

Produzione di radicali liberi dell'ossigeno in tessuti di *Chamelea gallina* (Bivalvia, Veneridae) parassitati da *Nematopsis* sp. (Apicomplexa, Porosporidae). Indagini preliminari

Reactive oxygen species production in Chamelea gallina (Bivalvia, Veneridae) tissues parasitized by Nematopsis sp. (Apicomplexa, Porosporidae). Preliminary investigations

**Otello Cattani^{1*}, Giorgio Canestri Trotti²,
Giovanni Vitali¹, Marta Monari¹**

¹ Dip. Biochimica, Sez. Biochimica Veterinaria, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano Emilia (BO);

² Dip. Biologia Animale e dell'Uomo, Via Accademia Albertina, 17 - 10100 Torino

RIASSUNTO - Recenti ricerche hanno dimostrato che uno dei più diffusi parassiti di *Chamelea gallina* è il protozoo *Nematopsis* sp., le cui oocisti ne infestano, talvolta pesantemente, la ghiandola digestiva e soprattutto le branchie. Nonostante l'alta densità delle oocisti nei tessuti della vongola, non sono chiari rilevanza patologica, meccanismi di patogenicità ed effetti sulla sopravvivenza degli animali infestati. In questo studio vengono riportati i dati di indagini preliminari sugli effetti della presenza del parassita sulla produzione di ROS e sullo stress ossidativo. Dopo avere osservato al microscopio il grado di densità parassitaria, il rimanente dell'animale è stato utilizzato per le analisi dell'attività della SOD, enzima antiossidante indotto dalla presenza di anione superossido. I risultati ottenuti mostrano valori di attività della SOD comparabili con quelli rilevati in altri molluschi dell'area, con fluttuazioni non correlate con il grado di densità parassitaria, poco differenziata in queste osservazioni preliminari.

SUMMARY - Recent studies have showed that one of the most common parasite of Chamelea gallina is Nematopsis sp., whose oocysts infect heavily the digestive gland and, above all, the gills of the bivalve. Notwithstanding the high density of the oocysts of the parasite in C. gallina tissues, it is not clear pathological relevance, pathogenicity mechanisms and effects on the host survival of the parasite. In this study the effects of parasite presence on the ROS production and on the oxidative stress are reported. After observing oocyst density, tissues are stored in liquid nitrogen until the analyses of SOD activity, the antioxidant enzyme induced by superoxide anion presence. Result obtained show activity values comparable with the ones measured in other Adriatic bivalves, with fluctuations not significantly correlated with the oocyst density, almost similar in these preliminary observations.

Key words: *Chamelea gallina*, *Nematopsis* sp., Gills, Digestive gland, Oxidative stress, Superoxide dismutase.

* Corresponding Author: c/o Facoltà di Medicina Veterinaria, Dip. Biochimica, Sezione Biochimica Veterinaria, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano Emilia (BO); Tel. +39 0512097028, Fax: +39 0512097037, E-mail: ocattani@vet.unibo.it.

INTRODUZIONE

Per mantenere la loro integrità di fronte ad aggressioni da parte di agenti chimici e infettivi, gli invertebrati marini, come gli altri esseri viventi, hanno sviluppato dei sistemi cellulari di difesa che sono essenzialmente proteici e che utilizzano l'attività catalitica di numerosi enzimi citosolici e di membrana, per provocare la lisi delle cellule patogene o la modificazione chimica di agenti tossici (Canicatti & Roch, 1993).

Nei bivalvi marini l'attività litica è meno elaborata che nei mammiferi. Questa risiede principalmente nell'emolinfa e sembra dovuta a molecole isolate, le emolisine, secrete dagli emociti. Le emolisine (emoagglutinine), hanno proprietà opsonizzanti e sono state utilizzate *in vitro* per provocare la fagocitosi. Gli emociti sono le prime cellule effettrici nella risposta immunitaria nei bivalvi marini per l'eliminazione di elementi estranei e la loro funzione fagocitaria è riconosciuta da diversi anni (Cheng & Cali, 1974). La liberazione di enzimi lisosomiali (lisozima, catepsina, β -glucuronidasi, etc.) da parte delle cellule nel momento della loro degranolazione, è stata oggetto di numerosi lavori (Cheng & Downs, 1988); tuttavia, solo recentemente la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in seguito a fagocitosi è stata messa in evidenza per chemiluminescenza in alcuni bivalvi marini (Bachere *et al.*, 1991). Sembra dunque che, per analogia con i processi che avvengono durante uno shock respiratorio nei leucociti dei mammiferi, il contatto degli emociti con un corpo estraneo potrebbe portare a un aumento del consumo di ossigeno, dovuto ad una attività enzimatica del tipo NADPH ossidasi legata alla membrana plasmatica e catalizzante la riduzione monovalente dell'ossigeno molecolare. Sistemi antiossidanti sono stati messi in evidenza anche nei bivalvi marini: gli enzimi superossido dismutasi (SOD), catalasi, glutatione perossidasi e i composti non enzimatici, come le vitamine A, C, E ed il glutatione (Livingstone *et al.*, 1992; Doyotte *et al.*, 1997; Regoli *et al.*, 1997).

Fra i parassiti dei molluschi bivalvi e in particolare di *Chamelea gallina*, un considerevole rilievo lo assumono i protozoi del genere *Nematopsis* che comprende più di trenta specie che attuano il loro ciclo vitale avendo come ospite intermedio un mollusco bivalve, nei connettivi del quale avviene la sporogonia, e come ospite definitivo un crostaceo decapode, nell'intestino del quale si attua la riproduzione sessuale e asessuale. È stata osservata un'altissima prevalenza delle infezioni da *Nematopsis* (dall'86 al 100% dei soggetti esaminati) in tessuti di *C. gallina* delle aree costiere adriatiche (Berilli *et al.*, 1998; Canestri Trotti *et al.*, 1998; Canestri Trotti *et al.*, 2000), dove in moltissimi casi la densità parassitaria era elevatissima essendo le branchie completamente occupate dalle oocisti del parassita. Nonostante la possibilità di osservare con elevata frequenza infezioni pesanti dei tessuti dei bivalvi vi sono contrastanti ipotesi sulla rilevanza patologica di questi protozoi. Synderman (1970) ipotizza un'azione meccanica a causa delle ampie aree di tessuto occupate dalle oocisti e più recentemente Azevedo & Cachola (1992) suggeriscono che le infezioni da *Nematopsis* causino la lisi delle cellule branchiali.

È stato osservato che la presenza di parassiti determina un aumento dello stress ossidativo nei tessuti dell'ospite (misurato come perossidazione lipidica) a causa della produzione di radicali liberi dell'ossigeno (Derda *et al.*, 2004; Facundo *et al.*, 2004; Turrens, 2004). Le reazioni biologiche provocate dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) coinvolgono molti componenti diversi che possono essere direttamente danneggiati dai radicali ossidanti (Finkel & Holbrook, 2000).

In questo studio si è cercato di valutare, su esemplari di *C. gallina* prelevati a fine gennaio 2003 da banchi naturali siti in un'area costiera di fronte a Tagliata di Cervia (RA), l'effetto della presenza di oocisti di *Nematopsis* sp. sulla produzione di radicali liberi dell'ossigeno.

La generazione di ROS è stata valutata indirettamente misurando l'attività dell'enzima

antiossidante superossido dismutasi (SOD), che viene indotto dalla presenza di anione superossido.

MATERIALI E METODI

Prelievo delle vongole

Gli esemplari di *C. gallina* di questa ricerca sono stati forniti dalla vongolara Emilia 2 RA 602 dotata di draga idraulica. I prelievi dei bivalvi sono stati effettuati a fine gennaio 2003 in un'area costiera di fronte a Tagliata di Cervia (RA), ad una profondità di 5 metri. Gli esemplari presentavano una lunghezza conchigliare compresa fra 2,5 e 3 cm.

Giunti in laboratorio i bivalvi sono stati rapidamente dissezionati separando epatopancreas e branchie ed una frazione del tessuto è stata immediatamente osservata a fresco al microscopio ottico per una valutazione della densità parassitaria delle oocisti di *Nematopsis*. I tessuti che presentavano approssimativamente lo stesso grado di densità parassitaria venivano radunati insieme, suddivisi in tre pool di 8-10 esemplari ciascuno e congelati in azoto liquido fino alla effettuazione delle analisi. Con il segno + è stato indicato il pool che presentava una densità parassitaria di 0,05 oocisti/campo; con il segno ++ il pool con densità di 0,1 oocisti/campo e infine con +++ la densità di 0,5 oocisti/campo. Diversamente da quanto abitualmente osservato in precedenti ricerche la densità parassitaria osservata nel campione di vongole considerato nell'esperimento è stata in genere assai limitata e anche piuttosto uniforme non consentendo una più marcata distinzione di tali pools.

Analisi enzimatiche

La determinazione dell'attività di superossido dismutasi (SOD) è stata eseguita spettrofotometricamente (spettrofotometro Beckman mod. DU 530UV/Vis) sui campioni applicati, dopo opportuna estrazione, a colonne cromatografiche.

L'estrazione dell'epatopancreas è stata eseguita in tampone TRIS-HCl 10 mM, KCl 0,15 M, saccarosio 0,5 M a pH 7,6 con un rapporto 1:5 (p:v). Quindi è seguita una omogenizzazione con Ultraturrax in bagno di ghiaccio per 2 minuti. L'omogenato è stato poi centrifugato a 5000xg per 30 minuti in supercentrifuga Beckman TJ25 per una prima parziale centrifugazione; il supernatante così ottenuto è stato nuovamente centrifugato a 12000xg per 30 minuti in ultracentrifuga Beckman LE 80 K.

Parte del supernatante ottenuto dalla seconda centrifugazione è stato caricato in colonna cromatografica Sephadex G 25 precedentemente equilibrata con tampone TRIS-HCl 10 mM pH 7,6 (per rimuovere le piccole molecole a PM <500-1000 daltons) e sul campione eluito sono state eseguite le determinazioni enzimatiche.

Determinazione della superossido dismutasi

L'attività della SOD è stata saggiata secondo il metodo modificato di Crapo *et al.* (1978), misurando spettrofotometricamente le variazioni di assorbanza a 550 nm a temperatura controllata di $25 \pm 0,5^\circ$ C in triplicato. Il saggio enzimatico per dosare la SOD totale è stata eseguito con tampone fosfato 50 mM, EDTA 0,1 mM, NaN₃ 1 mM a pH 8,6. La MnSOD è stata determinata aggiungendo al tampone fosfato cianuro di potassio (KCN) 1 mM in quanto inibitore della forma CuZnSOD; la CuZnSOD è stata calcolata per differenza diretta fra la SOD totale e la MnSOD.

Il saggio è eseguito con tampone fosfato 46,5 mM/EDTA 0,1 mM, ipoxantina 195 mM, citocromo *c* 16 mM, xantina ossidasi 2,5 mU e KCN 20 mM.

L'attività della SOD è proporzionale alla presenza di anione superossido (O₂^{•-}), la produzione dell'anione viene favorita utilizzando nel saggio enzimatico ipoxantina e xantina

ossidasi (XOD). La XOD ossida l'ipoxantina con formazione di superossido e xantina.

Una unità di SOD viene definita come la quantità di campione che produce il 50% di inibizione del tasso di riduzione del citocromo *c* in specifiche condizioni di saggio.

Analisi statistiche

I valori di attività della SOD sono stati espressi come media \pm d.s. (deviazione standard). La significatività delle differenze riscontrate nei confronti fra i risultati ottenuti sono state determinate per mezzo del programma SigmaStat (SPSS, USA) utilizzando analisi della varianza (ANOVA) e Student's *t*-test e considerando come significativa una $p < 0,05$.

RISULTATI

In questa ricerca le analisi sull'attività dell'enzima antiossidante sono state effettuate direttamente su uno dei tessuti maggiormente infestati dal parassita (branchie) e anche sulla ghiandola digestiva che è un organo di intensa attività metabolica dove normalmente vi è un'alta produzione di ROS.

Relativamente alla situazione rilevata nella ghiandola digestiva i valori di attività della CuZnSOD variano da $951,48 \pm 243,53$ a $1322,73 \pm 80,50$ U/g di peso fresco (Figura 1). Apparentemente i tessuti maggiormente infestati mostrano valori di attività più alti, ma le differenze non sono statisticamente significative. Per quanto riguarda l'attività della MnSOD ($697,82 \pm 47,15$ - $862,7 \pm 162,09$ U/g pf) (Figura 1) i valori non cambiano nelle condizioni analizzate. I risultati delle analisi dell'attività nelle branchie (Figura 2) mostrano un'attività della SOD relativamente più bassa rispetto a quella misurata nella ghiandola digestiva e anche per questo tessuto i valori variano senza alcuna correlazione diretta con il grado di infestazione. Per quanto riguarda l'attività CuZnSOD i valori variano tra $324,61 \pm 155,12$ e $456,49 \pm 56,75$ U/g pf, mentre la MnSOD mostra valori di attività compresi tra $314,03 \pm 39,13$ e $394,93 \pm 94,34$ U/g pf.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Oltre il 90% dell'ossigeno introdotto viene utilizzato dalla citocromo ossidasi, ultimo enzima della catena di trasporto di elettroni mitocondriale. La citocromo ossidasi, similmente ad altri enzimi che utilizzano l'O₂, mostra metalli di transizione nel sito attivo. I metalli di transizione hanno stati di ossidazione variabili e perciò sono in grado di trasferire singoli elettroni facilitando le reazioni di ossido-riduzione (Halliwell & Gutteridge, 1999).

L'anione superossido (O₂⁻) è formato *in vivo* attraverso molteplici reazioni e la maggior fonte è rappresentata dalla catena di trasporto di elettroni mitocondriale e dal reticolo endoplasmatico. La tossicità è dovuta ad un eccesso di ossigeno e la sovrapproduzione di superossido conseguente, può essere causata da una fuga di elettroni dalla catena respiratoria, dall'attività di ossidasi solubili (xantina ossidasi, NADPH ossidasi) e dall'autossidazione di piccole molecole. Allo stesso tempo l'O₂⁻ può essere formato durante la fagocitosi cellulare, ad opera dei fagociti e in questo caso il superossido svolge un'importante ruolo battericida (Scandalios, 2002).

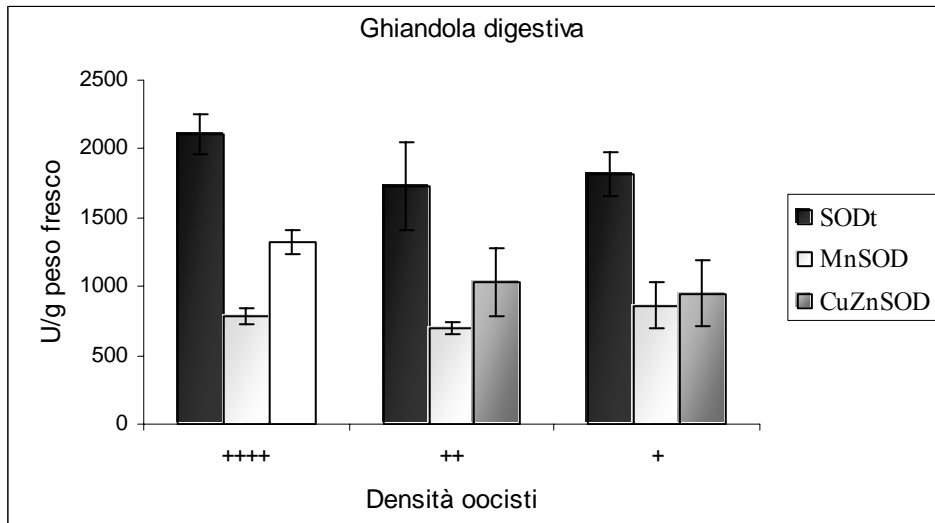


Figura 1 - Attività dell'enzima antiossidante superossido dismutasi (SOD totale, MnSOD e CuZnSOD) in ghiandola digestiva di esemplari di *Chamelea gallina* infetti da oocisti di *Nematopsis* sp. ($n = 3 \pm d.s.$). Le differenze fra le varie condizioni non sono risultate significative.

Figure 1 - Activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (total SOD, MnSOD and CuZnSOD) in digestive gland of *Chamelea gallina* infected by *Nematopsis* sp. ($n = 3 \pm d.s.$). Differences between diverse conditions are not statistically significant.

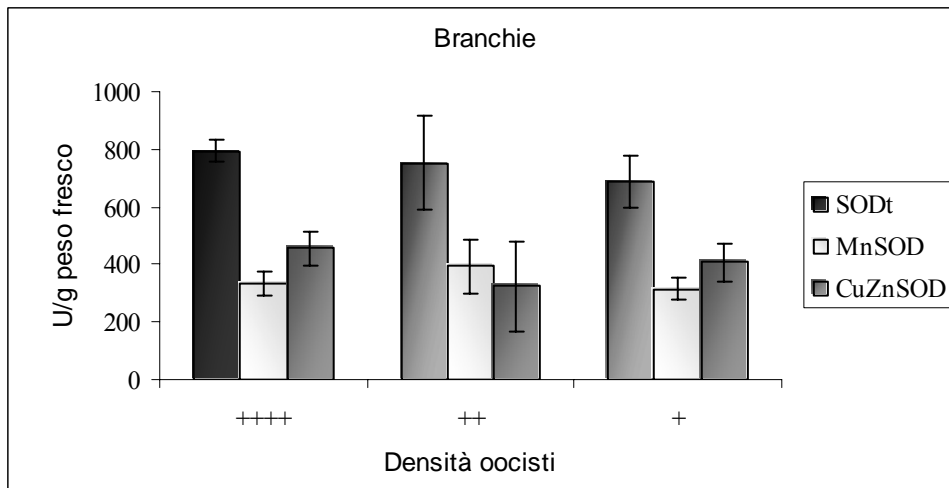


Figura 2 - Attività dell'enzima antiossidante superossido dismutasi (SOD totale, MnSOD e CuZnSOD) in branchie di esemplari di *Chamelea gallina* infetti da oocisti di *Nematopsis* sp. ($n = 3 \pm d.s.$). Le differenze fra le varie condizioni non sono risultate significative.

Figure 2 - Activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (total SOD, MnSOD and CuZnSOD) in gills of *Chamelea gallina* infected by *Nematopsis* sp. ($n = 3 \pm d.s.$). Differences between diverse conditions are not statistically significant.

Oltre all'attacco dei patogeni la produzione di radicali dell'ossigeno e di conseguenza lo stress ossidativo, può essere generato come risposta a stress ambientali quali esposizione a contaminanti inorganici ed organici (metalli pesanti e composti organoclorurati), condizioni di ipossia/anossia e riossigenazione. Anche in condizioni fisiologiche vi è una continua produzione di ROS (reactive oxygen species).

Sebbene non vi siano in letteratura dati relativi a *C. gallina* i valori della presente ricerca sono comparabili a quelli riportati in diverse ricerche relative ad altri bivalvi (Eertman *et al.*, 1995; Nasci *et al.*, 2000; Porte *et al.*, 2001). I risultati ottenuti non mostrano differenze significative fra gli individui che presentano un numero più alto di oocisti e quelli meno pesantemente infettati. Pertanto la maggior densità non sembra determinare un aumento dello stress ossidativo tale da indurre un incremento dell'attività degli enzimi antiossidanti.

Dato che, come si è detto, molteplici sono le fonti di produzione di radicali dell'ossigeno, sia fisiologiche, sia dovute a effetti di stress ambientali, il grado di infezione degli animali prelevati non riesce a influenzare in maniera decisiva la produzione di superossido altrimenti generata.

Sarebbero necessari esperimenti in condizioni controllate (condizioni sperimentali note) in quanto è stato dimostrato che le condizioni ambientali esercitano un notevole influenza sulle funzioni difensive degli emociti. Recenti ricerche sulle difese immunitarie degli emociti di *C. gallina* (Matozzo *et al.*, 2005; Monari *et al.*, 2005) hanno messo in evidenza che stress ambientali (anossia, temperatura e salinità) determinano una forte inibizione della funzionalità degli emociti (numero di emociti circolanti, intensità di fagocitosi e produzione di O₂^{•-}).

Negli ultimi anni si sono verificati casi di morie imponenti nei banchi naturali di *C. gallina*. Lo studio delle cause di questi fenomeni di mortalità di massa assume quindi un'importanza notevole, essendo la vongola una specie di grande interesse commerciale. Pertanto sarebbe opportuno proseguire lo studio delle parassitosi di questo bivalve, possibilmente con un approccio multidisciplinare che preveda prima di tutto lo studio di campioni maggiormente diversificati in base alla densità parassitaria.

BIBLIOGRAFIA

- Azevedo C. & Cachola R. (1992). Fine structure of the Apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of the marine bivalve molluscs. *Dis. Aquat. Org.*, 14: 69-73.
- Bachere E., Hervio D. & Mialhe E. (1991). Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, 11: 173-180.
- Berilli F., Ceschia G., Basilicata L., De Liberato C., Di Cave D., Mokhamer E. & Orecchia P. (1998). Monitoraggio parassitologico di *Chamelea gallina* (Mollusca, Bivalvia) in Adriatico. *Parassitologia*, 40, Suppl. 1: 12.
- Canestri Trotti G., Bacarani E.M. & Paesanti F. (1998). *Nematopsis* spp. Schneider, 1892 (Apicomplexa: Gregarinida: Porosporidae) in *Chamelea gallina* from Adriatic Sea (Italy). *Parassitologia*, 40, Suppl. 1: 28.
- Canestri Trotti G., Bacarani E.M., Paesanti F. & Turolla E. (2000). *Nematopsis* and *Perkinsus* infections in *Chamelea gallina* from Northern Adriatic Sea (Italy). *Parassitologia*, 42: 164.
- Canicatti C. & Roch P. (1993). Stratégies de défenses immunitaires, biologie et évolution des systèmes lytiques. *Paris, Milan, Barcelone, Bonn. Masson*

- Cheng T.C. & Cali A. (1974). An electron microscope study of the fat of bacteria phagocytosed by granulocytes of *Crassostrea virginica*. *Contemp. Top. Immunobiol.*, 4: 25-32.
- Cheng T.C. & Downs J.C.U. (1988). Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulation of oyster, *Crassostrea virginica*. hemocytes. *J. Inver. Pathol.*, 52, 1: 163-167.
- Crapo J.D., McCord J.M. & Fridovich I. (1978). Preparation and assay of superoxide dismutases. *Method. Enzymol.*, 53: 382-393.
- Derda M., Wandurska-Nowak E. & Hadas E. (2004). Changes in the level of antioxidants in the blood from mice infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.*, 93, 3: 207.
- Doyotte A., Cossu C., Jacquin M., Babut M. & Vasseur P. (1997). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and in the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.*, 39: 93-110.
- Eertman R.H.M., Groening C.L.F.M.G., Sandee B., Hummel H. & Smaal A.C. (1995). Response of the blue mussel *Mytilus edulis* following exposure to PAH or contaminated sediment. *Mar. Environ. Res.*, 39: 169-173.
- Facundo H.T., Brandt C.T., Owen J.S. & Lima V.L. (2004). Elevated levels of erythrocyte-conjugated dienes indicate increased lipid peroxidation in schistosomiasis mansoni patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37, 7: 957-962.
- Finkel T. & Holbrook N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408: 239-247.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. (1999). Free radicals in Biology and Medicine, 3^o ed. *Oxford University Press*.
- Livingstone D.R., Lips F., Garcia Martinez P. & Pipe R.K. (1992). Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 112: 265-276.
- Matozzo V., Monari M., Foschi J., Papi T., Cattani O. & Marin M.G. (2005). Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina*. I: Effects on immune responses. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 325: 163-174.
- Monari M., Matozzo V., Foschi J., Marin M.G. & Cattani O. (2005). Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina*. II: Modulation of superoxide dismutase activity and expression in haemocytes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 325: 175-188.
- Nasci C., Da Ros L., Nesto N., Sperti L., Passarini F. & Pavoni B. (2000). Biochemical and histochemical responses to environmental contaminants in clam, *Tapes philippinarum*, transplanted to different polluted areas of Venice Lagoon, Italy. *Marine Environ. Res.*, 50: 425-430.
- Porte C., Biosca X., Sole M. & Albaiges J. (2001). The integrated use of chemical analysis, cytochrome P₄₅₀ and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). *Environ. Pollut.*, 112, 2: 261-268.
- Regoli F., Principato G.B., Bertoli E., Nigro M. & Orlando E. (1997). Biochemical characterisation of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. *Polar. Biol.*, 17: 251-258.
- Scandalios J.G. (2002). The rise of the ROS. *Trends in Bioch. Sciences*, 7: 483-486.
- Synderman C.J. (1970). Principal disease of marine fish and shellfish. *Academic Press. New York*.

Turrens J.F. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects Med.*, 25: 211-220.