eseguiti su 5 individui diversi per ciascun gruppo, sia al termine dello stress (T₀), che durante il recupero alla temperatura di controllo dopo 2 ore (T₂), 6 ore (T₆), 12 ore (T₁₂) e 24 ore (T₂₄).

Un terzo gruppo di mitili (gruppo C), invece, è stato mantenuto in assenza di acqua a temperatura di refrigerazione per 24 ore e l'emolinfa è stata prelevata da 5 soggetti diversi durante l'intera durata dell'esperimento, ovvero dopo 3 ore (T₃), 6 ore (T₆), 12 ore (T₁₂), e 24 ore (T₂₄).

I gruppi controllo sono risultati costituiti esclusivamente da mitili stabulati a 18° C per l'intero corso della sperimentazione.

Il prelievo dell'emolinfa è stato effettuato dal muscolo adduttore posteriore ed opportunamente diluito in soluzione modificata di Alsever (MAS), onde evitare l'aggregazione emocitaria (Noël *et al.*, 1993).

La valutazione dei parametri emocitari, quali concentrazione, vitalità, diametro e circolarità è avvenuta in maniera esclusivamente strumentale su ciascun prelievo di emolinfa mediante un analizzatore di immagini (Vi-Cell, Beckman). Lo strumento è stato preventivamente tarato onde permettere la lettura delle caratteristiche emocitarie e, per ciascun campione, ha fornito 100 immagini ed i dati inerenti le proprietà morfologiche degli emociti in esse contenute.

In particolare, lo strumento misura il parametro circolarità calcolando il rapporto tra il diametro minore e maggiore degli emociti. Di conseguenza, tale valore oscilla tra 0 ed 1 e lo spostamento verso 0 indica l'aumento di irregolarità morfologica cellulare, mentre lo spostamento verso 1 è significativo di un aumento della sfericità degli emociti.

Nell'ambito dello studio sulle variazioni morfologiche indotte dallo stress, si è proceduto ad effettuare anche una prova *in vitro* di stimolazione emocitaria con batteri, utilizzando un ceppo di *Vibrio alginolyticus* isolato ed identificato in laboratorio. Un'aliquota della

sospensione batterica, diluita in MAS alla concentrazione di 1×10^8 UFC, è stata posta in contatto con un pool di emolinfa prelevata da 5 soggetti del gruppo controllo e da altrettanti soggetti del gruppo A al termine dello stress termico (T_0). Dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente ed in camera umida, si è proceduto alla lettura dei parametri emocitari.

I valori emocitari misurati con il Vi-Cell ed espressi come medie e deviazioni standard sono stati elaborati mediante applicazione dell'analisi della varianza a una o due vie e del confronto multiplo post hoc T3 di Dunnett. L'elaborazione è stata svolta attraverso l'utilizzo del software SPSS 11.0. Sui dati relativi alla prova di stimolazione batterica è stata applicata la cluster analisi e per la definizione dei clusters ci si è avvalsi del metodo K means.

Le diverse tipologie di esperimenti sono state condotte tre volte, sia per quanto riguarda lo stress termico che le prove di stimolazione fagocitaria.

Per quanto concerne la valutazione delle HSP 70, il mantello è stato prelevato nei gruppi A e B al termine dello stress (T_0) e durante il recupero (T_2 , T_{24}), mentre il prelievo mantellare dei soggetti del gruppo C è avvenuto nei tempi T_3 e T_{24} . Il tessuto è stato posto in tampone di lisi (Tris-HCl, Nonidet P-40) contenente inibitori delle proteasi ed omogeneizzato. Il surnatante ottenuto dopo centrifugazione a $10.000 \times g$ è stato dosato mediante saggio Bradford, posto in tampone di corsa secondo Laemmli, e sottoposto ad elettroforesi discontinua su gel di acrilammide al 10%. Su ciascuna linea di corsa è stata caricata la medesima quantità di proteina. Successivamente, il gel è stato trasferito in tampone Towbin su membrane PVDF mediante metodo semy-dry. La membrana, posta in soluzione di bloccaggio al 5% di latte in polvere, è stata sottoposta a tre lavaggi in TBS-T, incubata con l'anticorpo primario anti-HSP 70 (Sigma, clone BRM-22), lavata ulteriormente, incubata con l'anticorpo secondario anti-topo coniugato con perossidasi ed infine sviluppata con diaminobenzidina.

RISULTATI

Gruppo A -

Al termine dello stress (T_0) e durante le prime ore di recupero (T_2), è stato possibile evidenziare un significativo aumento del diametro medio ($11,85 \mu\text{m}$ e $11,86 \mu\text{m}$, Dunnett T3 test $p \leq 0,002$) in riferimento al controllo ($11,37 \mu\text{m}$). Tali incrementi inoltre sono risultati essere omogenei tra loro (Dunnett T3 test n.s.). Durante gli altri tempi di recupero (T_6 , T_{12} , T_{24}) i valori hanno subito un decremento significativo ($11,03 \mu\text{m}$, $11,00 \mu\text{m}$, $10,83 \mu\text{m}$, Dunnett T3 test $p < 0,001$) e, in particolare, il diametro a T_{24} è risultato essere inferiore ai valori di T_6 e T_{12} (Dunnett T3 test $p < 0,002$), che tra loro si sono mostrati omogenei (Dunnett T3 test n.s.) (fig. 1).

In riferimento al controllo (0,72), il valore di circolarità ha subito un incremento significativo al termine dello stress (T_0) e durante il recupero (T_2) (0,84 e 0,80, Dunnett T3 test $p < 0,001$), ed il valore a T_2 è risultato essere anche significativamente inferiore al precedente (Dunnett T3 test $p < 0,001$). La circolarità è ritornata ai valori di controllo al tempo T_6 (0,72, Dunnett T3 test n.s.), mentre a T_{12} e T_{24} (0,77 and 0,76) è stato riscontrato un ulteriore aumento, ma non significativo (Dunnett T3 test n.s.) (fig. 2).

Gruppo B -

Al termine dello stress (T_0) e durante le prime ore di recupero (T_2 , T_6), l'aumento del diametro medio, riferito al controllo ($11,37 \mu\text{m}$), è risultato significativo ($11,69 \mu\text{m}$, $11,67 \mu\text{m}$, $11,68 \mu\text{m}$, Dunnett T3 test $p < 0,001$) ed i tre valori si sono dimostrati omogenei tra loro (Dunnett T3 test n.s.). Durante i tempi T_{12} e T_{24} , invece, è stato riscontrato un significativo decremento ($10,62 \mu\text{m}$, $10,93 \mu\text{m}$, Dunnett T3 test $p < 0,001$) (fig. 1).

In riferimento al controllo (0,72), la circolarità ha subito un aumento significativo al termine dello stress (T₀) e durante il recupero (T₂, T₆) (0,82, 0,80, 0,80, Dunnett T3 test p<0,001) con valori omogenei tra loro (Dunnett T3 n.s.). I valori sono tornati ai livelli del controllo ai tempi T₁₂ (0,73) e T₂₄ (0,76) (Dunnett T3 test n.s.) (fig. 2).

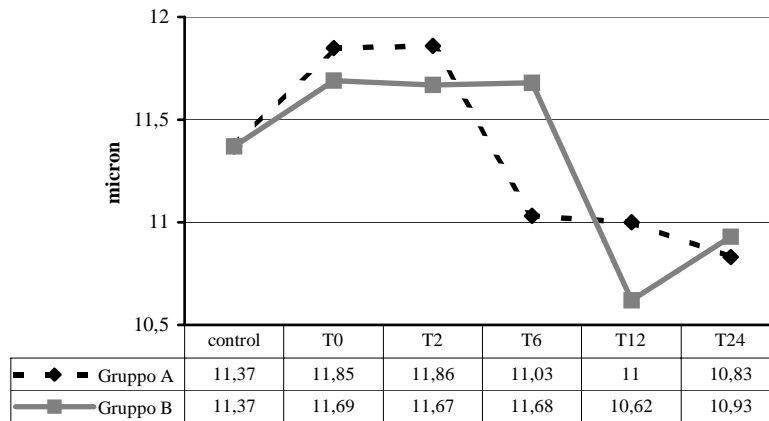


Figura 1 - Andamento del diametro medio emocitario nei differenti gruppi di mitili stressati termicamente.
 Figure 1 – Modulation of the hemocyte diameter mean in the different groups of the heat stressed mussels.

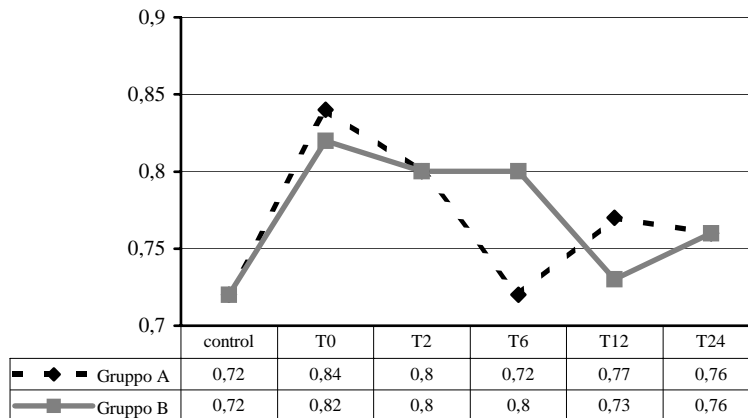


Figura 2 - Andamento della circolarità media emocitaria nei differenti gruppi di mitili stressati termicamente.
 Figure 2 – Modulation of the hemocyte circularity mean in the different groups of the heat stressed mussels.

Gruppo C -

Gli aumenti significativi del diametro sono stati osservati a T₁₂ e T₂₄ (11,65 µm, 11,78 µm, Dunnett T3 test p<0,001), in riferimento al controllo (11,37 µm), con il valore a T₂₄ significativamente superiore di T₁₂ (Dunnett T3 test p<0,001). Gli altri valori (T₃, T₆), invece, si sono mostrati omogenei con il controllo (11,42 µm, 11,48 µm, Dunnett T3 n.s.) (fig. 3).

In riferimento al controllo (0,72), la circolarità è aumentata significativamente a T₃ e T₆ (0,77, 0,77, Dunnett T3 test p=0,001) con valori omogenei (Dunnett T3 n.s.). Tuttavia, i valori più alti sono stati osservati a T₁₂ e T₂₄ (0,80, 0,83, Dunnett T3 test p<0,001) (fig. 4).

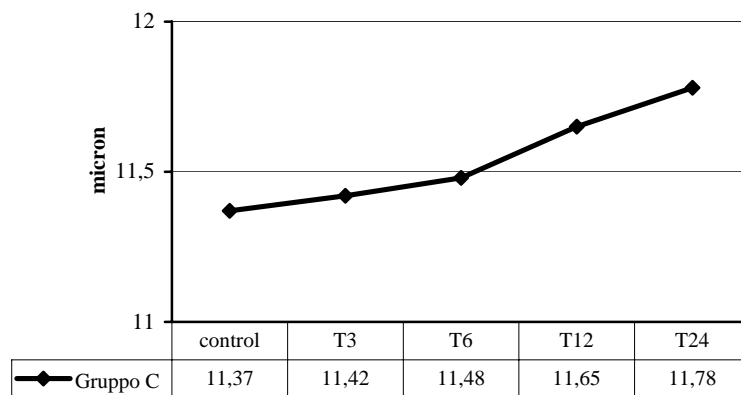


Figura 3 - Andamento del diametro medio emocitario nei mitili esposti all'aria a temperatura di refrigerazione.
 Figure 3 Modulation of the hemocyte diameter mean in the mussel group maintained out of the water at cooling temperature.

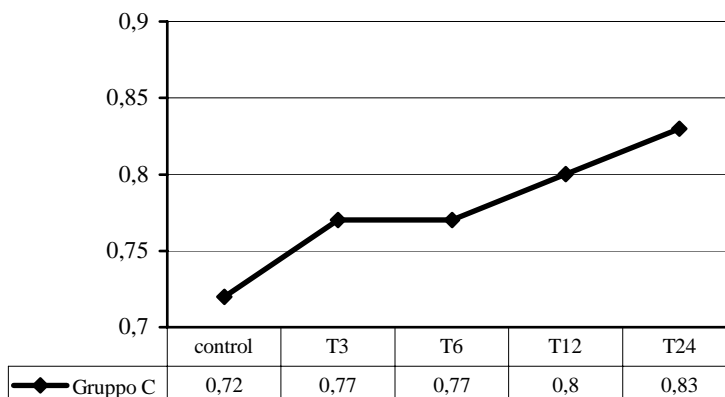


Figura 4 - Andamento della circolarità media emocitaria nei mitili esposti all'aria a temperatura di refrigerazione.
 Figure 4 - Modulation of the hemocyte circularity mean in the mussel group maintained at cooling temperature.

Modificazioni morfologiche indotte dalla stimolazione batterica *in vitro* -

Il pool emolinfatico appartenente al gruppo controllo e stimolato con *Vibrio* sp. ha mostrato una significativa (Dunnett T3 test $p < 0,001$) riduzione del diametro e della circolarità media in riferimento al controllo non incubato con i batteri. Gli emociti prelevati dai mitili stressati e stimolati con i batteri, invece, non hanno mostrato alcuna significativa riduzione dei parametri nei confronti del rispettivo controllo, costituito da un'aliquota del medesimo pool non incubato con i batteri (fig. 5, 6).

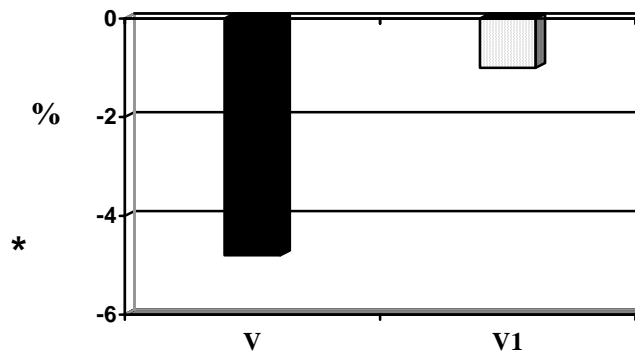


Figura 5 - Differenza percentuale del diametro di emociti incubati con *Vibrio* sp. nei confronti di cellule non stimolate (V) e differenza percentuale di emociti stressati termicamente ed incubati con *Vibrio* sp. nei confronti di cellule stressate, ma non stimolate (V1) *Dunnett T3 test $p < 0,001$ vs controllo.

Figure 5 - Diameter percentage variation of the hemocytes incubated with *Vibrio* sp. vs not stimulated cells (V) and variation of the stressed hemocytes incubated with *Vibrio* sp. vs stressed but not stimulated cells (V1) *Dunnett T3 test $p < 0,001$ vs control.

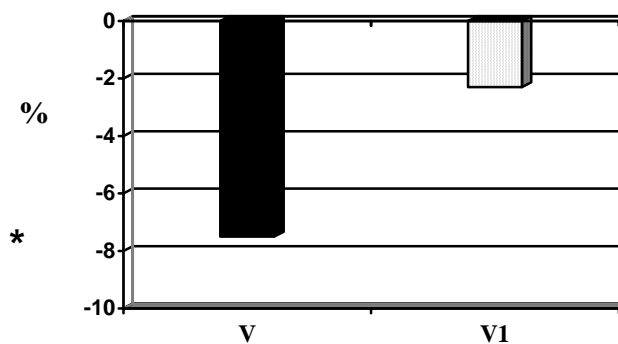


Figura 6 - Differenza percentuale della circolarità di emociti incubati con *Vibrio* sp. nei confronti di cellule non stimolate (V) e differenza percentuale di emociti stressati termicamente ed incubati con *Vibrio* sp. nei confronti di cellule stressate, ma non stimolate (V1) *Dunnett T3 test $p < 0,001$ vs controllo.

Figure 6 - Circularity percentage variation of the hemocytes incubated with *Vibrio* sp. vs not stimulated cells (V) and percentage variation of the stressed hemocytes incubated with *Vibrio* sp. vs stressed but not stimulated cells (V1) *Dunnett T3 test $p < 0,001$ vs control.

La cluster analisi ha indicato la presenza di quattro gruppi nella distribuzione naturale dei diametri emocitari (7,1-9,3 μm , 9,5-11,5 μm , 11,7-13,9 μm , 14,1-17,9 μm) (fig. 7) e la stimolazione con *Vibrio* sp. ha determinato soprattutto una variazione della regione 7,1-8,2 μm , mentre lo stress termico ha indotto modificazioni soprattutto tra 10,5 μm e 12,46 μm .

Tre gruppi invece sono stati individuati dall'analisi dei cluster nell'ambito della distribuzione naturale della circolarità (0,005-0,505, 0,515-0,765, 0,775-0,995) (fig. 8) e le variazioni osservate nella regione 0,676-0,87 sembrerebbero essere dipendenti dalla stimolazione batterica, mentre la regione con circolarità superiore a 0,9 sembra essere specificatamente dipendente dallo stress.

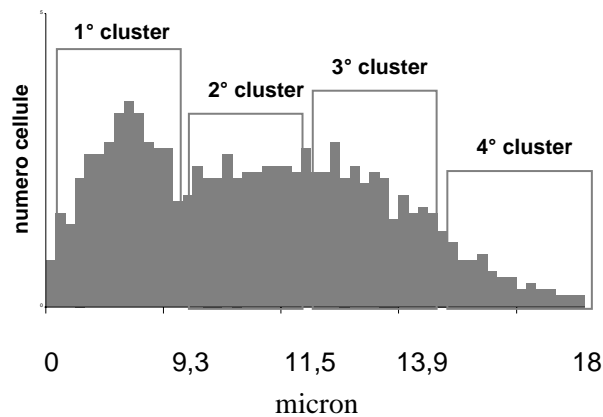


Figura 7 - Cluster analisi della distribuzione naturale del diametro emocitaria.
Figure 7 - Cluster analysis of the normal hemocyte diameter distribution.

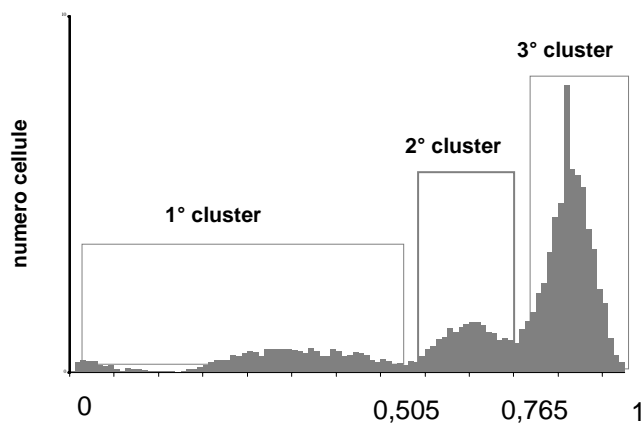


Figura 8 - Cluster analisi della distribuzione naturale della circolarità emocitaria.
Figure 8 - Cluster analysis of the normal hemocyte circularity distribution.

HSP 70 -

Le analisi condotte in western blotting sul mantello hanno permesso di individuare nei controlli la presenza di una banda a 78 kDa. Lo stress termico ha determinato l'aumento dell'intensità di questa banda e la comparsa di una banda a 72 kDa. Nel gruppo meno stressato (A) è stato possibile evidenziare l'incremento delle due bande soprattutto a distanza di 24 ore dal termine dello stress (fig. 9) mentre nel gruppo esposto per tempi maggiori (B) tale incremento si è reso visibile già a distanza di 2 ore, per raggiungere la massima intensità dopo 24 ore (fig. 10).

Al contrario, l'esposizione in assenza di acqua a temperatura di refrigerazione ha comportato una riduzione dell'espressione delle due bande in maniera tempo-dipendente (fig. 11).

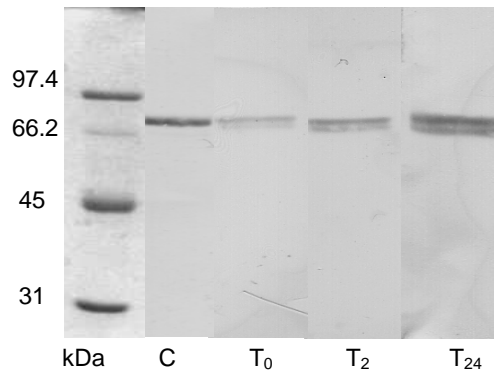


Figura 9 - Variazioni dell'espressione mantellare di HSP 78 e 72 al termine dello stress (T_0) e durante il recupero (T_2 , T_{24}) in mitili stressati termicamente (gruppo A). C: campione non stressato.

Figure 9 - Mantle HSP 78 and 72 variations in the heat stressed mussels (group A) after the stress (T_0) and during the recovery (T_2 , T_{24}). C: not-stressed sample.

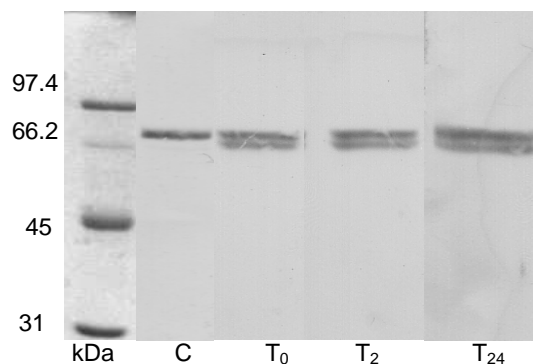


Figura 10 - Variazioni dell'espressione mantellare di HSP 78 e 72 al termine dello stress (T_0) e durante il recupero (T_2 , T_{24}) in mitili stressati termicamente (gruppo B). C: campione non stressato.

Figure 10 - Mantle HSP 78 and 72 variations in the heat stressed mussels (group B) after the stress (T_0) and during the recovery (T_2 , T_{24}). C: not-stressed sample.

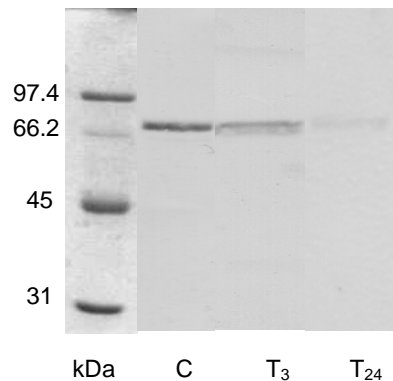


Figura 11 - Riduzione dell'espressione mantellare di HSP 70 in mitili esposti all'aria in condizioni di refrigerazione (gruppo C) durante lo stress (T_3 e T_{24}). C: campione non stressato.
 Figure 11 - Mantle HSP 70 decrease in the mussels maintained out of the water at cooling temperature (group C) during the stress (T_3 e T_{24}). C: not-stressed sample.

DISCUSSIONE

Lo stress esercita una profonda influenza sul sistema immunitario dei molluschi e la fagocitosi, in particolare, può subire l'impatto negativo dei differenti agenti stressogeni tale da comportare effetti deleteri sulle produzioni zootecniche o sulle risorse alieutiche, in termini di minore adattabilità ambientale e di maggiore suscettibilità agli agenti patogeni.

Le condizioni ipossiche possono interessare frequentemente i sedimenti marini e, in associazione allo stress meccanico esercitato dalle draghe idrauliche durante la pesca, costituiscono dei fattori stressogeni molto importanti per il sistema immunitario cellulare delle vongole (*Chamelea gallina*), come dimostrato sperimentalmente dalla riduzione del valore di ematocrito e delle capacità locomotorie e fagocitarie degli emociti in soggetti sottoposti a tali tipologie di stress. L'impatto negativo dello stress meccanico sulla riduzione del valore di ematocrito e delle capacità locomotorie e fagocitarie degli emociti è stato evidenziato sperimentalmente e in condizioni di campo anche in ostriche (*Crassostrea gigas*), mentre gli aumenti di temperatura e salinità vengono ritenuti responsabili dell'incremento dei tassi di mortalità nella *C. virginica* durante le infestazioni estive da *Perkinsus marinus*, riconducibili fondamentalmente all'influenza che i parametri ambientali esercitano a carico delle risposte immunitarie (Oliver *et al.*, 1998). Ad esempio, risulta ben documentato come le variazioni di salinità influenzino l'attitudine fagocitaria in emociti di *Ruditapes philippinarum* nei confronti di agenti patogeni quali il *Vibrio tapetis*, rendendo gli organismi maggiormente suscettibili o resistenti alle infestazioni (Lacoste *et al.*, 2002; Pampanin *et al.*, 2002; Ballarin *et al.*, 2003; Reid *et al.*, 2003).

L'attitudine degli emociti ad assumere una conformazione ameboide è molto importante per l'espletamento delle funzioni fagocitarie poiché permette alla cellula di acquisire proprietà locomotorie e, quindi, di aderire al materiale identificato come not-self e di inglobarlo. La conformazione ameboide degli emociti necessita di un'attivazione del citoscheletro e di modificazioni nella fluidità della membrana con formazione di pseudopodi. La perfetta funzionalità emocitaria, quindi, risulta strettamente dipendente dalla

trasformazione di cellule tendenzialmente rotonde in cellule ameboidi a seguito dello stimolo fagocitario (Fisher, 1988).

I fattori stressogeni possono inibire le proprietà ameboidi e locomotorie degli emociti, e quindi la loro attitudine fagocitaria, sia comportando un deficit energetico cellulare, visto che il riarrangiamento del citoscheletro durante l'emissione di pseudopodi richiede notevole disponibilità di ATP, sia inducendo un processo degenerativo a carico delle strutture citoscheletriche. Il citoscheletro costituisce un target intracellulare di molti agenti stressogeni, quali ad esempio i metalli pesanti. Infatti, l'esposizione *in vivo* al rame è in grado di determinare negli emociti di mitili una disorganizzazione del citoscheletro con scomparsa dei filamenti di actina (Fagotti *et al.*, 1996).

Nel seguente studio, i parametri circolarità e diametro, misurati strumentalmente mediante lettore di vitalità cellulare, sono stati indagati negli emociti di mitili al fine di valutarne il potenziale ruolo come indicatori di esposizione a fattori stressogeni.

Lo stress termico applicato *in vivo* ha determinato un aumento della circolarità mentre la stimolazione *in vitro* con batteri ha ridotto i valori di questo parametro. In altri termini, il fattore stressogeno ha "inattivato" gli emociti conferendo loro un aspetto maggiormente rotondo mentre lo stimolo fagocitario ha "attivato" le cellule inducendone una conformazione ameboide. A testimonianza del duplice significato del parametro circolarità, in termini di attivazione ed inattivazione immunologica, gli emociti appartenenti ad organismi stressati ed, in quanto tali, caratterizzati da una conformazione rotondeggiante, hanno mantenuto la loro rotondità anche a seguito della stimolazione batterica, confermando così gli effetti inibitori dello stress sulla fagocitosi emocitaria o, più esattamente, sull'attività pseudopodica e locomotoria.

Le variazioni di circolarità osservate nei mitili stressati termicamente rappresentano anche un possibile modello di studio per la comprensione delle cinetiche di risposta allo stress: la risposta iniziale (T_0) non sembra essere legata alla durata dello stress (0,84 per il gruppo A, 0,82 per il gruppo B, Dunnett T3 test n.s.) mentre la capacità di recuperare completamente le condizioni omeostatiche risulta essere dipendente dalla durata dello stesso. Infatti, i mitili del gruppo A hanno raggiunto valori di circolarità sovrapponibili al controllo dopo 6 ore dal termine dello stress, mentre i soggetti del gruppo B, esposti al calore per tempi maggiori, hanno mostrato un ritorno della circolarità ai livelli del controllo solo dopo 12 ore di recupero.

Il mantenimento dei mitili fuori dall'acqua a temperatura di refrigerazione rappresenta una tipologia di stress meno intensa del calore, come dimostrato dal lento incremento della circolarità, ma più frequente nei molluschi bivalvi, soprattutto nelle ultime fasi della filiera commerciale. Gli incrementi significativi della circolarità sono stati osservati in funzione del tempo di esposizione, raggiungendo il massimo livello dopo 24 ore dall'inizio dell'esperimento.

In considerazione dei dati ottenuti, il parametro circolarità potrebbe essere utilizzato come un utile indicatore morfologico, nonché precoce, della condizione di funzionalità del sistema immunitario cellulare, non solo dei mitili, ma dei molluschi bivalvi in genere.

L'aumento delle dimensioni emocitarie durante lo stress termico ha mostrato un andamento sovrapponibile all'incremento della circolarità. Le modificazioni morfologiche indotte dallo stress, quindi, sembrerebbero essere legate all'inibizione del citoscheletro in seguito a deplezione energetica della cellula oppure ad effetto degenerativo sui filamenti di actina (Fagotti *et al.*, 1996). Ulteriori studi dovranno essere effettuati per meglio comprendere gli aspetti biochimici delle modificazioni morfologiche osservate e delle implicazioni che esse comportano sulla funzionalità fagocitaria. Infatti, l'inibizione della motilità citoscheletrica comporta una mancata attivazione pseudopodica degli emociti, normalmente indotta da materiale not-self, con ripercussioni negative sul sistema

immunitario in termini di maggiore suscettibilità nei confronti di agenti patogeni (Coquet *et al.*, 2003).

In considerazione, quindi, del ruolo predominante dell'immunità cellulare nei molluschi e della sua suscettibilità ai diversi fattori ambientali e antropici che ne influenzano l'efficienza, l'utilizzo di parametri morfologici precoci quali la circolarità ed il diametro può aprire nuove strade metodologiche sia in ricerche di base volte alla conoscenza intrinseca dei processi, sia in studi applicati inerenti la valutazione della salute ambientale, della qualità alimentare e, in termini più generali, del benessere animale.

La risposta degli organismi al calore è emblematica di come l'espressione dell'HSP 70 possa variare in funzione della durata dello stress e dei tempi di recupero. I soggetti del gruppo A, infatti, mostrano una riduzione dell'espressione di HSP 70 al termine dello stress e dopo due ore di recupero, probabilmente da attribuire ad una marcata depressione della sintesi proteica cellulare (Chapple *et al.*, 1997). A distanza di 24 ore, però, si osserva un aumento nell'espressione di entrambe le isoforme, soprattutto di quella a minor peso molecolare. L'HSP 78 infatti viene ritenuta un'isoforma costitutiva mentre l'HSP 72 sembrerebbe costituire l'isoforma inducibile (Minier *et al.*, 2000; Porte *et al.*, 2001). La sintesi di HSP 70 mantellare risulta tardiva nei confronti della risposta emocitaria, in quanto la circolarità subisce le variazioni più importanti nelle prime 6 ore di recupero, mentre l'induzione di questa proteina raggiunge il massimo livello a 24 ore, quando la circolarità è tornata a valori di controllo. Nei soggetti meno stressati, quindi, la circolarità costituisce un parametro morfologico precoce di stress, mentre l'espressione di HSP 70 rappresenta un parametro biochimico più tardivo. I soggetti del gruppo B, invece, mostrano alti livelli di espressione delle due isoforme al termine dello stress e tale incremento raggiunge il suo apice dopo 24 ore dal termine dello stesso. Nel gruppo B, quindi, l'induzione dell'HSP 70 segue di pari passo l'aumento della circolarità emocitaria, testimoniando probabilmente uno stato di maggiore gravità degli organismi. Comunque sia, dopo 24 ore, l'induzione di HSP 70 rimane, anche in questo gruppo, l'unico segno evidente di uno stress subito, confermando il ruolo tardivo di tale proteina quale indicatore di stress.

Al contrario, il mantenimento in assenza di acqua e la refrigerazione hanno determinato una riduzione dell'espressione di HSP 70 in maniera proporzionale alla durata dello stress. Di conseguenza, il parametro HSP 70 non sembrerebbe particolarmente idoneo nella valutazione di tale tipologia di stress.

A possibile conferma di quanto rilevato, le condizioni ipossiche non inducono l'aumento di sintesi di HSP 70 in esemplari di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), nonostante alcuni autori abbiano dimostrato un ruolo importante di questa classe proteica nel tessuto cardiaco dei mammiferi durante eventi ischemici (Currie & Tufts, 1997; Gamperl *et al.*, 1998), mentre l'esposizione a temperature di refrigerazione, seppure poco considerata in studi inerenti l'espressione di HSP 70, può comportare una riduzione di HSP 82 in anfibi mantenuti in condizioni di refrigerazione (Dunlap & Matsumura, 1997).

Quindi, se le alterazioni morfologiche emocitarie rappresentano indicatori precoci di esposizione allo stress, la sintesi di HSP 70 costituisce un indicatore di risposta biochimico e tardivo, sebbene l'induzione sia stata riscontrata esclusivamente negli organismi stressati termicamente.

In conclusione, le variazioni di circolarità emocitaria e l'espressione mantellare di HSP 70 possono costituire dei validi parametri, morfologici e biochimici, precoci e tardivi, di esposizione e di risposta, rispettivamente, da utilizzare in maniera integrata nei processi di valutazione della salute ambientale e del benessere animale, dall'allevamento o dai banchi naturali lungo l'intera filiera commerciale. Inoltre, l'utilizzo di contatori cellulari nella misurazione dei parametri emocitari sembra costituire, nei confronti delle metodiche microscopiche classiche, una tecnica più precisa e rapida, essendo esclusivamente

strumentale e anche più realistica, valutando cellule in sospensione e non adese. Tale tecnologia, infine, risulta più standardizzabile in termini tecnici, di interpretazione e confronto dei dati, fornendo così le basi strumentali per una valutazione qualitativa e quantitativa del benessere del mollusco o più generalmente di un organismo.

Ulteriori studi dovranno in tal senso essere affrontati per stabilire i valori base di riferimento per le singole specie di molluschi così come la possibile applicabilità di tale metodica anche in soggetti tassonomicamente superiori quali i vertebrati.

RINGRAZIAMENTI

Ricerca finanziata con il V piano triennale della Pesca e dell'Acquacoltura del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali

BIBLIOGRAFIA

Ackerman P.A., Forsyth R.B., Mazur C.F. & Iwama G.K. (2000). Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. *Fish Physiol. Biochem.*, 23: 327-336.

Bachère E., Miahle E., Noel D., Boulo V., Morvan A. & Rodriguez J. (1995). Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture*, 132: 17-32.

Ballarin L., Pampanin D.M. & Marin M.G. (2003). Mechanical disturbance affects hemocyte functionality in the venus clam *Chamelea gallina*. *Com. Biochem. Physiol., part A*, 136: 631-640.

Bierkens J.G.E.A. (2000). Applications and pitfalls of stress proteins in biomonitoring. *Toxicology*, 153: 61-72.

Buckley B.A., Owen M.E. & Hofmann G.E. (2001). Adjusting the thermostat: The threshold induction temperature for the heat shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. *J. Experimen. Biol.*, 204: 3571-3579.

Carballal M.J., Lopez C., Azevedo C. & Villalba A. (1997a). Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.*, 29: 127-135.

Carballal M.J., Lopez C., Azevedo C. & Villalba A. (1997b). In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 403-416.

Chapple J.P., Smerdon G.R., Berry R.G. & Hawkins A.J.S. (1998). Seasonal changes in stress-70 protein levels reflect thermal tolerance in the marine bivalve *Mytilus edulis*. *J. Experimen. Marine Biol. Ecol.*, 229: 53-68.

Chapple J.P., Smerdon G.R. & Hawkins A.J.S. (1997). Stress-70 protein induction in *Mytilus edulis*: Tissue-specific responses to elevated temperature reflect relative vulnerability and physiological function. *J. Experimen. Marine Biol. Ecol.*, 217: 225-235.

Coquet G., Soudant P., Lambert C., Nicolas J.-L. & Paillard C. (2003). Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.*, 57: 109-116.

Currie S. & Tufts B. (1997). Synthesis of stress protein 70 (HSP 70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *J. Experimen. Biol.*, 200: 607-614.

- Dunlap D.Y. & Matsumura F. (1997). Development of broad spectrum antibodies to heat shock protein 70 as biomarkers for detection of multiple stress by pollutants and environmental factors. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 37: 238-244.
- Fagotti A., Di Rosa I., Simoncelli F., Pipe R.K., Panara F. & Pascolini R. (1996). The effects of copper on actin and fibronectin organisation in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. *Developmen. Compar. Immunol.*, 20, 6: 383-391.
- Feder M.E. & Hofmann G.E. (1999). Heat Shock Proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Rev. Physiol.*, 61: 243-282.
- Fisher W.S. (1988). Environmental influence on bivalve hemocyte function. In: *Disease processes in marine bivalve molluscs*. Fisher W.S. ed., American Fisheries Society Special publication 18, Bethesda, Maryland: 225-237.
- Gamperl A.K., Vijayan M.M., Pereira C. & Farrell A.P. (1998). Receptor and stress protein 70 expression in hypoxic myocardium of rainbow trout and chinook salmon. *Am. J. Physiol.*, 274: 428-436.
- Lacoste A., Malham S.K., Gèlèbart F., Cueff A. & Poulet S.A. (2002). Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmen. Compar. Immunol.*, 26: 1-9.
- Minier C., Borghi V., Moore M.N. & Porte C. (2000). Seasonal variation of MXR and stress protein in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 50: 167-176.
- Noël D., Bachère E. & Mialhe E. (1993). Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Developmen. Compar. Immunol.*, 17: 483-493.
- Oliver L.M., Fisher W.S., Ford S.E., Ragone Calvo L.M., Burreson E.M., Sutton E.B. & Gandy J. (1998). *Perkinsus marinus* tissue distribution and seasonal variation in oysters *Crassostrea virginica* from Florida, Virginia and New York. *Dis. Aquat. Org.*, 34: 51-61.
- Pampanin D.M., Ballarin L., Carotenuto L. & Marin M.G. (2002). Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* hemocytes: effects on haematocrit, adhesion, phagocytosis, and enzyme contents. *Compar. Biochem. Physiol., part A*, 131: 605-614.
- Pipe R.K., Coles J.A., Thomas M.E., Fossato V.U. & Pulsford A.L. (1995). Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice lagoon. *Aquat. Toxicol.*, 32: 59-73.
- Porte C., Biosca X., Solè M. & Albaigès J. (2001). The integrated use of chemical analysis, cytochrome P-450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). *Environ. Pollution*, 112: 261-268.
- Reid H.I., Soudant P., Lambert C., Paillard C. & Birkbeck T.H. (2003). Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.*, 56: 249-258.
- Vighi M. & Bacci E. (1998). *Ecotossicologia. UTET, Torino*.
- Zugel U. & Kaufmann S.H.E. (1999). Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 1: 19-39.