

Studio comparato mediante citometria a flusso, microscopia confocale e fluorimetria in micrometodo della fagocitosi in emociti di *Mytilus galloprovincialis*

Investigation on hemocyte phagocytosis of Mytilus galloprovincialis through flow cytometry, micromethod fluorescence assay and confocal laser scanning microscopy

Francesco Mosca, Luisa Gioia, Valeria Narcisi,
Selene Marozzi, Pietro Giorgio Tiscar*

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

RIASSUNTO - L'impiego congiunto di moderne tecnologie, quali la citometria a flusso, la microscopia confocale e la fluorimetria in micrometodo è stato rivolto, per la prima volta, allo studio dei processi difensivi e della relativa componente cellulare nell'ambito degli invertebrati marini. Campioni di emolinfa di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) sono stati caratterizzati in citometria a flusso, individuando due principali sottopopolazioni emocitarie e le prove di stimolazione fagocitaria, condotte mediante cellule di lievito (Zymosan), hanno evidenziato come la popolazione più grande e granulosa mostrava il maggior incremento di fluorescenza, legato alla sintesi di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in grado di ossidare il tracciante fluorescente (1,2,3-diidrorodamina) impiegato nella sperimentazione. La fluorimetria in micrometodo ha confermato l'aumento di fluorescenza in emociti incubati con il medesimo tracciante e stimolati con lieviti, confermando inoltre la specificità della reazione nei confronti dei perossidi attraverso l'utilizzo di superossido dismutasi (SOD) ed inibitori dell'ossido nitrico sintetasi (L-NMMA). Gli studi in microscopia confocale, invece, hanno permesso di seguire nel tempo l'intero processo fagocitario distinguendone le differenti fasi, ovvero la produzione di ROS all'interno dei lisosomi, la formazione del fagosoma, la fusione fago-lisomiale e, infine, la risoluzione del processo. Gli studi effettuati su emolinfa di mitili confermano, quindi, la presenza di diverse popolazioni emocitarie e il ruolo fagocitario svolto da queste cellule in funzione di caratteri morfologici individuati in citometria a flusso. Il saggio in micrometodo, al contrario, non permette di distinguere morfologicamente le popolazioni emocitarie e di studiarne singolarmente le proprietà biologiche, tuttavia risulta particolarmente indicato nell'analisi contemporanea di più campioni e variabili, oppure quando si desidera ottenere andamenti temporali del processo studiato. L'impiego della microscopia confocale, invece, trova maggiore applicabilità nella valutazione qualitativa della fagocitosi, in quanto ne descrive microscopicamente le diverse fasi. In conclusione, le diverse tecnologie impiegate possono costituire metodiche innovative negli studi del sistema difensivo degli invertebrati marini, finalizzate sia a ricerche di base che applicative.

SUMMARY - *Flow cytometry, micromethod assay and confocal laser scanning microscopy have been applied in the study of the cellular defense system of mussel (Mytilus galloprovincialis), using yeast cells (zymosan) as phagocytosis stimuli and fluorescent probe, as 1,2,3-dihydrochlorodamine (DHR), for measuring the synthesis of the reactive oxygen species (ROS). The flow cytometry revealed the presence of two main hemocytes sub-populations in the mussel hemolymph, showing also the relation between hemocyte size, complexity and "respiratory burst" intensity. The micromethod assay demonstrated the oxidative activity of hemocytes during zymosan phagocytosis whereas the use of the SOD and L-NMMA increased the fluorescence, confirming the main role of the hydrogen peroxide in the DHR oxidation. In addition, the confocal microscopy permitted to evaluate the ROS synthesis inside the cellular organelles involved in the phagocytosis. In conclusion, these original techniques could represent useful tools for evaluating the cellular immune system of marine invertebrates, both in research approach and in applied studies.*

Key words: Mussel, *Mytilus galloprovincialis*, Hemocyte, Phagocytosis, Reactive Oxygen Species (ROS).

* 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

La fagocitosi costituisce il principale evento immunitario nei molluschi bivalvi marini e gli emociti rappresentano le cellule deputate ai processi di riconoscimento, adesione, inglobamento e degradazione del not-self (Bachère *et al.*, 1995).

Tali cellule sono state suddivise microscopicamente in granulociti e ialinociti. Gli ialinociti sono caratterizzati da un minore diametro, da una minore capacità di emettere pseudopodi, da un maggiore rapporto tra nucleo e citoplasma e infine dalla ridotta presenza di granuli citoplasmatici. Al contrario, i granulociti sono più grandi, hanno un abbondante citoplasma, emettono pseudopodi e contengono molti granuli citoplasmatici (Hine, 1999). Nel *Mytilus galloprovincialis* gli ialinociti si differenziano dai granulociti per un diametro medio minore (8,33 μm contro 10,95 μm), un nucleo più grande (5,05 μm contro 4,76 μm), un minore contenuto di granuli citoplasmatici e una minore capacità pseudopodica. I granulociti sono stati suddivisi in acidofili e basofili in funzione dell'affinità tintoriale dei loro granuli citoplasmatici (Carballal *et al.*, 1997a). Gli ialinociti, inoltre, costituiscono solamente il 15% circa della popolazione emocitaria totale mentre la restante quota è rappresentata per il 36% dai granulociti basofili e per il 48% dagli acidofili (Carballal *et al.*, 1998).

Gli studi effettuati in microscopia ottica con lo scopo di valutare la capacità fagocitaria degli emociti nei confronti di particelle di lievito hanno dimostrato negli ialinociti una scarsa abilità fagocitaria mentre i granulociti, in particolare gli acidofili, hanno mostrato la maggiore attitudine, correlabile morfologicamente alla maggiore grandezza e granulosità di tale tipologia cellulare (Carballal *et al.*, 1997b). La maggiore grandezza, granulosità e distribuzione degli acidofili è stata riscontrata anche nell'emolinfa di *M. edulis*, confermando, inoltre, la loro maggiore abilità fagocitaria (Friebel & Renwranz, 1995; Pipe *et al.*, 1997).

Gli studi morfologici degli emociti in citometria a flusso sono stati finora effettuati solo in poche specie di bivalvi marini, quali *Ostrea edulis* (Xue *et al.*, 2001), *Ruditapes philippinarum*, *Mercenaria mercenaria* e *Crassostrea virginica* (Allam *et al.*, 2002). Le uniche ricerche citofluorimetriche condotte sull'emolinfa di *M. galloprovincialis* hanno evidenziato la presenza di due principali popolazioni emocitarie (Ottaviani *et al.*, 1998; Barcia *et al.*, 1999). La citometria a flusso non permette soltanto studi morfologici delle cellule, ma consente anche di valutarne proprietà funzionali, come ad esempio l'attitudine fagocitaria. La degradazione emocitaria nei confronti del not-self avviene attraverso la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Il "burst respiratorio" emocitario è sovrapponibile a quanto osservato nei fagociti dei mammiferi (Adema *et al.*, 1991) e rappresenta un efficace sistema difensivo ossidante in ostriche, vongole e mitili (Roch, 1999; Anderson, 2001), evidenziabile mediante l'utilizzo di molecole in grado di emettere fluorescenza in seguito all'ossidazione operata dai ROS.

Gli studi effettuati in citometria a flusso sull'emolinfa di *C. gigas*, utilizzando lieviti come stimolo e 2',7'-diclorofluoresceina (DCFH) come tracciante fluorescente, hanno mostrato un aumento di fluorescenza soprattutto nei granulociti, testimoniandone la maggiore attività ossidante in termini di sintesi dei ROS (Lambert *et al.*, 2003). Per quanto riguarda altre specie di bivalvi marini, esistono ancora pochi studi citofluorimetrici sulla valutazione del "burst respiratorio" fagocitario. In particolare, la citometria a flusso è stata impiegata nella valutazione dei processi fagocitari in emociti di *M. edulis* e *Mya arenaria* esposti sperimentalmente a metalli pesanti (Sauve *et al.*, 2002). Tale tipologia di ricerche, tuttavia, ancora non trova applicazione nella valutazione del sistema immunitario cellulare del *M. galloprovincialis*.

Al contrario, la valutazione in micrometodo della sintesi di ROS rappresenta una tipologia di studio applicata da tempo nella valutazione delle proprietà fagocitarie dei molluschi

bivalvi. La produzione di ROS negli emociti di *Mytilus* sp. è stata evidenziata mediante chemiluminescenza luminolo-dipendente (LuCL) e fluorescenza. L'aumento di LuCL è stato riscontrato in emociti di *M. galloprovincialis* (Ordàs *et al.*, 2000) e di *M. edulis* (Nöel *et al.*, 1993) mentre la riduzione di LuCL in presenza di superossido dismutasi (SOD) ha dimostrato il coinvolgimento primario dell'anione superossido nell'ossidazione del luminolo.

Per quanto riguarda la valutazione del "burst respiratorio" in fluorimetria, l'ossidazione della 1,2,3-diidrorodamina (DHR) in rodamina è risultata aumentata negli emociti di *M. galloprovincialis* stimolati con lieviti, confermando, inoltre, la specificità del perossido di idrogeno nell'ossidazione della DHR, come evidenziato dall'aumento della fluorescenza in presenza di SOD (Torreilles & Guèrin, 1999).

La sintesi di ROS costituisce un importante meccanismo di degradazione del materiale fagocitato in associazione al ruolo svolto dagli enzimi litici lisosomiali (fosfatasi acide ed alcaline, β -glucuronidasi, lipasi, aminopeptidasi, lisozima) (Carballal *et al.*, 1997c). I primi studi effettuati in microscopia elettronica sulla fagocitosi emocitaria hanno evidenziato come il materiale inglobato venga racchiuso all'interno di fagosomi e come, successivamente, la fusione con vacuoli lisosomiali porti al versamento degli enzimi litici nel fagosoma, permettendone la digestione del contenuto (Feng, 1988). Tuttavia, allo stato attuale delle conoscenze non esistono studi condotti, mediante microscopia confocale, sui processi fagocitari di molluschi bivalvi.

MATERIALI E METODI

Scopo del presente lavoro è consistito nello studio, mediante il tracciante fluorescente 1,2,3-DHR, dei processi fagocitari di *Mytilus galloprovincialis*, incrociando differenti tecniche di approccio quali la citometria a flusso, la fluorimetria in micrometodo e la microscopia confocale. Campioni di mitili (*M. galloprovincialis*, 50-70 mm) sono stati stabulati per 24 ore in un sistema di acquari a circuito chiuso contenenti acqua di mare (18° C, 33 ppt di salinità). L'emolinfa è stata prelevata dal muscolo adduttore posteriore di 15 soggetti divisi in tre gruppi diversi e diluita con soluzione antiaggregante di Alsever fino ad ottenere una concentrazione cellulare di 10^6 cellule/ml, valutata mediante analizzatore di vitalità cellulare (Vi-Cell Beckman). Successivamente, 1 ml di emolinfa diluita, appartenente a ciascun gruppo, è stata posta in tubi per citometria ed analizzata immediatamente ai fini della valutazione morfologica degli emociti, mentre 1 ml di campione di ciascun gruppo è stato posto in tubi e lasciato incubare con 5 μ M di 1,2,3- diidrorodamina (DHR) per 15 minuti. Come stimolo fagocitario, è stata aggiunta una sospensione di Zymosan allo 0,5%, mentre per il controllo è stata utilizzata una pari quantità di acqua di mare sterile. In considerazione, quindi, della suddivisione dei mitili in tre gruppi, sono stati analizzati tre tubi nell'indagine strettamente morfologica e sei tubi (tre come controllo e tre contenenti Zymosan) negli studi fagocitari. Le analisi sono state condotte mediante citometro a flusso Coulter Epics XL (Beckman Coulter), munito di laser ad argon (emissione 488 nm) e per ciascun tubo sono stati valutati 10^4 eventi utilizzando un flusso medio di 300 eventi al secondo. Gli emociti sono stati evidenziati in funzione della grandezza e della complessità strutturale, valutabili, rispettivamente, sulla base dell'angolo di rifrazione frontale (Forward Scatter, FS) e laterale (Side Scatter, SS). In particolare, nella distinzione delle differenti popolazioni emocitarie, i due parametri sono stati analizzati su scala lineare. La fluorescenza emessa dalla rodamina, prodotto di ossidazione della DHR, è stata valutata mediante filtro a banda passante (525 nm) e filtro dicroico (550 nm). I dati ottenuti sono stati analizzati mediante System II software (Beckman Coulter).

Le prove condotte in micrometodo, invece, sono state effettuate ponendo in piastre a 96 pozzetti e senza alcuna aggiunta di Alsever, l'emolinfa raccolta da 15 soggetti divisi in tre gruppi. La DHR è stata addizionata in concentrazioni pari a 5 μM e, dopo 15 minuti di incubazione, una sospensione di Zymosan allo 0,5% è stata utilizzata come stimolo fagocitario. Al fine di testare la specificità della reazione, la superossido dismutasi (SOD) è stata posta contemporaneamente allo Zymosan a concentrazioni di 300 e 600 U/ml, mentre l'inibitore dell'ossido nitrico sintetasi (L-NMMA) è stato utilizzato a 10 μM . Il controllo è risultato costituito esclusivamente da emolinfa e DHR. La fluorescenza emessa dall'ossidazione della DHR in rodamina è stata valutata mediante lettore di micropiastre (Packard Fusion) munito di filtri di eccitazione (510 nm) e di emissione (535 nm) per la rilevazione di fluorescenza. I dati ottenuti sono stati espressi come unità relative di fluorescenza (URF) e rappresentano la media di tre sperimentazioni condotte su 8 pozzetti per ciascuna fila.

Negli studi di microscopia confocale, i prelievi di emolinfa sono stati deposti su vetrino e dopo l'adesione emocitaria, la DHR è stata aggiunta in concentrazione di 5 μM , seguita dalla sospensione di Zymosan. L'analisi dei campioni è stata eseguita per mezzo di microscopio laser confocale Biorad (Radiance 2000 IK-22) dotato di laser Krypton/argon, montato su un microscopio invertito Zeiss Axiovert; è stato utilizzato un obiettivo ad olio planapochromat 63X/1.4 NA (Numerical Aperture) e il campione è stato eccitato mediante la linea del laser di 488 nm.

RISULTATI

Le prove effettuate in citometria a flusso hanno permesso di individuare, nei tre tubi analizzati, due principali sottopopolazioni emocitarie in funzione della loro grandezza e granulosità (fig. 1). L'intensità di fluorescenza costituisce un indice diretto di ossidazione della DHR, e quindi, un parametro indiretto della sintesi di ROS e dell'intensità fagocitaria. Gli emociti incubati con DHR e stimolati con lieviti, infatti, hanno presentato un notevole aumento della fluorescenza emessa rispetto al controllo. In tal senso, le fluorescenze valutate nelle singole sottopopolazioni hanno evidenziato una proporzionalità diretta tra grandezza, complessità e fluorescenza emessa. Di conseguenza gli emociti più grandi e granulari costituiscono le cellule più attive in termini fagocitari (fig. 2).

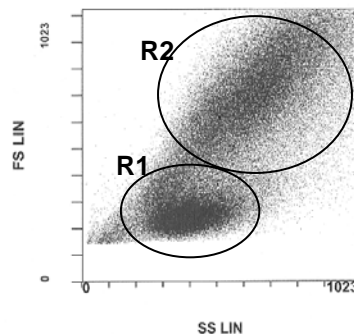


Fig. 1 - Popolazioni emocitarie di *Mytilus galloprovincialis* in citometria a flusso.
 Fig. 1 - *Mytilus galloprovincialis* hemocyte populations identified through flow cytometry.

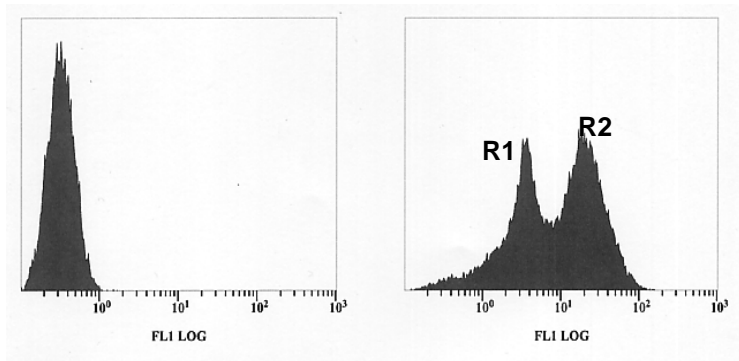


Fig. 2 - Intensità di fluorescenza degli emociti incubati con DHR e stimolati con lieviti (destra) in riferimento al controllo costituito da cellule incubate con DHR (sinistra).
 Fig. 2 - Fluorescence intensity in hemocytes incubated with DHR and stimulated with yeasts (right) compared to the control constituted by cells incubated with DHR (left).

Gli studi in micrometodo hanno confermato l'aumento di URF nei pozzetti contenenti emociti stimolati con lieviti, in particolare nella prima ora di misurazione. La SOD e l'L-NMMA hanno determinato un notevole aumento di URF, testimoniando il ruolo primario di alcuni radicali, quali i perossidi, nei processi di ossidazione della DHR. Per quanto riguarda la SOD è stato possibile evidenziare anche una dose dipendenza del fenomeno (fig. 3).

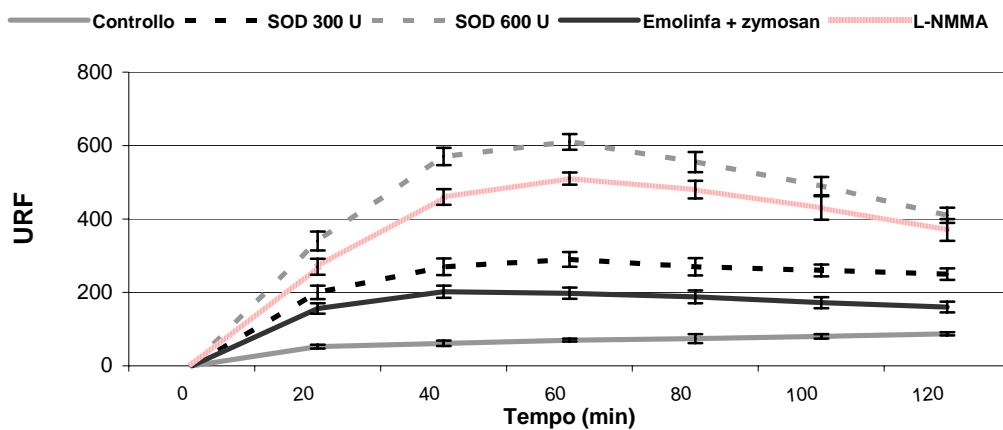


Fig. 3 - Intensità di fluorescenza misurata in micrometodo ed espressa come Unità Relative di Fluorescenza (URF).
 Fig. 3 - Fluorescence intensity measured in micromethod and expressed as Units Relative Fluorescence (URF).

Le prove in microscopia confocale hanno evidenziato, nelle fasi fagocitarie iniziali, la presenza di strutture lisosomiali fluorescenti che circondavano strutture fagosomiali prive di alcun segnale, fatta eccezione per una lieve autofluorescenza dei lieviti fagocitati e in esse contenute (fig. 4a). Successivamente è stato possibile individuare la formazione di vacuoli lisosomiali altamente fluorescenti che riversavano il loro contenuto all'interno dei fagosomi (fig. 4b) fino ad arrivare ad un processo di fusione fagolisosomiale totale (fig. 4c). Le fasi finali del processo sono state caratterizzate dalla presenza di fago-lisosomi con caratteri diversi, soprattutto in termini di fluorescenza emessa, rispetto alle medesime strutture osservate precedentemente (fig. 4d).

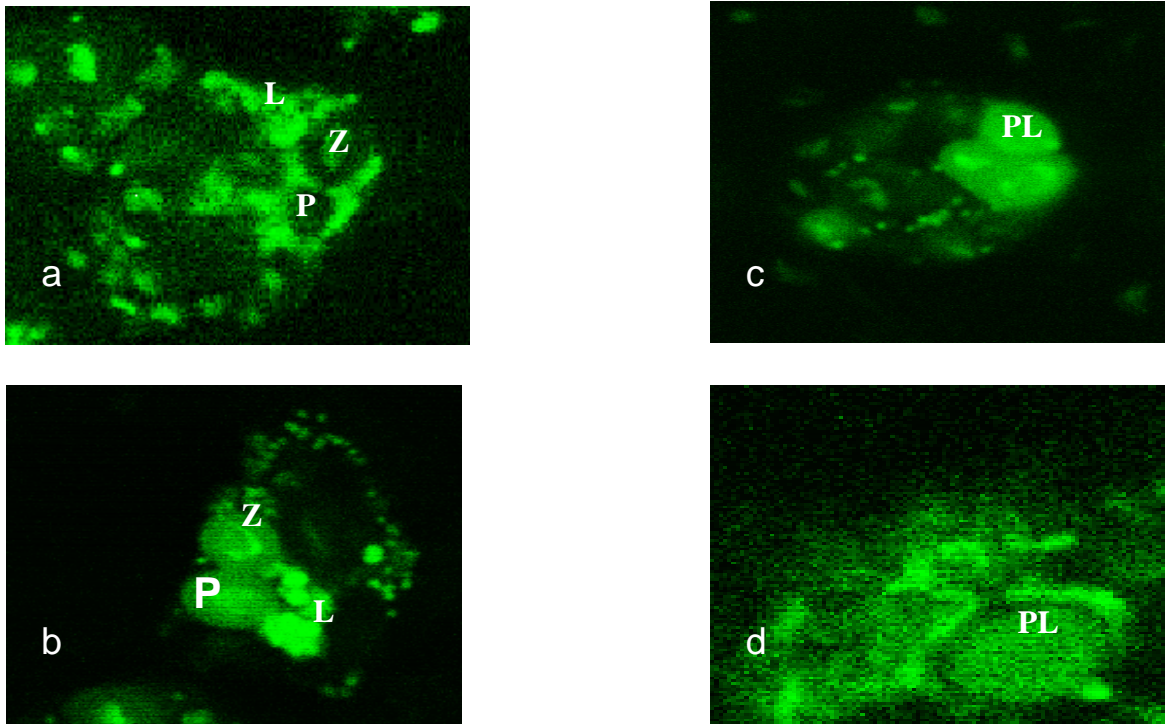


Fig. 4 - a) Lieviti fagocitati (Z) all'interno di fagosomi (P) circondati da granuli fluorescenti (L); b) Vacuoli altamente fluorescenti (L) circondano i fagosomi (P) contenenti lieviti (Z); c) Fusione completa tra granuli e fagosomi (PL); d) Strutture fagolisosomiali al termine del processo (PL), caratterizzate da una minore fluorescenza, dalla scomparsa del contrasto precedentemente fornito dai lieviti ed infine dalla presenza circostante di numerose vescicole fluorescenti.

Fig. 4 - a) Phagocytosed yeasts (Z) inside the phagosomes (P) surrounded by fluorescent granules (L); b) Highly fluorescent vacuoles (L) around the light fluorescent phagosomes (P) containing yeasts (Z); c) Complete fusion between granules and phagosomes (PL); d) Structures at the end of the phagocytosis (PL), characterized by less fluorescence, lack of Zymosan contrast and several fluorescent vesicles around.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'evidenziazione di due principali sottopopolazioni emocitarie mediante citometria a flusso trova riscontro in precedenti indagini condotte da altri autori, i quali hanno individuato nella popolazione più grande e complessa i caratteri morfologici dei granulociti acidofili, mentre nell'altra i caratteri morfologici degli ialinociti (Ottaviani *et al.*, 1998; Barcia *et al.*, 1999). L'esatta ontogenesi delle cellule emocitarie, tuttavia, costituisce allo stato attuale delle conoscenze un campo di notevole interesse e, nello stesso tempo, di notevoli divergenze. Alcuni autori, infatti, considerano gli ialinociti ed i granulociti come due popolazioni ben distinte da un punto di vista di ontogenesi, ciascuna con un proprio precursore (Cheng *et al.*, 1980). Altri autori, invece, ritengono che gli emociti riconoscano un comune precursore e che le differenti sottopopolazioni individuate in microscopia e differenziate sulla base di proprietà morfo-funzionali, non siano altro che cellule di comune origine emopoietica, ma in differente stato di maturazione (Ottaviani *et al.*, 1998).

La fagocitosi costituisce il principale sistema difensivo nei molluschi bivalvi marini e consiste nei processi di riconoscimento, adesione, inglobamento e degradazione di materiale not self da parte di emociti. In particolare, la degradazione avviene attraverso la sintesi di ROS e il rilascio di enzimi litici lisosomiali. Le prove di fagocitosi effettuate mediante l'utilizzo di particelle di lievito come stimolo e DHR come tracciante fluorescente per valutare la sintesi di ROS, hanno evidenziato un aumento considerevole dell'intensità di fluorescenza soprattutto nella prima ora di stimolazione, sia nelle prove citofluorimetriche che nella sperimentazione condotta in micrometodo. L'andamento temporale della risposta osservata è sovrapponibile a quanto riscontrato nel *M. galloprovincialis* mediante prove di microscopia ottica (Carballal *et al.*, 1997b) e chemiluminescenza (Ordàs *et al.*, 2000).

La citometria a flusso ha permesso di valutare le singole proprietà di ciascuna sottopopolazione emocitaria, confermando un aumento della fluorescenza in maniera proporzionale alla grandezza e alla complessità strutturale degli emociti. Infatti, è noto come i granulociti acidofili rappresentino le cellule più grandi, granulari e con una maggiore capacità di emettere pseudopodi. In tal senso, costituiscono le cellule più attive in termini di fagocitosi, rilascio di ROS e citotossicità, sia nel *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997b) che nel *M. edulis* (Friebel & Renwranz, 1995; Pipe *et al.*, 1997). L'utilizzo di soluzione di Alsever modificata nelle prove condotte in citometria a flusso si è reso necessario per evitare l'aggregazione emocitaria, sebbene le sue proprietà inibitorie sulla fagocitosi siano state confermate in citometria (Lambert *et al.*, 2003) ed in luminescenza (Torreilles *et al.*, 1999).

Le prove condotte in micrometodo hanno dimostrato la produzione di ROS in emociti stimolati con lieviti, confermando, inoltre, il ruolo principale del perossido di idrogeno nell'ossidazione della DHR, come già evidenziato da diversi autori in studi di citometria a flusso (Warland *et al.*, 2003) e in micrometodo (Torreilles & Guèrin, 1999). L'aumento di URF, infatti, ha subito un incremento dose-dipendente in presenza di SOD e la notevole stabilità della risposta nel tempo deve essere attribuita alla lunga emivita del perossido. Il ruolo dell'L-NMMA quale inibitore aspecifico dell'ossido nitrico sintetasi ancora non risulta ben noto nei processi fagocitari dei molluschi anche se l'aumento di fluorescenza rilevato potrebbe essere attribuito ad un aumento indiretto del perossido.

La microscopia elettronica ha permesso di evidenziare già da tempo le diverse fasi che caratterizzano il processo fagocitario, sia nei mammiferi che nei molluschi (Feng, 1988). L'utilizzo di traccianti fluorescenti nella valutazione dei processi fagocitari in microscopia confocale, invece, risulta piuttosto recente, anche nello studio di granulociti neutrofilici umani. Nei granulociti, in particolare, la produzione di ROS è stata evidenziata nei fagosomi contenenti lieviti e nei granuli citoplasmatici che riversavano il loro contenuto enzimatico

nel fagosoma (Bassøe *et al.*, 2003). Nella sperimentazione effettuata, l'ossidazione della DHR in relazione alla sintesi fagocitaria di ROS è stata individuata inizialmente nei lisosomi, mentre i fagosomi hanno svolto la funzione principale di serbatoi del materiale fagocitato. La debole fluorescenza fagosomica osservata inizialmente deve essere attribuita a fenomeni di autofluorescenza dei lieviti fagocitati. Il processo evolve con la formazione di vacuoli lisosomiali, la cui elevata fluorescenza è indice dell'incremento dell'attività ossidativa, mentre la fluorescenza fagosomica osservata in questa fase potrebbe essere riconducibile alla sintesi locale di radicali oppure, più probabilmente, al trasferimento passivo di tali molecole o di rodamina da parte dei lisosomi che li circondano. La fusione fago-lisosomiale costituisce l'apice del processo fagocitario che termina con la presenza di strutture fago-lisosomiali caratterizzate da una minore fluorescenza e dalla scomparsa, nel loro interno, del contrasto fornito dai lieviti fagocitati, probabilmente a testimonianza di una risoluzione del processo. Infine, a distanza di alcune ore è stato possibile individuare una residua fluorescenza lisosomiale.

In conclusione, la citometria a flusso ha permesso di differenziare morfologicamente due principali classi emocitarie e di valutarne singolarmente le proprietà fagocitarie in termini di sintesi di ROS e, quindi, di fluorescenza emessa.

La fluorimetria in micrometodo non fornisce alcun dato morfologico, ma conferma quantitativamente la sintesi di ROS nella popolazione emocitaria totale. Tuttavia tale metodica permette di analizzare e valutare contemporaneamente più campioni e più variabili sperimentali, fornendo, inoltre un dato temporale del processo in maniera più accurata rispetto al citometro. Infine, la microscopia confocale ha confermato a livello citologico la sintesi di ROS, testimoniandone anche la localizzazione.

L'utilizzo di tecnologie innovative, quindi, può essere auspicabile in termini di semplicità e sensibilità negli studi inerenti la valutazione dello stato immunitario dei molluschi, poiché l'efficienza immunitaria di un organismo costituisce un complesso insieme di caratteristiche morfo-funzionali in grado di modularne lo stato di salute o di stress. Inoltre, le metodiche utilizzate possono essere rivolte allo studio di problematiche di base quali l'ontogenesi delle cellule emocitarie degli invertebrati marini, possibilmente mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali o di tecniche di separazione cellulare.

RINGRAZIAMENTI

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

BIBLIOGRAFIA

Adema C.M., Van der Knaap W.P.W. & Sminia T. (1991). Molluscan hemocyte mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquat. Scien.*, 4: 201-223.

Allam B., Ashton-Alcox K.A. & Ford S.E. (2002). Flow cytometric comparison of hemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.*, 13, 2: 141-158.

Anderson R.S. (2001). Reactive Oxygen Species and antimicrobial defenses of invertebrates: a bivalve model. *In: Beck et al. Eds., Phylogenetic perspectives on the Vertebrate Immune System, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 131-139.*

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

- Barcia R., Cao A., Arbeteta J. & Ramos-Martinez J.I. (1999). The IL-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis*. *IUBMB Life*, 48: 419-423.
- Bassøe C.F., Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J. & Robinson J.P. (2003). Investigations of phagosomes, mitochondria and acidic granules in human neutrophils using fluorescent probes. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 51B: 21-29.
- 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.
- Carballal M.J., Lopez C., Azevedo C. & Villalba A. (1997c). Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebrate Pathol.*, 70: 96-105.
- Carballal M.J., Villalba A. & López C. (1998). Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebrate Pathol.*, 72: 304-312.
- Cheng T.C., Huang J.W., Karadogan H., Renwranz L.R. & Yoshino T.P. (1980). Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. *J. Invertebrate Pathol.*, 36: 35-40.
- Feng S.Y. (1988). Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. In "Disease processes in marine bivalve molluscs", Fisher W.S. ed., American Fisheries Society Special Publication, 18: 153-168.
- Friebel B. & Renwranz L. (1995). Application of density gradient centrifugation for separation of eosinophilic and basophilic hemocytes from *Mytilus edulis* and characterisation of both cell groups. *Compar. Biochem. Physiol.*, 1: 81-90.
- Hine P.M. (1999). The inter-relationships of bivalve hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 367-385.
- Lambert C., Soudant P., Choquet G. & Paillard C. (2003). Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.*, 15, 3: 225-240.
- Nöel D., Bachère E. & Mialhe E. (1993). Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Develop. Compar. Immunol.*, 17: 483-493.
- Ordàs M.C., Novoa B. & Figueras A. (2000). Modulation of chemiluminescence response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 10: 611-622.
- Ottaviani E., Franchini A., Barbieri D. & Klestas D. (1998). Comparative and morpho-functional studies on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: presence of two age-related hemocyte stages. *It. J. Zool.*, 65: 349-354.
- Pipe R.K., Farley S.R. & Coles J.A. (1997). The separation and characterisation of hemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell & Tissue Research*, 289: 537-545.
- Roch P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172: 125-145.

Sauve S., Brousseau P., Pellerin J., Morin Y., Senecal L., Goudreau P. & Fournier M. (2002). Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg, and Zn). *Aquat. Toxicol.*, 58, 3-4: 189-200.

Torreilles J. & Guèrin M.C. (1999). Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* hemocytes *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 509-518.

Torreilles J., Guèrin M.C. & Roch P. (1999). Modified Alsever's solution is not a good medium for reactive oxygen metabolite study in bivalves. *Fish Shellfish Immunol.*, 8: 65-69.

Xue Q.G., Renault T. & Chilmonczyk S. (2001). Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis* hemolymph. *Fish Shellfish Immunol.*, 11: 557-567.

Warland S., Valeix S., Rodriguez C., Ligot P., Chassagne J. & Vasson M.P. (2003). Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clinica Chimica Acta*, 331: 103-110.