



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: SCIENZE BIOMEDICHE VETERINARIE E COMPARATE

CICLO XXII

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA:

BIOMONITORAGGIO DELLA LAGUNA DI VENEZIA:

INDICATORI BIOLOGICI IN

Zosterisessor ophiocephalus e Tapes philippinarum

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Massimo Morgante

Supervisore: Ch.mo Prof. Giuseppe Radaelli

Dottoranda: Elena Negrato

INDICE

<u>Riassunto</u>	1
<u>Abstract</u>	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1 BIOMONITORAGGIO	5
1.1.1 <i>BIOMARKERS</i>	6
1.1.2 BIOINDICATORI	8
1.2 DISTRUTTORI ENDOCRINI	9
1.2.1 EFFETTI DEI DISTRUTTORI ENDOCRINI	11
1.2.2 ALTRI BIOMARCATORI	14
1.3 LAGUNA DI VENEZIA	18
1.3.1 <i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	20
1.3.2 <i>Tapes philippinarum</i>	22
2. SCOPO	27
3. MATERIALI E METODI	29
3.1 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	29
3.1.1 <i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	29
3.1.2 <i>Tapes philippinarum</i>	30
3.2 IMMUNOISTOCHEMICA	31
3.2.1 CONTROLLI DI SPECIFICITA'	32
3.3 ANALISI RT-PCR E REAL TIME	32
3.3.1 ANALISI RT-PCR	32
3.3.2 ANALISI REAL TIME	34
3.4 WESTERN BLOT	35
3.4.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	35
3.4.2 SAGGIO BRADFORD	36
3.4.3 SEPARAZIONE ELETTROFORETICA	36

3.4.4 TRASFERIMENTO E COLORAZIONE	37
3.4.5 INCUBAZIONI	38
3.4.6 REAZIONE CHEMIOLUMINESCENTE	38
3.5 ANALISI T-BARS	38
3.6 ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA (RIA)	39
3.6.1 RIA SU MICROPIASTRA	40
3.6.2 ESTRAZIONE DEGLI STEROIDI	42
3.6.3 ALLESTIMENTO CURVA DI TARATURA E CONTROLLI	43
3.6.4 VALIDAZIONE DEL METODO DI DOSAGGIO	43
3.7 ANALISI STATISTICA	44
4. RISULTATI	46
4.1 ANALISI REAL TIME	46
4.1.1 HSP70 INDUCIBILE	46
4.1.2 CITOCROMO P450 1A1	47
4.2 IMMUNOISTOCHEMICA	48
4.2.1 HSP70 INDUCIBILE	48
4.2.1 STRESS OSSIDATIVO	48
4.3 WESTERN BLOT	50
4.3.1 COLORAZIONE COMASSIE	50
4.3.2 VITELLOGENINA	50
4.3.2 STRESS OSSIDATIVO	51
4.4 ANALISI T-BARS	52
4.5 DOSAGGIO DEGLI STEROIDI	52
4.5.1 VALIDAZIONE DEL DOSAGGIO IN <i>Zosterisessor ophiocephalus</i> e <i>Tapes philippinarum</i>	52
4.5.2 <i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	53
4.5.3 <i>Tapes philippinarum</i>	57
5. DISCUSSIONE	61

5.1 BIOINDICATORI	61
5.2 HSP70 INDUCIBILE	61
5.3 CITOCROMO CYP1A1	63
5.4 VITELLOGENINA	64
5.5 STRESS OSSIDATIVO	65
5.6 DOSAGGIO DEGLI STEROIDI	67
6. CONCLUSIONI	70
7. BIBLIOGRAFIA	71

Riassunto:

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare l'espressione di alcuni bioindicatori comunemente utilizzati in programmi di biomonitoraggio in pesci e molluschi prelevati in due periodi dell'anno e in diversi siti della Laguna di Venezia che, per la loro collocazione e per le caratteristiche idrologiche, possono essere più o meno soggette a possibili fonti inquinanti.

Le specie monitorate sono state il pesce bentonico *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei: Gobiidae) e la vongola verace *Tapes philippinarum*, animali particolarmente adatti al biomonitoraggio in quanto stanziali, vivono a stretto contatto con il fondo e sono reperibili in Laguna di Venezia. Parallelamente alcuni individui di *Z. ophiocephalus* sono stati stabulati in vasche con acqua di mare per un periodo sufficiente a detossificarsi, al fine di consentire una comparazione non solo tra i diversi siti di campionamento ma anche rispetto ad un controllo privo di contaminanti.

I biomarcatori selezionati e analizzati sono stati: l'espressione della vitellogenina (VTG), della citocromo P450 1A1 (CYP1A1) e dei principali marcatori dello stress ossidativo, quali 4-idrossi nonenale (HNE), nitrotirosina (NT), malondialdeide (MDA) e acroleina, considerati ottimi indicatori di inquinamento ambientale. Inoltre sono stati valutati: l'espressione del messaggero delle *Heat Shock Protein 70* (HSP70) e, in entrambe le specie monitorate, i livelli di steroidi sessuali (testosterone, estradiolo e progesterone) al fine di verificare eventuali variazioni imputabili alla presenza nell'ambiente di distruttori endocrini cioè di sostanze inquinanti in grado di interferire con il sistema endocrino degli organismi.

Mediante analisi di immunostochimica, Western blot, saggio T-BARS e Real Time PCR abbiamo potuto confermare quanto già riportato in letteratura: il bacino di Lido è la zona maggiormente impattata della Laguna poiché influenzata dalla presenza di un'estesa area industriale e della città di Venezia. Un minor impatto è stato invece riscontrato per le restanti aree monitorate. Tuttavia, al fine di ottenere un quadro più completo dello stato dell'intero ambiente lagunare, è necessario: identificare ulteriori ed efficaci bioindicatori, ampliare l'area monitorata identificando altri siti di campionamento in tutti i bacini della Laguna di Venezia, aumentare il numero di esemplari da sottoporre a detossificazione utilizzando animali prelevati dai diversi bacini della Laguna di Venezia per allestire un esperimento di controllo completo.

Abstract:

Venice Lagoon is a transitional environment on the Adriatic coast influenced by such human activities as agriculture, industry, and tourism. For this reason, in the last year, numerous national and international projects have been carried out in order to evaluate the quality status of the lagoon environment demonstrating the presence of a wide range of contaminants in the environment.

The biomonitoring in the lagoon environment plays an important role in strategies and actions to identify, control and reduce the environmental problems. Biomonitoring programs usually involves the use of biomarkers, which represent biochemical, physiological or behavioural variation measured in tissues, biological fluids or the whole organism (Depledge and Fossi 1994).

In the present study, the expression of vitellogenin, cytochrome P450 1A1, HSP70 and oxidative stress biomarkers and sex steroids concentrations (progesterone, 17 β -estradiol and testosterone) have been examined in different sites (Val di Brenta, Porto Canale, Ca' Roman and Porto Marghera) of the Venice Lagoon monitoring their levels in the grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* and in the clam *Tapes philippinarum*. Sampling sites were selected on the basis of data reported in literature (Nesto et al. 2007; Losso and Volpi Ghirardini, 2010).

Vitellogenin induction was detected in adult male of *Z. ophiocephalus* collected from the different sites evidencing high toxicological risk probably due to endocrine disrupting chemicals. Moreover, the highest levels of MDA and CYP1A1, measured spectrophotometrically by TBARS assay and by Real Time PCR respectively, were observed in animals sampled at the Porto Marghera site. The cellular localization of HNE and NT, investigated by an immunohistochemical approach, showed that immunopositivity was mainly localized in melanomacrophage-centres of spleen, kidney, liver and ovary. Both immunohistochemistry and Western blot analysis evidenced that HNE and NT were quantitatively higher in animals from Porto Marghera if compared with those sampled at the other sites.

In conclusion, as reported in literature (Losso and Volpi Ghirardini, 2010), most indicators have shown that the Lido basin, influenced by the presence of the industrial area and the city of Venice, is the most highly impacted area suggesting that oxidative stress markers, vitellogenin and cytochrome P4501A1 in aquatic organisms can be useful in biomonitoring of environmental pollution. However, HSP70 expression and sex steroid concentrations are not fast and suitable tools to investigate environmental quality.

1. INTRODUZIONE

Il costante aumento dello sfruttamento delle risorse naturali da parte dell'uomo, insieme alla progressiva occupazione di spazi ed alla modifica del territorio, è un fenomeno che interessa tutte le società industrializzate e, in particolar modo, quelle che da più tempo hanno un alto tasso di sviluppo. A questo va aggiunto l'uso sempre più esteso di inquinanti e contaminanti ambientali che vengono direttamente e/o indirettamente (ad esempio, in seguito al dilavamento del suolo o per precipitazione con le piogge) riversati nei corsi d'acqua. Tali fenomeni rendono indispensabili studi di biomonitoraggio atti a stimare lo stato ambientale degli ecosistemi valutando risposte biologiche, definite *biomarkers* o biomarcatori, in specie (bioindicatori) la cui funzione, stato o popolazione caratterizzi l'integrità dell'ecosistema. L'uso di bioindicatori nel monitoraggio ambientale è considerato un ottimo strumento per la valutazione precoce di stress ambientale ed offre il vantaggio di anticipare eventuali interventi prima che si manifestino problemi a livello di popolazione e dell'intero ecosistema.

1.1 BIOMONITORAGGIO

Il biomonitoraggio è uno strumento innovativo di controllo che può trovare varie applicazioni nel campo degli studi ambientali.

Il biomonitoraggio è il monitoraggio degli effetti dell'inquinamento mediante organismi viventi e parametri biologici; è basato sullo studio di variazioni ecologiche dovute all'effetto di una o più sostanze inquinanti presenti nei vari comparti della biosfera (Manning e Fender, 1980). Attraverso il biomonitoraggio si valuta lo stato ambientale degli ecosistemi, stimando i disturbi che alterano l'attività (spesso la vitalità) dell'indicatore preso in esame, evidenziando le deviazioni da situazioni "normali" o di base (Epifani, 2009).

Tali effetti biologici si possono manifestare a diversi livelli mediante:

- accumulo delle sostanze inquinanti negli organismi;
- modificazioni morfo-fisiologiche dell'indicatore biologico scelto;
- modificazione nella composizione delle comunità animali e vegetali.

Tuttavia, l'entità dei danni provocati può variare a seconda dell'esposizione e della concentrazione dell'inquinante.

1.1.1 BIOMARKERS

Negli ultimi decenni i *biomarkers* sono ampiamente utilizzati in indagini ecotossicologiche poiché forniscono in maniera rapida e precisa informazioni sugli effetti prodotti da composti inquinanti su popolazioni e/o comunità. A partire dagli anni '70, con i primi studi ecotossicologici nell'ambiente marino (Bayne *et al.*, 1976; Payne, 1977), i *biomarkers* trovano applicazione in moltissime branche della medicina e dell'ecologia come evidenziato dal crescente numero di pubblicazioni scientifiche sull'argomento (McCarthy e Shugart, 1990; Depledge e Fossi, 1994; Au, 2004; Fränze, 2006; Porte *et al.*, 2006).

Nel corso degli anni sono state proposte molte definizioni per il termine *biomarker* o biomarcatore. Nel 1987 il *National Research Council* (NRC) definisce i *biomarkers* come quelle variazioni misurate in sistemi biologici o campioni a seguito di un'esposizione chimica; proponendo una classificazione in tre categorie: biomarcatori di esposizione, di effetto e di suscettibilità.

Attualmente si preferisce definire il termine *biomarker* come quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individuo o popolazione) la quale fornisce l'evidenza di un'esposizione e/o un effetto ad uno o più composti inquinanti (e/o radiazioni) (Depledge, 1994).

McCarthy e Shugart (1990) propongono un'ulteriore caratterizzazione distinguendo i biomarcatori in specifici e generici. I biomarcatori specifici sono le risposte identificate a seguito di un legame specifico tra il contaminante e un sito d'azione. Ad esempio, Lam e Gray (2003) identificano quali biomarcatori specifici: recettori di membrana, acidi nucleici o specifiche regioni proteiche. I biomarcatori generici sono le risposte dell'organismo associabili ad uno stato generale di stress, dovuto alla presenza del contaminante in ambiente e alle relative variazioni chimico-fisiche e fisiologiche; sono considerati biomarcatori generici lo *scope for growth* (differenza tra l'energia assimilata ed i costi del metabolismo) o le alterazioni istopatologiche (Losso e Volpi Ghirardini, 2010).

Hahn (2002) propone di suddividere i *biomarkers* in due categorie: biomarcatori di esposizione e biomarcatori d'effetto. I biomarcatori di esposizione sono tutte quelle risposte di un organismo che indicano l'esposizione ad un composto chimico o ad una classe di composti chimici, ma che non forniscono nessuna indicazione sui reali effetti tossicologici sull'organismo. I biomarcatori di effetto sono invece tutte quelle risposte di un organismo, ai diversi livelli di complessità strutturale, che indicano sia l'esposizione ad un composto tossico che

il suo effetto tossicologico, ma le risposte associate non possono essere collegate alla presenza di specifici contaminanti (Losso e Volpi Ghirardini, 2010).

In generale, la suddivisione in categoria può variare notevolmente poiché numerosi sono i parametri discriminatori utilizzati dagli autori, come il livello di complessità strutturale investigato (Hugget *et al.*, 1992) o la classe di contaminanti (Peakall, 1992).

Nelle indagini ecotossicologiche i *biomarkers* permettono di: identificare l'avvenuta esposizione ad un contaminante; fornire informazioni sui cambiamenti di concentrazione del contaminante sia in termini spaziali che temporali; stabilire la qualità ambientale o l'avvento di effetti avversi (Au, 2004). Pertanto i *biomarkers* non permettono di ottenere informazioni quantitative sui livelli di esposizione di un organismo ad un determinato contaminante, ma piuttosto forniscono indicazioni sul suo stato di salute come segnale potenziale di alterazioni ai più alti livelli ecologici (Fossi, 2000). Inoltre, essendo le strutture cellulari, le reazioni biochimiche e le funzioni fisiologiche spesso comuni tra gli essere viventi, l'utilizzo dei biomarcatori è potenzialmente applicabile ad un gran numero di specie ed in molti tipi di ecosistemi (Shugart, 1995).

I biomarcatori possono essere utilizzati sia in studi di biomonitoraggio passivo, confrontando le risposte evidenziate in organismi campionati in un'area contaminata e in un'area di riferimento, sia in studi di tipo attivo con il trasferimento di bioindicatori in un'area di studio per un tempo sufficiente da indurre l'insorgere di una variazione. Inoltre i biomarcatori possono essere utilizzati in studi *in vitro* esponendo i bioindicatori a condizioni controllate per poter identificare le specifiche relazioni causa-effetto (Losso e Volpi Ghirardini, 2010).

I *biomarkers*, correttamente applicati, in un programma di biomonitoraggio sono in grado di (Wu *et al.*, 2005):

- fornire una stima dei livelli di contaminazione dell'ambiente collegata al tempo;
- identificare gli effetti avversi e d'esposizione ai contaminanti;
- mettere in relazione gli effetti biologici evidenziati con le conseguenze ambientali;
- considerare la variabilità e l'interazione dei contaminanti nell'ambiente.

Al contrario, numerosi sono gli svantaggi identificati nell'ultimo decennio (Schlenk, 1999; Leonzio *et al.*, 2003):

- i biomarcatori non sono applicabili a tutti gli organismi e a tutti i contaminanti;
- per molti *biomarkers* la relazione tra le risposte evidenziate e l'effetto reale rimane ancora sconosciuta;
- è necessario conoscere la fisiologia, la *life-history* della specie presa in esame;
- la variabilità tra gli individui è generalmente elevata;
- l'applicazione dei biomarcatori è limitata dalla disponibilità degli organismi e/o della specie;
- le risposte evidenziate possono dipendere da fattori naturali, quali variazioni di temperatura, stagione, età e sesso dell'individuo o essere correlate a situazioni di stress imputabili alle condizioni di campionamento;
- le risposte possono essere influenzate dai fenomeni di adattamento o dalla selezione del sito;
- risulta necessario un confronto tra il sito di studio e uno di riferimento;
- l'applicazione e l'interpretazione dei biomarcatori richiede esperienza;
- sono indispensabili dei protocolli standardizzati e universali.

1.1.2 BIOINDICATORI

Iserentant e De Sloover (1976) definiscono biondicatore quell'organismo o sistema biologico usato per valutare una modificazione, generalmente degenerativa, della qualità dell'ambiente. In maniera più specifica, i bioindicatori sono tutti gli organismi che mediante reazioni identificabili (biochimiche, fisiologiche, morfologiche, ecc.) forniscono informazioni sulla qualità dell'ambiente (o di una parte di esso) (Bargagli *et al.*, 1998). I bioindicatori possono pertanto costituire un segnale di "allerta precoce" di inquinamento, evidenziabile prima che questo si manifesti sull'intero ecosistema.

Affinché un organismo possa essere definito un buon bioindicatore deve possedere alcune caratteristiche fondamentali, quali (modificato da Zhou *et al.*, 2008):

- facile reperibilità stagionale e ampia distribuzione nell'area di studio, per effettuare numerosi campionamenti e confronti tra i siti;
- lungo ciclo vitale, per poter confrontare fra loro diverse classi d'età;
- sessilità o scarsa mobilità;

- capacità di bioaccumulare notevoli concentrazioni di inquinanti;
- omogeneità genetica.

Inoltre risultano necessarie adeguate conoscenze sull'anatomia, fisiologia ed ecologia della specie sia per la gestione dello studio sia per la valutazione dei biomarcatori.

I pesci e i molluschi sono a tutti gli effetti dei bioindicatori: nei loro tessuti si possono eventualmente riscontrare residui di fitofarmaci, pesticidi e contaminanti; inoltre, questi possono indurre modificazione nell'espressione di specifici geni, proteine nonché provocare alterazioni dell'omeostasi fisiologica se non, addirittura, la morte degli animali (Van der Oost *et al.*, 1996; Timbrell, 1998; Vainio, 1998).

1.2 DISTRUTTORI ENDOCRINI

I distruttori endocrini costituiscono un gruppo, strutturalmente non omogeneo, di composti che possono influenzare negativamente la salute degli uomini, delle specie selvatiche e di quelle ittiche, o le loro progenie, attraverso l'interazione con il sistema endocrino (Colborn *et al.*, 1993).

Vista la natura lipofilica e la persistenza ambientale di tali sostanze, i distruttori endocrini possono essere bioaccumulati e biomagnificati nei differenti comparti ambientali, incluso l'ecosistema marino (Arukwe *et al.*, 1996; Colborn, 1998; Lye, 2000; Matthiessen, 2003; Langston *et al.*, 2005).

A causa del loro largo impiego, essi vengono riversati nei corsi d'acqua in elevate quantità direttamente e indirettamente, ad esempio mediante effluenti non trattati, scarichi domestici e industriali oppure in seguito al dilavamento del suolo o per precipitazione con le piogge.

Attualmente, può essere stilata una lista molto estesa di sostanze che, pur avendo poco in comune sia strutturalmente sia per proprietà chimiche, possono interferire con i sistemi endocrini degli animali. Principalmente tale gruppo include contaminanti organici persistenti e pesticidi: composti organici utilizzati in passato in considerevoli quantità, specialmente nelle attività industriali e agricole, come i policlorobifenili (PCB) e i composti organoclorurati; ma anche alcune sostanze attualmente in uso, come plastificanti e surfattanti (Porte *et al.*, 2006).

Negli ambienti acquatici essi sono rappresentati sia da composti di origine naturale, come gli estrogeni steroidei (derivanti dal metabolismo umano e

animale) e i fitoestrogeni, sia da composti di sintesi, steroidei (etinilestradiolo, mestranolo) e non steroidei (pesticidi, alchilfenoli).

Soto *et al.* (1995) hanno ipotizzato che gli effetti sul sistema endocrino e riproduttivo delle sostanze inquinanti siano dovuti principalmente ad azioni di:

- imitazione degli effetti ormonali;
- antagonismo degli effetti ormonali;
- modifica della disponibilità dei recettori ormonali;
- alterazione dei pattern di sintesi e di metabolismo degli ormoni.

Seppure i meccanismi d'azione dei distruttori endocrini comprendano interazioni recettoriali, interazioni con enzimi e con il trasporto degli ormoni, influenze sull'asse ipotalamo-ipofisario, il tipo di effetto indotto da alcuni distruttori endocrini può variare con il sesso e l'età dell'organismo esposto ed esiste un'ampia gamma di effetti che prescindono dalla semplice competizione per il legame al recettore (Maranghi e Mantovani, 2003).

In base al meccanismo d'azione, Depledge e Billinghamurst (1999) propongono di suddividere i distruttori endocrini nelle seguenti categorie:

- a. estrogeni ambientali;
- b. anti-estrogeni ambientali;
- c. anti-androgeni ambientali;
- d. sostanze tossiche che riducono i livelli degli ormoni sessuali;
- e. sostanze tossiche che influiscono sulla riproduzione soprattutto con effetti sul sistema nervoso centrale;
- f. sostanze tossiche che influenzano la condizione ormonale.

Molti di questi composti hanno tra loro effetti contrastanti e risulta particolarmente difficile prevedere l'eventuale effetto dell'esposizione a miscele complesse presenti in ambiente.

Attualmente gli autori concordano nell'affermare che i distruttori endocrini sono parzialmente responsabili di alterazioni dell'attività riproduttiva e dello sviluppo nelle popolazioni selvatiche (Vos *et al.*, 2000) evidenziando come sia i vertebrati che gli invertebrati sono suscettibili alle loro azioni (Porte *et al.*, 2006).

1.2.1 EFFETTI DEI DISTRUTTORI ENDOCRINI

I distruttori endocrini costituiscono un rischio per la biodiversità animale in quanto possono produrre effetti avversi nella fauna selvatica, incluso il biota marino, e nell'uomo agendo anche a bassi livelli di esposizione; gli effetti nocivi dei distruttori endocrini includono anormale funzione tiroidea, alterazioni sessuali, diminuito successo riproduttivo e anomalie di sviluppo (Oberdörster e Cheek, 2001).

Lo sviluppo del fenomeno di *imposex* (imposizione di caratteristiche sessuali maschili - pene e dotto deferente - nelle femmine) nei gasteropodi esposti al tributilstagno (TBT) è considerato uno dei più lampanti esempi di induzione chimica svolta da un distruttore endocrino (Porte *et al.*, 2006).

STEROIDOGENESI E METABOLISMO

La variazione dei livelli di steroidi endogeni in organismi esposti a sostanze xenobiotiche può diventare un ulteriore indicatore di alterazioni nella sintesi degli steroidi e/o nel loro metabolismo.

Infatti, l'effetto di composti xenoestrogenici sulla steroidogenesi degli invertebrati è stato recentemente oggetto di numerosi studi (Porte *et al.*, 2006).

L'esposizione al cadmio o ai PCB porta al decremento di livelli di testosterone e progesterone nei ciechi pilorici, ma non nelle gonadi dell'echinoderma *Asterias rubens* (den Besten *et al.*, 1991). Invece nel crinoide *Antedon mediterranea* l'esposizione all'anti-androgeno CPA (cyproterone acetato) fa diminuire drasticamente i livelli di testosterone, ma non causa nessuna alterazione significativa di quelli di estradiolo (Lavado *et al.*, 2006a). Lo stesso composto influenza negativamente la crescita degli organi sessuali maschili e la spermatogenesi nei gasteropodi *Nucella lapillus* e *Nassarius reticulatus* (Tillmann *et al.*, 2001). Inoltre, l'esposizione al TBT ha comportato un decremento dei livelli di testosterone nel gasteropode *Littorina littorea* (Ronis e Mason, 1996), e un decremento nell'esterificazione del testosterone nel gasteropode *Ilyanassa obsoleta* (Gooding *et al.*, 2003).

Studi *in vitro* hanno permesso di dimostrare che il TBT inibisce l'attività della citocromo P450-aromatasi in *Ruditapes decussata* e *Crassostrea gigas* (Morcillo *et al.*, 1998; Le Curieux-Belfond *et al.*, 2001). Esposizioni *in vivo* e alcuni studi in campo hanno spesso associato l'esposizione al TBT con l'inibizione dell'attività enzimatica della citocromo P450-aromatasi in diverse specie di molluschi (Morcillo *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2002) e con l'induzione dell'enzima 17 β -idrossisteroide

deidrogenasi nel crostaceo *Neomysis integer* (Verslycke *et al.*, 2003). Tuttavia, Janer *et al.* (2004), esponendo dei mitili a differenti concentrazioni di estradiolo, hanno evidenziato l'esistenza di meccanismi che permettono agli organismi di mantenere i loro livelli ormonali stabili, nonché l'importante ruolo che l'esterificazione degli acidi grassi può svolgere all'interno di questi meccanismi.

Diverse prove suggeriscono che anche enzimi coinvolti nella steroidogenesi, enzimi di inattivazione, e perfino i recettori degli steroidi (Thornton *et al.*, 2003) possono avere un importante ruolo funzionale negli invertebrati e possono essere modulati da composti endogeni essendo potenziali bersagli di sostanze xenobiotiche: per questi motivi ulteriori studi si rendono quantomeno necessari (Porte *et al.*, 2006).

Sebbene siano stati condotti numerosi studi sugli effetti dei distruttori endogeni sulla steroidogenesi degli invertebrati, solo negli ultimi decenni alcuni autori hanno cercato di stabilire i possibili effetti degli inquinanti ambientali sullo sviluppo e sulla steroidogenesi dei pesci. Johnson *et al.* (1988) e Casillas *et al.* (1991) hanno dimostrato l'influenza degli inquinanti ambientali sullo sviluppo dell'ovario della sogliola *Parophrys vetulus* campionata nella regione di Puget Sound nel nordovest dell'Oceano Pacifico. In particolare, gli autori hanno evidenziato livelli molto bassi di estradiolo nel plasma delle femmine campionate nelle zone più inquinate.

Recentemente è stato dimostrato come il nonilfenolo possa innescare variazioni nelle vie metaboliche principali della steroidogenesi del salmone *Salmo salar* tali da poter indurre squilibri ormonali e alterare la riproduzione e la fecondità degli individui (Kortner *et al.*, 2009).

Non bisogna dimenticare però che il sistema endocrino presenta vie a feedback che agiscono come meccanismi omeostatici: un'alterazione osservata ad un certo livello della via metabolica potrebbe non essere dovuta a un'interazione diretta con sostanze xenobiotiche, ma rappresentare il risultato di meccanismi di regolazione indiretta.

STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo è una condizione dovuta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono essere prodotte dall'organismo anche in seguito all'assunzione di sostanze inquinanti (Ahmad *et al.*, 2000; Barata *et al.*, 2005). Tali contaminanti stimolano la produzione di ROS attraverso molteplici meccanismi d'azione, sia diretti che indiretti, che includono anche l'auto-

ossidazione, l'induzione enzimatica e la destabilizzazione dei sistemi di trasporto di membrana (Livingstone, 2001).

Le ROS, come il radicale superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale idrossilico ($\cdot OH$), e il radicale ossido nitrico ($NO\cdot$), sono generalmente prodotte durante il normale metabolismo. Per minimizzarne l'effetto tossico sulle componenti cellulari, gli organismi hanno sviluppato meccanismi di difesa antiossidanti. In condizioni di stress ossidativo, viene alterato l'equilibrio tra la produzione di ROS e la disponibilità di difese antiossidanti tanto da rendere inefficace l'azione di difesa (Franzini *et al.*, 2009). Tale squilibrio comporta inattivazione enzimatica, degradazione proteica, perossidazione lipidica e gravi danni agli acidi nucleici (Halliwell e Gutteridge, 1999).

In particolare, la perossidazione lipidica (LPO) è considerata il principale meccanismo di alterazione poiché comporta danni alle funzioni cellulari e alterazioni chimico-fisiche alle membrane cellulari sconvolgendo le funzioni vitali (Rikans e Hornbrook, 1997). La LPO porta alla distruzione dei lipidi di membrana a partire dalla sottrazione di un atomo di idrogeno da un acido grasso polinsaturo (PUFA) producendo lipidi perossidati e aldeidi α,β -insature come la 4-idrossi nonenale (4-HNE), l'acroleina e la malondialdeide (MDA). Le aldeidi prodotte nella LPO sono molecole chimicamente reattive e in grado di reagire e formare legami covalenti con le proteine e gli acidi nucleici contribuendo ad amplificare il danno radicalico (Franzini *et al.*, 2009).

La MDA viene generata dalla degradazione ossidativa dei PUFA con due o più doppi legami non coniugati e manifesta elevata affinità per proteine e DNA (Aldini *et al.*, 2007).

La 4-HNE è la principale aldeide generata in seguito all'attacco di radicali liberi su PUFA omega-6 (Uchida, 2003). La 4-HNE reagisce prontamente con proteine, peptidi, fosfolipidi e acidi nucleici per formare addotti stabili mediante introduzione di nuovi gruppi carbonilici (Uchida e Stadtman, 1992). La 4-HNE libera è metabolizzata in vari modi dalla cellula, può essere ridotta ad alcool, ossidata o formare complessi con il glutatione (GSH), spontaneamente o per azione di GSH-transferasi (Franzini *et al.*, 2009).

La formazione di gruppi carbonilici sulle proteine è considerato un ulteriore marcatore di stress ossidativo severo e generalizzato (Franzini *et al.*, 2009). I principali biomarcatori di ossidazione delle proteine sono i prodotti di ossidazione della tirosina (Tyr) con conseguente aggregazione proteica, come la 3-nitrotirosina (NO_2 -Tyr), che si forma in seguito a reazione con il monossido di azoto (NO) o l'anione perossinitrito (NO_3^-) (Franzini *et al.*, 2009).

Tali biomarcatori possono essere rilevati con specifici anticorpi utilizzati mediante tecniche Western blot e di immunoistochimica. Tuttavia, per la quantificazione della MDA nel plasma o nelle urine, viene utilizzato frequentemente il saggio dell'acido tiobarbiturico (TBA) per la determinazione spettrofotometrica della sostanza TBA reattiva (*TBA-reactive substance*, TBARS).

Data la molteplicità dei bersagli delle ROS e il complesso metabolismo al quale vanno incontro i prodotti delle loro reazioni, è verosimile che l'insieme di più marcatori sia più informativo di uno solo, anche perché ognuno di essi rispecchia una sfaccettatura dell'intero fenomeno (Franzini *et al.*, 2009).

1.2.2 ALTRI BIOMARCATORI

Da qualche anno i tradizionali biomarcatori ambientali sono stati affiancati da una serie di *biomarker* indotti dai principali contaminanti ambientali: molecole chiave coinvolte nei processi riproduttivi - vitellogenina (VTG), proteine della zona radiata (ZRP), recettori per l'estradiolo e aromatasi P450, catepsine D (CATD) - o nei processi di detossificazione - citocromo CYP1A1 - e di regolazione dell'omeostasi cellulare - *Heat Shock Protein* (HSP70) - a seguito di esposizioni ad agenti stressogeni.

VITELLOGENINA (VTG)

La VTG è una fosfolipopoglicoproteina che rappresenta il precursore principale del tuorlo, la maggior riserva energetica per lo sviluppo embrionale nei vertebrati ovipari. A seguito della stimolazione del 17 β -estradiolo, la VTG viene sintetizzata nel fegato e rilasciata in circolo per raggiungere l'ovario dove viene assimilata negli oociti mediante endocitosi mediata da recettori (Carnevali e Maradonna, 2007).

Essendo sintetizzata negli individui di sesso femminile in corso di maturazione sessuale, la VTG non è normalmente misurabile nelle femmine immature e nei maschi. Nei maschi il gene VTG, sebbene presente, è normalmente silente, tuttavia sostanze xenoestrogene possono legarsi con elevata affinità ai recettori per l'estradiolo (ER) ed innescare i tipici processi cellulari mediati dall'ormone endogeno che comportano la trascrizione del gene VTG anche nei maschi. Pertanto, l'induzione di VTG è considerata un efficace biomarcatore d'esposizione a composti estrogenici sia in pesci che in invertebrati marini (per *review* - Nicolas, 1999; Matozzo *et al.*, 2008), come è stato dimostrato da numerosi studi

condotti sia in campo che in laboratorio. Ad esempio, elevati livelli di induzione sono stati osservati nei maschi adulti di pesce spada *Xiphias gladius* e nel tonno *Thunnus thynnus* nel Mar Mediterraneo (Fossi *et al.*, 2002). Pampanin *et al.* (2005) hanno osservato elevati livelli di proteine VTG-like nell'emolinfa di esemplari maschi di mitilo *Mytilus galloprovincialis* campionati nei canali del centro storico di Venezia con un incremento molto superiore a quanto riscontrato nelle femmine nel medesimo periodo e negli stessi siti.

Numerosi sono anche gli studi di laboratorio condotti per identificare gli effetti di contaminanti ambientali con proprietà estrogeniche sulla riproduzione dei pesci e dei molluschi. Fra i composti analizzati, il nonilfenolo (NP), utilizzato nella produzione di etossilati, fosfiti ed insetticidi ad uso agricolo e domestico (Granmo *et al.*, 1989; Maguire, 1999), è il composto maggiormente testato. Il NP è in grado di mimare l'azione degli estrogeni endogeni legandosi con i recettori specifici (Arukwe *et al.*, 1997; Billinghamurst *et al.*, 2000; Madigou *et al.*, 2001), inducendo anche la sintesi di vitellogenina nei maschi dei pesci esposti a tale contaminante, con potenziali conseguenze deleterie sulla *sex ratio* e sulla riproduzione (Purdom *et al.*, 1994; Christensen *et al.*, 1999). Un incremento significativo dei livelli di proteine VTG-like sia in emolinfa che in ghiandola digestiva di maschi di *Tapes philippinarum* è stato osservato a seguito di esposizione a concentrazioni sub letali di NP (Matozzo e Marin, 2005).

Simili sono comunque le caratteristiche di tale proteine tra i vertebrati, come i pesci (Nagler *et al.*, 1987), e gli invertebrati, in particolar modo i molluschi (Blaise *et al.*, 1999).

Diverse sono le forme di vitellogenina identificate nell'ultimo decennio nei vertebrati. Inizialmente la presenza di due forme distinte di VTG, funzionalmente differenti, è stata osservata in *Fundulus heteroclitus* con la sigla Vg I e Vg II (LaFleur *et al.*, 1995). In tilapia *Oreochromis mossambicus*, Takemura e Kim (2001) osservarono che le due forme, denominate VTG120 e VTG140, esibivano differente sensibilità al 17 β -estradiolo (E2). Differente sensibilità all'E2 è stata successivamente riportata anche per le due forme Vg-530 e Vg-320 isolate in *Acanthogobius flamimanus* (Ohkubo *et al.*, 2003). Recentemente è stata proposta la seguente classificazione: VgA, VgB e VgC, quest'ultima denominata anche *Pv-less*, poiché priva del dominio fosvitina (Pv). Le forme differenziano tra loro poiché la catena pesante di lipovitellina (LvH) della forma VgB non viene degradata o solo parzialmente idrolizzata durante la maturazione degli oociti (Hiramatsu *et al.*, 2002; 2006).

Nonostante siano stati condotti numerosi studi nell'ultimo decennio, rimane tutt'ora da chiarire pienamente il ruolo biologico delle diverse forme riscontrate e il potenziale effetto dei distruttori endocrini su tali forme. Tuttavia, la vitellogenina rimane il principale biomarcatore utilizzato in studi di biomonitoraggio ambientale.

CITOCROMO P450 1A1 (CYP1A1)

La citocromo P450 1A costituisce una famiglia ubiquitaria di proteine associate al processo di detossificazione dei composti organici quali policlorobifenili (PCB), idrocarburi policiclici aromatici (PAH) e diossine (Carnevali e Maradonna, 2007).

La biotrasformazione dei composti chimici lipofilici è un requisito indispensabile per i processi di detossificazione ed escrezione in invertebrati e pesci ed è noto che l'induzione della citocromo epatica P450 1A1 facilita tale escrezione (Carnevali e Maradonna, 2007). PAH e diossine inducono la sintesi della citocromo P450 1A1, pertanto elevati valori di espressione nei pesci sono considerati efficaci biomarcatori costituendo un segnale d'allerta precoce d'esposizione a tali composti tossici (Carnevali e Maradonna, 2007). Il gene che codifica la citocromo P450 1A1 viene comunemente indicato con la sigla CYP1A1. In generale, la sostanza tossica inizialmente si lega al recettore citosolico *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AhR) (Tian *et al.*, 2002), inducendone la traslocazione nel nucleo dove AhR si dimerizza con la proteina nucleare ARNT (*AhR Nuclear Translocator*) (Hoffman *et al.*, 1991). L'eterodimero è in grado di legarsi al DNA in una regione denominata XRE (*Xenobiotic Responsive Element*) e modulare l'espressione dei geni controllati da tale regione, come CYP1A1 (Carnevali e Maradonna, 2007).

L'induzione degli enzimi CYP in risposta a PAH sono stati ampiamente studiati e documentati (Nebert e Gonzales, 1987; Ioannides e Parke, 1993), mentre solo recentemente sono disponibili dati inerenti all'esposizione a xenoestrogeni (Navas e Segner, 2000; Maradonna *et al.*, 2004; Cionna *et al.*, 2006), che hanno evidenziato l'azione inibente dell'estradiolo sull'espressione genica di CYP1A1. Per spiegare l'azione riducente dell'estradiolo sono state formulate diverse ipotesi: 1) gli steroidi possono legare la proteina P450 1A1 (Chan e Hoixebone, 1995) e, mediante tale legame, l'estradiolo potrebbe inibire l'attività catalitica della stessa (Gray *et al.*, 1991); 2) l'attività inibitoria dell'estradiolo potrebbe essere mediata dal complesso recettore-estradiolo (ER-E2) che può interferire direttamente con il gene CYP1A1 o, in alternativa, può interagire con il recettore AhR (Navas e Segner, 2000); 3) l'esposizione potrebbe causare il coinvolgimento del repressore

di AhR (AhRR), polipeptide isolato nel 1999 da Mimura *et al.*, il quale è in grado di reprimere l'attività di AhR formando un eterodimero con ARNT e competendo con AhR per il legame con la regione XRE.

Heat Shock Protein (HSP)

Le *Heat Shock Protein* (HSP) sono una famiglia di proteine altamente conservata lungo la scala zoologica (Welch, 1993).

Esse hanno il compito di garantire il corretto ripiegamento delle proteine e di facilitarne il trasporto all'interno dei diversi compartimenti cellulari; inducono termo tolleranza contro forti stress termici (Mosser e Boole, 1998) ed, inoltre, hanno un ruolo fondamentale nell'interazione tra gli ormoni steroidei e i loro recettori (Welch, 1993).

Le HSP sono state suddivise principalmente in tre famiglie in base al loro peso molecolare, determinato mediante elettroforesi:

- HSP90: di peso molecolare compreso tra i 85 kDa e i 90 kDa. Esse svolgono un ruolo di sostegno tra alcuni componenti del citoscheletro e gli enzimi ed i recettori per gli ormoni steroidei;
- HSP70: di peso molecolare compreso tra i 68 kDa e i 73 kDa. Esse garantiscono il corretto ripiegamento della struttura proteica; assistono la sintesi della catena polipeptidica; agiscono come *chaperon* molecolari; mediano alla riparazione o alla degradazione di proteine alterate o denaturate;
- HSP a basso peso molecolare: di peso molecolare compreso tra i 16 kDa e i 47 kDa. Tale famiglia comprende HSP con funzioni specie-specifiche e sembra agiscano da *chaperon* molecolari e impediscano l'aggregazione proteica irreversibile.

Nei pesci, come nei mammiferi, le HSP sono normalmente presenti nelle cellule nella forma costitutiva (HSC), con il compito di regolare il metabolismo proteico e l'omeostasi cellulare (Fink e Goto, 1998), mentre l'espressione della forma inducibile (HSP) è evidenziabile a livello cellulare in conseguenza di uno stress acuto (Yamashita *et al.*, 2004), dove innescano alterazioni strutturali e funzionali delle proteine cellulari. Tuttavia, le HSP a basso peso molecolare non sembrano avere una forma costitutiva poiché indotte solamente dopo un evento stressante (Ciocca *et al.*, 1993).

Sebbene le HSP abbiano un'emivita relativamente molto breve (ad esempio, 6-9 ore nel moscerino *Drosophila*; Lindquist, 1986), il loro livello rimane elevato anche molto tempo dopo il termine dell'evento stressante, motivo per cui è stato

ipotizzato che possano svolgere un ruolo importante nell'adattamento a lungo termine degli animali all'ambiente (Parsell e Lindquist, 1993; Morimoto e Santoro, 1998).

1.3 LAGUNA DI VENEZIA

La Laguna di Venezia è uno degli ambienti di transizione più estesi del Mar Mediterraneo ricoprendo un'area di circa 550 Km². Essendo collegata al Mar Adriatico mediante tre bocche di porto, la Laguna di Venezia viene comunemente suddivisa in tre bacini. Recentemente è stata proposta la distinzione del bacino nord, delimitato dalla bocca di porto di Lido, in due sub-bacini, pertanto la Laguna di Venezia verrebbe ad essere suddivisa in quattro bacini: il bacino nord di Treporti (150 Km²), il bacino centro-nord di Lido (100 km²), il bacino centrale di Malamocco (170 Km²) e il bacino sud di Chioggia (130 Km²) (Tagliapietra e Volpi Ghirardini, 2006) (Fig. 1).

La Laguna di Venezia è caratterizzata da un complesso dinamismo e da un'elevata variabilità che include ambienti estuarini e marini, paludi salmastre e complessi antropici come la città di Venezia e la zona industriale di Porto Marghera (Ravera, 2000).

Come indicato da Losso e Volpi Ghirardini (2010), negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi ecotossicologici in Laguna di Venezia, i quali confermano la presenza di un'ampia gamma di contaminanti. Le principali fonti di inquinamento in Laguna di Venezia sono costituite da: l'apporto fluviale; l'erosione del suolo; le precipitazioni atmosferiche; gli effluenti della città di Venezia e dell'area industriale di Porto Marghera e delle zone limitrofe e l'apporto del Canale dei Petroli (Apitz *et al.*, 2007). In particolare, i livelli di rischio risultano più bassi nel bacino sud e più alti nel bacino centro/nord, essendo la zona più prossima ai canali di Porto Marghera e della città di Venezia (Apitz *et al.*, 2007).

Per realizzare tali studi, a partire dal 1990 i seguenti organismi sono stati selezionati e utilizzati come bioindicatori: batteri; alghe; policheti; echinodermi; molluschi bivalvi e gasteropodi; crostacei e pesci (Losso e Volpi Ghirardini, 2010). In particolare, la vongola *Tapes philippinarum* è stata utilizzata in studi di monitoraggio sia attivi che passivi analizzando biomarcatori biochimici, fisiologici e cellulari, ma non genetici; mentre il pesce bentonico *Zosterisessor ophiocephalus* è stato utilizzato in studi genetici, fisiologici e biochimici (Losso e Volpi Ghirardini, 2010).

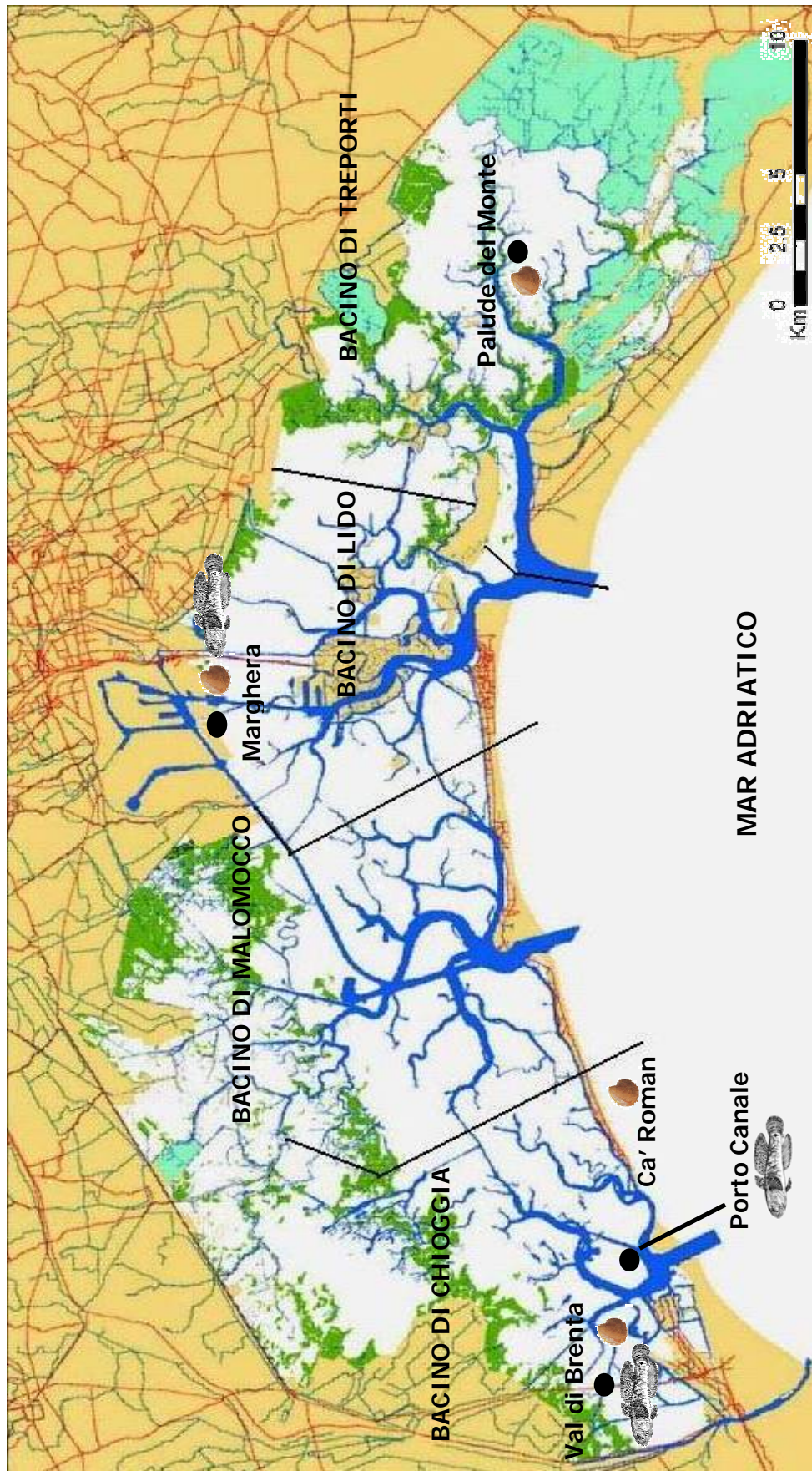


Fig. 1 – Mappa della Laguna di Venezia (mod. da Losso e Volpi Ghirardini, 2010). I tratti segnalano la suddivisione in bacini e i pallini i siti di campionamento: ● prelievo di *Tapes philippinarum*; ● prelievo di *Zosterisessor ophiocephalus*.

1.3.1 *Zosterisessor ophiocephalus*



Classe ACTINOPTERYGII
Ordine PERCIFORMES
Famiglia GOBIIDAE
Genere *Zosterisessor*
Sottogenere *ophiocephalus*
Specie
Zosterisessor ophiocephalus

Fig. 2 – *Zosterisessor ophiocephalus*

Zosterisessor ophiocephalus è un tipico gobide eurialino molto comune in Laguna di Venezia, la cui presenza viene registrata tutto l'anno (De Girolamo, 1994) (Fig. 2).

Z. ophiocephalus può raggiungere i 25 cm di lunghezza totale e può vivere fino ai cinque anni d'età (Gandolfi *et al.*, 1991).

Vive in acque poche profonde caratterizzate da un'ampia copertura di praterie di fanerogame marine (*Zostera noltii* e *Zostera marina*), che costituiscono l'habitat ideale per la riproduzione e per trascorrere l'inverno (Poltronieri, 2000). Nei mesi più freddi, ogni individuo scava nel fango una tana verticale nella quale si rifugia attendendo temperature meno rigide e, nel periodo riproduttivo, i maschi costituiscono tane con diversa struttura con un'ampia camera sotterranea comunicante con l'esterno grazie ad uno, o spesso, due cunicoli (Poltronieri, 2000). Comunemente, gli accessi sono ben nascosti da abbondante vegetazione (Gandolfi *et al.*, 1991).

Essendo un pesce di piccola taglia ad habitus bentonico, *Z. ophiocephalus* si è dimostrato un efficace bioindicatore utilizzato ampiamente in programmi di biomonitoraggio in Laguna di Venezia (Losso e Volpi Ghirardini, 2010).

ANATOMIA

I gobidi hanno un corpo tozzo rivestito da un abbondante strato mucoso con capo ingrossato, guance arrotondate e prominenti, ed occhi ravvicinati e sporgenti, posti in posizione dorso-laterale (Poltronieri, 2000). *Z. ophiocephalus* presenta colorazione di fondo bruno-olivastra, tendente al giallo nella regione ventrale, con macchie scure irregolari nella porzione latero-dorsale (Poltronieri, 2000).

Caratteristica peculiare di tutte le specie è la presenza un disco pelvico utilizzato come organo adesivo e formato dalla fusione delle pinne ventrali.

La maggior parte delle specie è gonocorica ma sono state descritte specie ermafrodite sia contemporanee che successive (Miller, 1984). Nella maggior parte delle specie, il sesso è distinguibile grazie alla forma della papilla genitale: conica ed allungata nei maschi, tronca e arrotondata nelle femmine (Gandolfi *et al.*, 1991).

BIOLOGIA DELLA RIPRODUZIONE

Z. ophiocephalus raggiunge la maturità sessuale fin dal primo anno di vita (De Girolamo, 1994).

La stagione riproduttiva inizia a marzo e si protrae fino a maggio-giugno (Poltronieri, 2000). In questo periodo i maschi costruiscono e difendono un nido. Il maschio accoglie nella sua tana diverse femmine pronte alla deposizione: le uova vengono deposte sulle radici di *Zostera* che sporgono dal soffitto della camera (Poltronieri, 2000).

Sia durante il corteggiamento che durante l'accoppiamento è stato osservato che i maschi strofinano la papilla genitale sul soffitto del nido (Breder e Rosen, 1966). Tale comportamento è associato al rilascio di tracce spermatiche, ossia bande mucose all'interno delle quali sono invischiati gli spermatozoi che si dissolvono gradatamente nell'acqua durante la deposizione delle uova (Scaggiante, 1995; Marconato *et al.*, 1996). Le mucosostanze presenti nelle tracce spermatiche sono prodotte dalle vescicole seminali, strutture accessorie dell'apparato riproduttore maschile (Mazzoldi, 1999; Scaggiante *et al.*, 1999).

Al termine della deposizione, le femmine lasciano il nido, mentre il maschio si occupa della difesa del nido e delle cure parentali, che si protraggono fino alla schiusa delle uova. Lo sviluppo embrionale a 15 °C si completa in 9-10 giorni (De Girolamo, 1994).

Il sistema di accoppiamento è poliginico e i maschi hanno sviluppato tattiche riproduttive alternative: i maschi di taglia maggiore si comportano generalmente da maschi nidificanti mentre quelli di piccola taglia adottano strategie di tipo opportunistico tendendo a sfruttare gli accoppiamenti dei maschi parentali (Scaggiante *et al.*, 1999).

1.3.2 *Tapes philippinarum*



Classe BIVALVIA
Sottoclasse HETERODONTA
Ordine VENEROIDA
Famiglia VENERIDAE
Genere *Tapes*
Sottogenere *Ruditapes*
Specie *Tapes philippinarum*

Fig. 3 – *Tapes philippinarum*

Tapes philippinarum (Adams e Reeve, 1850), chiamato comunemente "vongola filippina o verace", è un mollusco bivalve fossorio della famiglia dei Veneridi (Fig. 3). Di origini asiatiche, è stato introdotto in Laguna di Venezia nel 1983 a scopo sperimentale in prospettiva di un possibile sfruttamento commerciale (Cesari e Pellizzato, 1990). Grazie alla sua elevata adattabilità ambientale e agli alti tassi di accrescimento, si è assistito ad una progressiva diffusione della specie nelle aree lagunari della costa adriatica (Laguna di Marano, Laguna di Caleri, Sacca di Scardovari, Sacca di Goro e Laguna di Varano). Attualmente, *T. philippinarum* ha pressoché soppiantato la specie autoctona *Tapes decussatus* (Linneus, 1758), che si differenzia per l'assenza di una sculturazione ben differenziata della conchiglia e per la mancata fusione dei sifoni. *T. philippinarum* predilige substrati sabbioso-fangosi, di zone intertidali o subtidali, dove è diventato oggetto di pesca e di allevamento, rivestendo una grande importanza economica.

In quanto filtratore, *T. philippinarum* è un efficace bioindicatore: è in grado di accumulare una vasta gamma di contaminanti, risultando tollerante, ma non insensibile, alla loro presenza in ambiente. Per queste sue caratteristiche è stato recentemente utilizzato sia in studi di laboratorio (Matozzo *et al.*, 2003, 2004; Matozzo e Marin, 2005), dove si è dimostrato un buon modello per indagini ecotossicologiche, sia in programmi di biomonitoraggio quale indicatore della qualità ambientale (Nasci *et al.*, 2000; Da Ros e Nesto, 2005; Matozzo *et al.*, 2005).

ANATOMIA

L'anatomia di *T. philippinarum* è stata descritta dettagliatamente da Cesari e Pellizzato nel 1990 (Fig. 4).

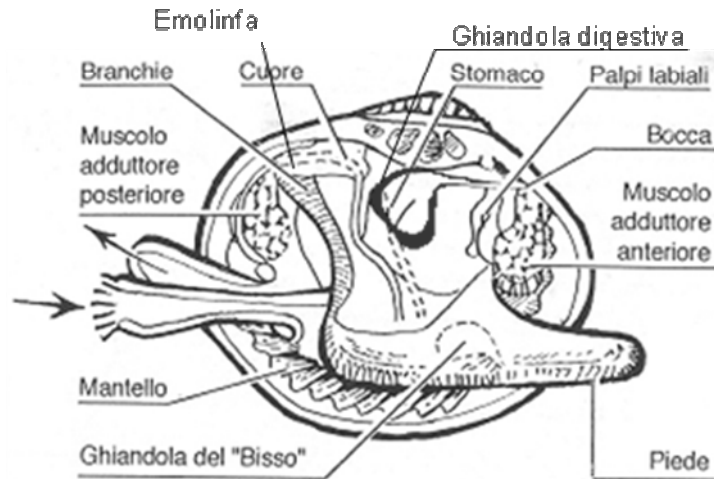


Fig. 4 – Anatomia di *Tapes philippinarum* (mod. da Cesari e Pellizzato, 1990).

I bivalvi sono molluschi caratterizzati dalla costante presenza di una conchiglia composta da due valve distinte ed incernierate tra loro mediante legamenti ed incastrati. L'apertura e la chiusura delle valve avviene mediante l'azione di robusti muscoli dorsali, detti muscoli adduttori.

Il corpo ha uno sviluppo orizzontale ed è delimitato esternamente da due lembi di tessuto denominati mantello o pallio, predisposti anche alla formazione delle valve. Il piede si dilata per effetto della pressione sanguigna e può fungere da strumento di scavo dei substrati sabbiosi o fangosi.

Nei bivalvi le branchie sono molto sviluppate ed hanno struttura lamellare. Le branchie, oltre ad assolvere alla funzione di organo respiratorio, sono generalmente adibite alla raccolta del cibo mediante il filtraggio dell'acqua attraverso i sifoni. La digestione è prevalentemente di tipo endocellulare. L'apertura boccale è seguita da un breve esofago che porta direttamente allo stomaco, circondato da un ghiandola digestiva che è l'organo principale della digestione endocellulare attraverso gli enzimi che le pareti gastriche provvedono a secernere.

BIOLOGIA DELLA RIPRODUZIONE

La biologia della riproduzione di *T. philippinarum* è stata descritta dettagliatamente da Devauchelle nel 1990.

Le vongole sono rigorosamente gonocoriche e, benché siano stati segnalati alcuni casi di ermafroditismo, questi sono estremamente rari. Sia i maschi che le femmine raggiungono la prima maturità sessuale tra i 15 e i 20 mm, all'età di un anno. A quest'età, tuttavia, la crescita risulta privilegiata rispetto alla riproduzione, mentre nel secondo anno di vita il rapporto si inverte. La fecondità aumenta con l'età mentre la crescita somatica assorbe meno energia che negli stadi giovanili.

Le gonadi maschili e femminili sono costituite da tessuto diffuso strettamente legato all'apparato digestivo che, a maturazione, forma una massa biancastra omogenea e molle. Il tessuto riproduttivo deriva da una differenziazione del mesoderma. Sul piano anatomico, esso comprende un sistema di canalicoli o acini molto ramificati (gonade maschile rappresentata in Fig. 5); i canali si uniscono, formano dotti più grandi i quali, a loro volta, si uniscono in un unico dotto escretore ciliato collegato direttamente all'uretra.



Fig. 5 - Organizzazione della gonade maschile: spermatozoi (Sp) raggruppati a rosetta al centro degli acini. Td = tubo digerente; A = acino (mod. da Devauchelle, 1990).

Gli acini, o canalicoli, sono formati da epitelio germinale sostenuto da tessuto connettivo che funge da protezione. Le cellule germinali maschili e femminili si differenziano all'interno del tessuto germinale. A ridosso della parete degli acini si trovano delle cellule nutritive, rare nei maschi, più numerose nelle femmine. L'insieme di queste cellule nutritive che circondano l'ovocita costituiscono il follicolo.

L'evoluzione dei gameti nei diversi canalicoli avviene simultaneamente, mentre si osservano spesso differenze tra gli stadi di maturazione raggiunti dai diversi individui. Al momento del riposo sessuale il sesso può non essere determinabile poiché non è evidenziabile alcun follicolo e il tessuto connettivo di riserva può essere molto abbondante (gonade femmine rappresentate in Fig. 6).

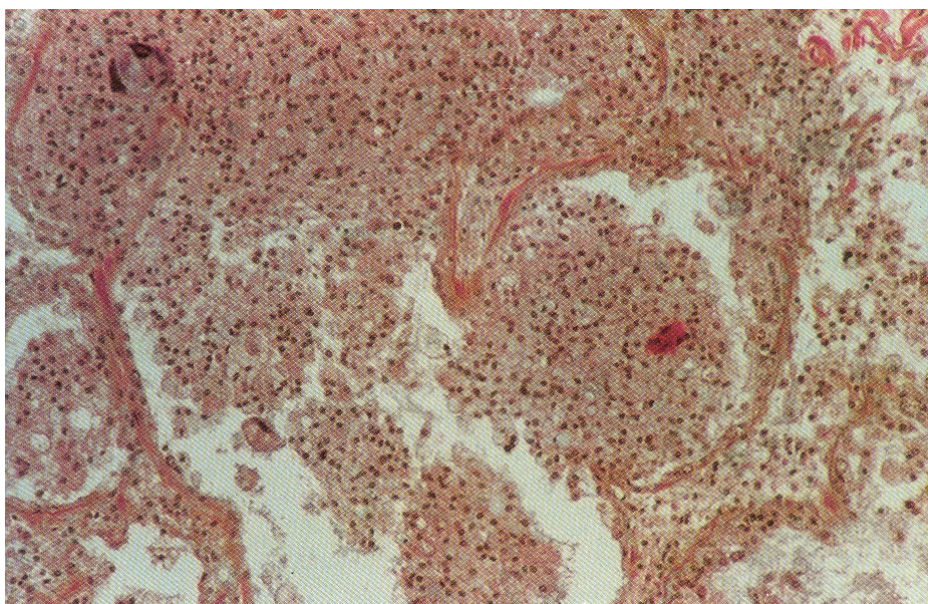


Fig. 6 - Aspetto della gonade femminile durante il periodo di riposo sessuale (Devauchelle, 1990).

CICLO GAMETOGENETICO

Il ciclo gametogenetico di *T. philippinarum* in Laguna di Venezia è stato descritto da Meneghetti *et al.* (2004).

Secondo le indicazioni di Valli *et al.* (1996) si possono distinguere le seguenti fasi di sviluppo delle gonadi: stadio I – gametogenesi iniziale; stadio II – gametogenesi avanzata; stadio III – maturità sessuale; stadio IV – emissione dei gameti; stadio V – gonade svuotata parzialmente; stadio 0 – gonade svuotata completamente. Meneghetti *et al.* (2004) hanno osservato la percentuale più elevata di esemplari in riposo sessuale a dicembre, ma l'attività sessuale di *T. philippinarum* è quiescente da ottobre a gennaio. L'inizio della gametogenesi è stato rilevato a gennaio, mentre tra marzo e luglio si osserva lo stadio di gametogenesi avanzata. La maturità sessuale inizia ad aprile e si protrae fino ad agosto e, a partire da maggio per tutto il periodo estivo fino a settembre, si riscontrano individui in fase di emissione (Fig. 7).

Tuttavia, il ciclo gametogenetico dei bivalvi marini è fortemente influenzato da fattori endogeni ed esogeni (Giese, 1959; Adiyodi e Adiyodi, 1983). Fattori come latitudine e temperatura possono influenzare l'instaurarsi e la durata delle fasi di maturità, emissione e riposo sessuale, come dimostrato da diversi studi condotti negli anni '50 e '70 su *T. philippinarum* (Yamamoto e Iawata, 1956; Ohba, 1959; Holland e Chew, 1974). Studi più recenti hanno dimostrato che il ciclo riproduttivo dei bivalvi è influenzato anche da altri parametri ambientali, come la salinità, il fotoperiodo e la disponibilità di cibo (Rodriguez-Moscoso *et al.*, 1992; Urratia *et al.*, 1999). Inoltre, alterazioni della struttura e della composizione del tessuto riproduttivo e dei gameti sono state associate all'esposizione a contaminanti ambientali di origine antropica (Lowe, 1988; Clark *et al.*, 2000).

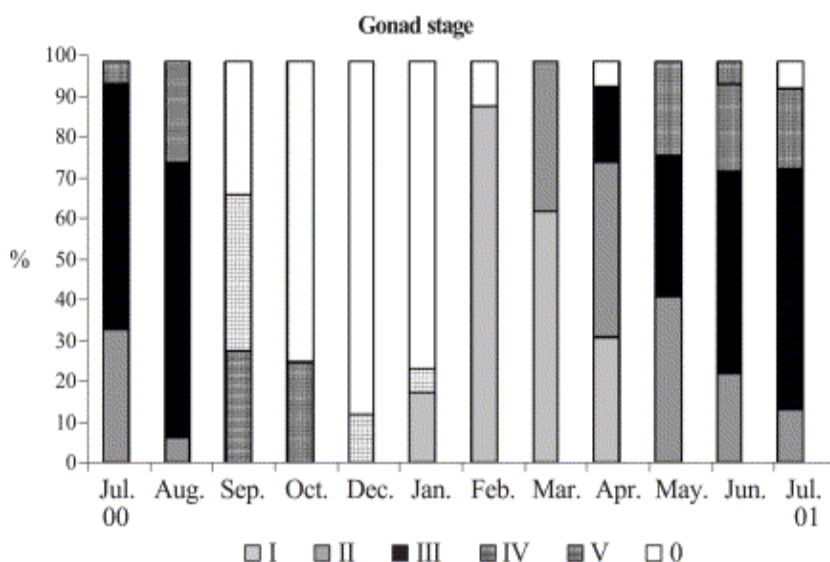


Fig. 7 – Stadi del ciclo riproduttivo di *Tapes philippinarum*. La percentuale di organismi corrispondenti a ciascun stadio è stata identificata utilizzando differenti barre. Legenda: I, gametogenesi iniziale; II, gametogenesi avanzata; III, maturità; IV, emissione; V, svuotamento parziale; 0, riposo sessuale (Meneghetti *et al.*, 2004).

2. SCOPO

Gli ambienti costieri e di transizione sono ecosistemi marini tra i più produttivi al mondo e maggiormente influenzati dalle azioni antropologiche; pertanto diviene fondamentale conoscere in modo dettagliato e completo la possibile contaminazione ambientale e il relativo significato biologico ed ecologico (Chapman e Wang, 2001).

Essendo la Laguna di Venezia un ambiente ad elevato impatto antropico, lo scopo del presente studio è stato di valutare, in pesci e molluschi prelevati in due periodi dell'anno e in diversi siti della Laguna di Venezia, l'espressione di alcuni bioindicatori comunemente utilizzati in programmi di biomonitoraggio. Tali siti sono stati individuati allo scopo di monitorare aree diverse che, per la loro collocazione e per le caratteristiche idrologiche, possono essere più o meno soggette a possibili fonti inquinanti.

Le specie monitorate sono state il pesce bentonico *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei: Gobiidae) e la vongola verace *Tapes philippinarum*, entrambi buoni modelli per condurre studi di biomonitoraggio essendo animali che vivono a stretto contatto con il fondo, stanziali e reperibili in Laguna di Venezia.

In entrambe le specie sono stati valutati i livelli di steroidi sessuali, quali testosterone, estradiolo e progesterone, mediante analisi radioimmunologica (RIA), al fine di verificare eventuali variazioni imputabili alla presenza nell'ambiente di sostanze inquinanti in grado di interferire con il sistema endocrino degli organismi.

Parallelamente in *Z. ophiocephalus* sono stati testati alcuni bioindicatori di inquinamento ambientale: nel primo campionamento (primavera) è stata valutata, mediante Real Time, l'espressione dell'mRNA delle *Heat Shock Protein* (HSP) e della citocromo P450 1A1 (CYP1A1); nel secondo campionamento (autunno) sono stati presi in esame alcuni marcatori dello stress ossidativo, quali 4-idrossi-2-nonenale (HNE), nitrotirosina (NT), acroleina e malondialdeide essendo lo stress ossidativo indotto anche a seguito dell'assunzione di sostanze inquinanti. Inoltre, in entrambi i campionamenti, è stata valutata, mediante Western blot, l'espressione della proteina vitellogenina, bioindicatore ampiamente utilizzato in studi di biomonitoraggio.

Infine, presso la Stazione Idrobiologica del Dipartimento di Biologia (Chioggia), sono state allestite delle vasche con acqua di mare artificiale allo

Scopo

scopo di tabulare alcuni individui di *Z. ophiocephalus* per un periodo sufficiente a detossificarsi, al fine di consentire una comparazione non solo tra i diversi siti di campionamento ma anche rispetto ad un controllo privo di contaminanti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Lo studio è stato condotto su individui di *Zosterisessor ophiocephalus* e *Tapes philippinarum* prelevati da differenti siti della Laguna di Venezia in due periodi dell'anno al fine di monitorare tali aree che per la loro collocazione e per le caratteristiche idrologiche possono essere più o meno soggette a possibili fonti inquinanti.

3.1.1 *Zosterisessor ophiocephalus*

Gli individui di *Z. ophiocephalus* sono stati prelevati da tre differenti siti della Laguna di Venezia: Val di Brenta e Porto Canale, nella laguna sud, e Marghera, nella laguna centrale, in primavera (primo campionamento) ed autunno (secondo campionamento) servendosi di pescatori locali e di bertovelli.

Da 14 animali per sito (7 maschi e 7 femmine) sono stati prelevati: cute, branchie, fegato, intestino, milza, muscolo, rene, ovaio, testicolo e plasma.

In particolare, un campione di sangue è stato prelevato dalla vena caudale ed è stato posto in provette con anticoagulante (EDTA), successivamente centrifugato al fine di separare il plasma dalla parte corpuscolata e mantenuto a -20 °C fino al momento delle analisi (espressione proteica di VTG mediante Western blot). Dopo il prelievo di sangue i pesci sono stati sacrificati tramite rapida recisione del midollo spinale.

I campioni di cute, branchie, fegato, intestino, milza, muscolo, rene, ovaio e testicolo sono stati fissati *overnight* a +4 °C in paraformaldeide al 4% preparata in PBS *phospate buffered saline* (0,1M pH 7,4) e processati per essere sottoposti ad analisi immunostochimica volta a valutare la forma inducibile delle HSP70 (sezioni di muscolo e cute) e i marcatori dello stress ossidativo (sezioni di branchie, fegato, intestino, milza, muscolo, rene, ovaio e testicolo).

Un'ulteriore porzione di fegato è stata immediatamente congelata in azoto liquido e mantenuta a -80 °C fino al momento delle analisi. I campioni sono stati sottoposti a RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*), seguita da un'analisi di Real Time PCR per valutare l'espressione dei geni target HSP70 e CYP1A1 e ad

analisi di Western blot per valutare l'espressione dei marcatori dello stress ossidativo.

Per il dosaggio degli ormoni steroidei (testosterone, estradiolo e progesterone), oltre alla porzione di muscolo proveniente dai 7 maschi e 7 femmine per sito, sono stati campionati, quando disponibili, altri animali e prelevate ulteriori porzioni di muscolo immediatamente congelate a -20 °C fino al momento delle analisi.

Parallelamente ai campionamenti, presso la Stazione Idrobiologica del Dipartimento di Biologia (Chioggia), sono state allestite delle vasche con acqua di mare artificiale allo scopo di stabulare degli animali per un periodo sufficiente (circa un mese) a detossificarsi, al termine del quale gli animali sono stati sacrificati e sono stati effettuati prelievi di tessuti e di plasma come descritto precedentemente. L'esperimento di detossificazione è stato condotto al fine di consentire una comparazione non solo tra i diversi siti di campionamento ma anche rispetto ad un controllo privo di contaminanti.

3.1.2 *Tapes philippinarum*

Le vongole *T. philippinarum* sono state prelevate da 4 siti della Laguna di Venezia: tre corrispondenti o in vicinanza di quelli utilizzati per le raccolte di *Z. ophiocephalus* (Valle di Brenta, Cà Roman e Marghera) e uno localizzato nella parte più settentrionale della Laguna: Palude del Monte.

Seguendo le indicazioni di Meneghetti *et al.* (2004) sulla stadiazione gonadica della vongola in Laguna di Venezia, i campionamenti sono stati compiuti in due differenti periodi del ciclo annuale gametogenico: in primavera, per verificare i livelli di steroidi sessuali durante la gametogenesi, e in autunno, per quantificare gli stessi steroidi al momento del riposo sessuale.

I campionamenti sono stati replicati per due anni consecutivi, nel 2007 e nel 2008, misurando in tutti i siti e per ogni campionamento parametri quali temperatura e salinità dell'acqua.

Le vongole, da 6 a 17 individui a seconda della disponibilità, sono state raccolte servendosi di un pescatore locale mediante l'utilizzo di un attrezzo caratteristico, la "rasca", e trasferite in contenitori refrigerati presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie.

Per ciascun animale si è cercato di definire il sesso mediante osservazione al microscopio ottico di una porzione di materiale gonadico e riconoscimento dei gameti (ovociti e spermatozoi). Una volta identificato il sesso, ove possibile, da

ciascun individuo è stata prelevata la ghiandola digestiva. I campioni così raccolti sono stati congelati in azoto liquido e mantenuti in freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'analisi.

3.2 IMMUNOISTOCHIMICA

I campioni fissati in paraformaldeide al 4% sono stati processati, inclusi in paraffina e successivamente sezionati al microtomo ad uno spessore di $4\text{ }\mu\text{m}$. Per garantire una migliore adesione delle sezioni, i vetrini sono stati precedentemente trattati con TESPA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Al termine del processo di idratazione, effettuato tramite una scala discendente di etanolo, le sezioni sono state incubate per 20 minuti in perossido di idrogeno diluito al 3% in alcool metilico al fine di inibire l'attività della perossidasi endogena eventualmente presente. Per prevenire legami aspecifici dell'anticorpo primario è stata effettuata una saturazione dei siti antigenici incubando le sezioni in una soluzione al 2,5% di siero di cavallo (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Gli anticorpi (Ab) primari, di seguito elencati in Tab. 1, sono stati posti ad incubare sulle sezioni per 24 ore ad una temperatura di $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ab I	Ditta	Diluzione	
Anti-HSP70 <i>mouse</i> monoclonale	Stressgen Biotechnologies, USA	1:200	Marca la forma inducibile HSP70
Anti-NT <i>mouse</i> monoclonale	Gene Tex, USA	1:1000	Marca la produzione dell'ossido nitrico (NO)
Anti-HNE <i>mouse</i> monoclonale	Abcam, UK	1:40	Marca la perossidazione lipidica
Anti-ACROLEINA <i>mouse</i> monoclonale	Abcam, UK	1:400	Marca la perossidazione lipidica
Anti-MDA <i>rabbit</i> policlonale	Abcam, UK	1:1000	Marca la perossidazione lipidica

Tab. 1 – Anticorpi primari testati in immunoistochimica.

Dopo opportuni lavaggi in PBS è stata eseguita un'incubazione con l'anticorpo secondario specifico biotinilato in grado di riconoscere sia IgG di topo che IgG di coniglio (R.T.U. Vectastain Universal, Elite ABC Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Dopo opportuni lavaggi in PBS è stato utilizzato il Kit Elite ABC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)

seguito da reazione colorimetrica con diaminobenzidina (DAB) utilizzando come substrato il perossido d'idrogeno. Nelle zone in cui è avvenuta la reazione il preparato assume una colorazione marrone.

3.2.1 CONTROLLI DI SPECIFICITÀ

Per verificare l'effettiva specificità del riconoscimento Ag-Ab sono stati effettuati routinariamente alcuni controlli, quali ad esempio:

- sostituzione dell'anticorpo primario con PBS;
- sostituzione dell'anticorpo primario con siero di coniglio o di topo;
- sostituzione dell'anticorpo secondario con PBS.

Infine, un ulteriore controllo era costituito dagli animali stabulati e detossificati in acqua artificiale.

I risultati dei controlli hanno sempre dato esito negativo.

3.3 ANALISI RT-PCR e REAL TIME

3.3.1 ANALISI RT-PCR

Nel presente lavoro è stata eseguita una RT-PCR (*Reverse Transcription PCR*), cioè è stata utilizzata quale fonte di informazione il DNA complementare (cDNA) anziché il DNA cellulare e la trascrittasi inversa anziché la DNA polimerasi. Il cDNA è stato ottenuto a partire dall' mRNA estratto da 100 mg di fegato di *Z. ophiocephalus*.

L'estrazione dell'RNA totale (messaggero, ribosomiale e trasportatore) è stata effettuata utilizzando il TRIZOL *Reagent* (Invitrogen Corporation, UK). Questo reagente è costituito da una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato che permette di mantenere l'integrità dell'RNA mentre distrugge le cellule e gli altri componenti cellulari. La metodica è molto utilizzata in biologia molecolare in quanto permette di isolare, da piccole quantità di tessuti (50-100 mg) e cellule (5×10^6), molecole di RNA separandole da eventuali contaminanti quali le proteine ed il DNA cellulare.

Ad ogni campione è stato aggiunto 1ml di TRIZOL *Reagent* ed il tutto è stato omogenato utilizzando una provetta con pestello. I campioni omogenati sono stati incubati ad una temperatura di 15-30 °C per permettere una completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Successivamente sono stati aggiunti 0,2 ml di cloroformio puro e, dopo 15 secondi di agitazione, il

tutto è stato lasciato ad incubare a 15-30 °C per 3 minuti. I campioni sono stati poi sottoposti a centrifugazione a 12000 g per 15 minuti a 4 °C per separare la miscela in tre fasi: un sedimento costituito dalla fase organica, di color rosa, una fase intermedia ed una fase soprastante acquosa contenente in sospensione l'RNA. La fase acquosa è stata trasferita in una provetta e sono stati aggiunti 0,5 ml di alcool isopropilico allo scopo di provocare la precipitazione dell'RNA. I campioni sono stati incubati a 15-30 °C per 15 minuti e successivamente centrifugati a 12000 g per 10 minuti a 4 °C. Il precipitato di RNA, visibile macroscopicamente sotto forma di materiale gelatinoso, si è raccolto sul fondo della provetta. Dopo aver rimosso il surnatante, il pellet di RNA è stato risospeso aggiungendo 1 ml di etanolo al 75%. La provetta è stata agitata su vortex e centrifugata a 7500 g per 5 minuti a 4 °C. Al termine della procedura si è lasciato asciugare all'aria il pellet di RNA per 25-30 minuti. Successivamente l'RNA è stato risospeso e sciolto in acqua distillata RNAsi-free.

La sintesi di cDNA è avvenuta successivamente alla fase di isolamento dell'mRNA dall'RNA totale. Tale isolamento è stato effettuato sfruttando la capacità degli Oligo(dt)20, cioè degli oligopolimeri di timina, di identificare e legare la catena poli(A) caratteristica e specifica dell'mRNA. Dopo aver isolato l'mRNA è stato possibile sintetizzare il filamento di cDNA utilizzando la trascrittasi inversa Superscript II RNase H- (Invitrogen Corporation, UK). Questo enzima, altamente specifico, ha permesso la sintesi di numerosi filamenti di cDNA, i quali sono stati impiegati come stampo di partenza per l'analisi della RT-PCR.

Inizialmente sono stati miscelati in ghiaccio, in una provetta sterile, 2 µg di RNA con 1 µl di buffer DNAsi 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM) e DNAsi (1U) e lasciati ad incubare a 15-30 °C per 15 minuti. L'azione dell'enzima è stata bloccata aggiungendo alla soluzione 1 µl di EDTA 25mM e incubando il tutto a 65 °C per 10 min. Successivamente sono stati addizionati gli esameri 100nM e i desossinucleotidi trifosfato (dNTPs) 10mM. La miscela è stata incubata per 5 minuti a 65 °C e successivamente raffreddata in ghiaccio per almeno 1 minuto. Sono stati, in seguito, aggiunti 4 µl di buffer SSII 5X (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 0,1mM), ditiotreitolo (DTT) 0,1M e l'RNAsi out (40U), incubando la miscela così ottenuta a 15-30 °C per 2 minuti. Infine è stato addizionato l'enzima Superscript II RNase H- (200 U) e la miscela è stata incubata a 15-30 °C per 10 minuti. In seguito, la

soluzione è stata incubata 50 minuti a 42 °C e, successivamente, a 70 °C per 15 minuti.

Per l'analisi RT-PCR sono stati utilizzati 2 µl di tale aliquota effettuando 35 cicli successivi per l'amplificazione del gene desiderato. Ad ogni ciclo le fasi di denaturazione, di *annealing* e di *elongation*, della durata ciascuna di 45 secondi, sono state effettuate alla temperatura rispettivamente di 94, 52 e 72 °C. Per l'amplificazione sono stati utilizzati una coppia di oligonucleotidi antiparalleli compatibili utilizzati come primers nella reazione di amplificazione. Per garantire una buona qualità dell'mRNA e per determinare l'efficienza della reazione di retrotrascrizione per ogni campione è stato amplificato un frammento di 18s.

I prodotti della RT-PCR sono stati successivamente sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio al 2% ed evidenziati sotto luce ultravioletta.

3.3.2 ANALISI REAL TIME

Per determinare eventuali differenze di espressione relativa del gene, tra i diversi siti della Laguna di Venezia e il controllo, è stata effettuata un'analisi Real-Time PCR.

Per l'analisi dell'espressione è stato utilizzato lo strumento "ABI 7500 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), provvisto del programma di raccolta e analisi dati "ABI 7500 System SDS Software". L'analisi prevede l'utilizzo di un fluoroforo, il SYBR *Green*, presente in una miscela disponibile in commercio (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), che ha la proprietà di emettere fluorescenza solo quando si intercala al DNA a doppio filamento. Durante la reazione di PCR l'enzima AmpliTaq amplifica la sequenza bersaglio creando diversi segmenti di DNA e il SYBR *Green* si lega a ciascuno di questi segmenti. Ne consegue che l'intensità della fluorescenza aumenta in proporzione al numero di molecole di DNA sintetizzate. Nella stessa miscela sono contenuti l'enzima polimerasi AmpliTaq *Gold*, che catalizza la reazione di copiatura, i dNTPs, il MgCl₂ ed un secondo fluoroforo (ROX) che viene utilizzato dallo strumento come riferimento interno. Ciascun campione è stato analizzato in triplicato ed è stato inserito un controllo negativo contenente acqua al posto del cDNA stampo.

Il metodo di calcolo utilizzato è stato quello del $\Delta\Delta C_t$ ed il gene 18s è stato utilizzato come gene di riferimento per la quantificazione relativa del gene target. Al termine della reazione lo strumento fornisce, sia per il gene target

che per il gene di riferimento di ciascun campione, il valore Ct. Il Ct rappresenta il valore numerico del ciclo di amplificazione al quale la fluorescenza registrata dallo strumento oltrepassa una certa soglia. Di questi valori viene calcolato il Δ , ovvero la differenza tra il Ct del gene target e il Ct del gene di riferimento ($\Delta Ct = C_{target} - C_{riferimento}$). Sottraendo al valore del ΔCt dei vari campioni il ΔCt di un campione che viene assunto come calibratore dell'esperimento, si ottengono i valori di $\Delta\Delta Ct$. Infine, mediante l'equazione $2^{-\Delta\Delta Ct}$ si ottiene l'espressione del gene target, normalizzata rispetto ad un gene endogeno di riferimento, ed espressa relativamente ad un campione assunto come calibratore, il cui valore si assume uguale a 1.

Per verificare che l'efficienza di amplificazione del gene target e del gene di riferimento fossero simili è stato effettuato un esperimento preliminare di validazione, cioè si è valutato come varia il ΔCt al variare della diluizione del campione. Si è eseguito pertanto un esperimento di Real Time utilizzando diluizioni scalari di uno dei campioni e si è tracciato un grafico coi valori del logaritmo della diluizione verso i valori di ΔCt calcolati per ciascuna diluizione. Si è ottenuta una retta, il cui valore della pendenza è risultato inferiore a 0,1, condizione necessaria per ritenere l'esperimento validato.

3.4 WESTERN BLOT

3.4.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

L'analisi delle proteine è stata effettuata su campioni di plasma e fegato di *Zosterisessor ophiocephalus*.

I campioni di fegato sono stati inizialmente estratti. Ai campioni, adeguatamente scongelati e pesati, sono stati addizionati 5 volumi di TRIS HCl 0,125M pH 6,8 con cocktail inibitore antiproteolitico (P2714, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). I campioni sono stati omogenati in *potter* di vetro, trasferiti in una provetta e centrifugati a 13000 g per 15 minuti a 4 °C per favorire la precipitazione dei residui non omogenati. Il surnatante è stato trasferito in una provetta e congelato a -20 °C.

Successivamente, sono state effettuate prove di diluizioni in PBS di campioni di plasma e di fegato per determinare il *range* di diluizione ottimale da sottoporre a saggio Bradford e successiva analisi proteica.

3.4.2 SAGGIO BRADFORD

I campioni precedentemente diluiti sono stati sottoposti a saggio Bradford mediante protocollo *Micro Assay* indicato nel datasheet del reagente utilizzato (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) per determinarne la concentrazione proteica.

Inizialmente è stata allestita la curva di taratura (1-10 µg/ml) del saggio diluendo in acqua volumi crescenti di siero albumina bovina (BSA) 0,1 mg/ml e aggiungendo a ciascun punto di curva un volume di reagente Bradford. Dopo agitazione, gli standard sono stati incubati a 15-30 °C per 45 minuti e successivamente sottoposti a lettura dell'assorbanza a 595 nm mediante spettrofotometro (V-630, Jasco Europe, Italia).

Successivamente, sono stati processati i campioni per effettuare una lettura in doppio. Ciascun campione è stato addizionato con un volume di reagente e incubato a 15-30 °C per 45 minuti. I campioni così processati sono stati sottoposti a lettura allo spettrofotometro a 595 nm.

Le letture ottenute sono state plottate nella curva di taratura determinando la diluizione ottimale da effettuare e la concentrazione proteica di ciascun campione al fine di standardizzare il protocollo.

3.4.3 SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

I campioni di plasma e fegato, dopo opportuna diluizione in PBS, sono stati addizionati di *2X Sample Buffer* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) nel rapporto 1:1 (volume:volume). Successivamente, sono stati agitati su *vortex* e incubati a 100 °C per 2 minuti, per essere poi congelati a -20 °C fino al momento delle analisi.

La separazione delle proteine dai campioni di fegato e di plasma è stata eseguita mediante SDS-PAGE 10% secondo Laemmli (1970).

I campioni sono stati caricati (6 µg/*lane*) con il marker (Wide Range-Molecular Weight 6,500-200,000Da, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), diluito in glicerolo 20%, in gel polimerizzati su Hoefer SE 245-Dual Gel Caster (GE Healthcare, USA): *stacking gel* al 4% e *resolving gel* al 10% di 0,75 mm di spessore, secondo la seguente composizione:

STACKING GEL 4%:	H ₂ O	3,775 ml
	TRIS HCl 1M pH 6,8	0,620 ml
	SDS 10%	0,100 ml

	Acrilamide 40 %	0,500 ml
	AMPS 10%	0,050 ml
	Temed	0,005 ml
RESOLVING GEL 10%:	H ₂ O	6,000 ml
	TRIS HCl 1,5M pH 8,8	3,125 ml
	SDS 10%	0,125 ml
	Acrilamide 40 %	3,125 ml
	AMPS 10%	0,125 ml
	Temed	0,013 ml

La separazione elettroforetica è avvenuta mediante Hoefer SE 260 (GE Healthcare, UK) a 4°C per 3 ore a 30 e 60 mA in tampone di corsa di Laemmli (1970).

Per ciascuna prova sono state allestite due corse elettroforetiche: una è stata trasferita su membrana di nitrocellulosa; l'altra è stata utilizzata per testare le condizioni di corsa e l'integrità dei campioni mediante colorazione *Comassie Brilliant Blue* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) secondo Laemmli (1970).

3.4.4 TRASFERIMENTO E COLORAZIONE

Le proteine, separate in base al peso molecolare, sono state trasferite dal gel alle membrane di nitrocellulosa 0,45 µm (GE Healthcare, UK) mediante immersione in vasca trans-blot (Elettrofor, Rovigo, Italia) in tampone di trasferimento di Laemmli (1970), come descritto da Towbin *et al.* (1979). Il trasferimento è avvenuto a 350 V a 4 °C per un'ora.

Al termine del trasferimento, le membrane di nitrocellulosa sono state immerse per 2 minuti nella soluzione colorante di Ponceau (acido tricloro acetico 3 g, H₂O 100 ml, Rosso Ponceau 0,2 g) per rendere visibili i pesi molecolari del marker e le proteine totali trasferite.

Successivamente le membrane sono state lavate con abbondante acqua deionizzata e incubate con *skin milk* al 3% *overnight* per bloccare i siti di legami non specifici.

3.4.5 INCUBAZIONI

Le membrane sono state incubate su agitatore orizzontale con l'anticorpo primario a 15-30 °C con diluizioni e tempi di incubazione come indicato in Tab. 2.

Ab I	Diluizione	incubazione	Ab II	Diluizione	incubazione
Anti-VTG (concessione Prof.ssa Carnevali)	1:1000	1 ore RT	Anti IgG-rabbit (BIO RAD, USA)	1:50000	1 ora RT
Anti-HNE (Abcam, UK)	1:200	2 ore RT	Anti IgG-mouse (GE Healthcare, UK)	1:8000	1 ora RT
Anti-NT (Gene Tex, USA)	1:2500	2 ore RT	Anti IgG-mouse (GE Healthcare, UK)	1:8000	1 ora RT
Anti-MDA (Abcam, UK)	1:1500	2 ore RT	Anti IgG-rabbit (BIO RAD, USA)	1:50000	1 ora RT
Anti-Acroleina (Abcam, UK)	1:1000	2 ore RT	Anti IgG-mouse (GE Healthcare, UK)	1:8000	1 ora RT

Tab. 2 – Anticorpi primari e secondari testati in Western blot.

Al termine dell'incubazione, le membrane sono state sottoposte a 3 lavaggi di 10 minuti con tampone PBS addizionato di Tween 20 allo 0,05%.

Terminati i lavaggi, le membrane sono state incubate su agitatore orizzontale per un'ora a 15-30 °C con anticorpo secondario specifico coniugato con HRP (*horseradish peroxidase*).

3.4.6 REAZIONE CHEMIOLUMINESCENTE

Il complesso antigene-anticorpo è stato visualizzato mediante reazione chemiluminescente indotta dall'utilizzo del substrato HRP (MILLIPORE, Billerica, MA, USA). Il complesso è stato impresso su lastra fotografica (GE Healthcare, UK) utilizzando soluzioni di sviluppo e di fissaggio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Tale reazione è stata indotta in una stanza buia.

3.5 ANALISI T-BARS

Per quantificare la perossidazione lipidica nel plasma viene utilizzato frequentemente il saggio dell'acido tiobarbiturico (TBA) per la determinazione spettrofotometrica della sostanza TBA reattiva (*TBA-reactive substance*, TBARS), come descritto da Yoshida *et al.* (2005).

La reazione è stata innescata mescolando:

- 0,2 ml di Sodio Dodecil Solfato (SDS) 8,1%
- 1,5 ml di Acido Acetico 20% pH 3,5
- 1,5 ml di Acido Tiobarbiturico 1%
- 0,775 ml d'acqua
- 0,05 ml di Butil idrossitoluene 0,8% in etanolo
- 0,025 ml di plasma di *Z. ophiocephalus*

I campioni così ottenuti sono stati brevemente agitati ed incubati a 100 °C per un'ora. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati raffreddati in ghiaccio ed agitati con l'aggiunta di 1 ml d'acqua e 5 ml di alcool n-butilico e piridina, in rapporto 15/1. Infine, i campioni sono stati centrifugati a 1400 g a 0 °C per 10 minuti, fino ad ottenere una soluzione limpida. Il surnatante è stato prelevato e sottoposto a lettura dell'assorbanza a 535 nm mediante spettrofotometro (V-630, Jasco Europe, Italia).

Il tetrametossipropano è stato utilizzato come standard (0-5 µM/10 ml) per stimare la formazione di TBARS come nanomoli equivalenti di MDA per ml di plasma di *Z. ophiocephalus*.

3.6 ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA (RIA)

Il dosaggio degli ormoni sui campioni di *Z. ophiocephalus* e *T. philippinarum* è stato effettuato mediante analisi radioimmunologica (*Radioimmunoassay* - RIA), un sistema analitico ad elevata specificità e sensibilità. La specificità è raggiunta mediante l'utilizzo di un reattivo, l'anticorpo specifico, capace di riconoscere e legare selettivamente la sostanza da dosare. La sensibilità è garantita dall'affinità dell'anticorpo per l'antigene.

Il principio generale, su cui si basa il dosaggio radioimmunologico, corrisponde alla competizione tra un antigene libero marcato con un tracciante radioattivo e l'analita che si vuole quantificare per un anticorpo specifico comune. La competizione fra antigene marcato e analita si determina perché l'anticorpo è presente in difetto: ciò significa che maggiore è la concentrazione

dell'analita presente, minore sarà la quantità del tracciante radioattivo che si lega all'anticorpo.

3.6.1 RIA SU MICROPIASTRA

Il RIA su micropiastra è una variante solida del tradizionale RIA e prevede l'utilizzo di micropiastre in poliestere da 96 pozzetti (Packard, optiplat 96 well PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA).

Inizialmente un anticorpo anti- γ globuline di coniglio prodotto nella capra è stato utilizzato, diluito 1:600 con tampone sodio acetato 0,15mM pH 9,0, come anticorpo secondario. L'antisiero è stato distribuito nei 96 pozzetti della micropiastra (200 μ l/pozzetto). Dopo un'incubazione a 4 °C *overnight* la piastra è stata svuotata e sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, 200 μ l di tampone RIA (Na₂HPO₄-12H₂O 61mM, NaH₂PO₄-H₂O 40 Mm, NaCl 154 Mm, pH 7,2) contenente albumina bovina serica (BSA) allo 0,1%. In seguito ad un'ulteriore incubazione di 1 ora a + 4 °C la piastra è stata nuovamente svuotata e conservata a -20 °C (non più di 4 settimane) fino al momento dell'utilizzo.

Ogni piastra è stata quindi caricata con l'anticorpo specifico e opportunamente diluito: anticorpo anti-testosterone-3-CMO, diluito 1:32000 (Centro Medico Diagnostico Emilia s.r.l., Bologna, Italia), anticorpo anti-estradiolo-6-CMO, diluito 1:15000 (Gabai *et al.*, 2004); anticorpo anti-progesterone-7-CMO, diluito 1:8000 (Battocchio *et al.*, 1999). Le caratteristiche di specificità degli anticorpi sono riportate di seguito:

- a) Anticorpo anti-testosterone-3-CMO: testosterone 100%, 5 α -diidrotosterone 38%, 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol 13,7%, 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol 13,6%, androstenedione 1,7%, 5 α -androsten-3 β ,17 β -diol 1,2%, deidroepiandrosterone 0,01%, cortisolo < 0,001%, colesterolo < 0,001%.
- b) Anticorpo anti-estradiolo-6-CMO: 17 β -estradiolo 100%, estrone 2,55%, estriolo 0,12%, deidroepiandrosterone 0,007%, 17 α -estradiolo < 0,004%, progesterone < 0,004%, testosterone < 0,004%, androstenedione < 0,004%.
- c) Anticorpo anti-progesterone-7-CMO: progesterone 100%, 11 α -idrossiprosterone 77%, 11 β -idrossiprosterone 65%, 17 α -

idrossiprogesterone 2,9%, 20 α -idrossiprogesterone 0,01%, 20 β -idrossiprogesterone < 0,001%.

In ogni pozzetto, tranne in quelli destinati alla determinazione di alcuni parametri di controllo, quali: Attività Totale (AT) e *Non Specific Bound* (NSB), sono stati dispensati 200 μ l di antisiero e la piastra è stata lasciata incubare a 4 °C *overnight*. Dopo l'incubazione con l'anticorpo specifico, ciascun pozzetto della piastra (tranne AT e NSB) è stato lavato con 200 μ l di tampone RIA. Successivamente la piastra è stata svuotata, asciugata e quindi caricata in doppio con 50 o 100 μ l di campione estratto diluito con tampone RIA in modo da raggiungere un volume complessivo di 200 μ l/pozzetto, come riportato in Tab. 3.

In tutti i pozzetti, sono stati infine aggiunti 10 μ l di tracciante radioattivo, diluito precedentemente con etanolo assoluto (*stock solution*), ulteriormente diluito con tampone RIA (*working solution*) per ottenere una soluzione da 5000 cpm/10 μ l: [1,2,6,7-³H]testosterone; [2,4,6,7-³H]estradiolo; [1,2,6,7-³H]progesterone (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA).

	AT	NSB	Co	Curva	Campioni
Buffer RIA	-	200 μ l	200 μ l	150 μ l	100/150 μ l
Standard	-	-	-	50 μ l	-
Campione	-	-	-	-	100/50 μ l
Tracciante*	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

Tab. 3 – Schema di carico piastra.

La piastra è stata fatta agitare su agitatore orizzontale a bassa velocità per 3 minuti, coperta con pellicola e lasciata incubare *overnight* a 4 °C al fine di indurre la reazione immunologica.

A seguito dell'incubazione, la piastra è stata lavata, tranne i pozzetti di controllo (AT e NSB), per 4 volte con tampone RIA (200 μ l/pozzetto) per separare l'antigene marcato libero dall'antigene marcato legato all'anticorpo.

Infine ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 μ l di liquido scintillante (Microscint, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) per il conteggio della frazione di radioattività legata. La piastra è stata sigillata con

pellicola termosaldabile (TOPSEAL S, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) e messa ad agitare per 3 minuti a bassa velocità.

La frazione di radioattività legata è stata determinata mediante lettura al β -counter (Top-Count, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) che, con apposito programma (Riasmart, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), elabora una curva di taratura e fornisce direttamente le concentrazioni ormonali dei campioni (pg/pozzetto).

3.6.2 ESTRAZIONE DEGLI STEROIDI

L'analisi radioimmunologica è stata condotta utilizzando come matrice 100 mg di tessuto muscolare per *Z. ophiocephalus* e 100 mg di ghiandola digestiva per *T. philippinarum*, sottoposti ad estrazione mediante etere dietilico.

Per facilitare l'estrazione degli steroidi, i campioni di tessuto sono stati preventivamente omogenati: il tessuto muscolare di *Z. ophiocephalus* in un mortaio d'acciaio con azoto liquido, la ghiandola digestiva di *T. philippinarum* in un *potter* di vetro. L'omogenato è stato ripreso con tampone RIA e trasferito in provette d'estrazione. La provetta criogenica in cui è contenuto il campione ed il *potter* sono stati lavati rispettivamente con 100 μ l e 200 μ l di buffer RIA. L'omogenato e i tamponi di lavaggio sono stati trasferiti in provette d'estrazione in cui il volume di risospensione risultante era di 500 μ l di buffer RIA. In entrambi i casi, le provette sono state agitate e sono stati aggiunti 8 ml di etere dietilico per l'estrazione.

Successivamente, le provette sono state agitate su agitatore orizzontale per 10 minuti e centrifugate a 2700g a +5 °C per 5 minuti, al termine dei quali sono state trasferite in freezer a -20°C sino a congelamento della fase acquosa.

Il surnatante è stato decantato in provette coniche e portato a secco sotto corrente d'azoto su piastra termostata. Il residuo secco è stato ripreso con un adeguato volume di tampone RIA e agitato per 10 minuti e la provetta è stata agitata su agitatore orizzontale per 10 minuti. Al termine del procedimento il campione è pronto per essere caricato.

3.6.3 ALLESTIMENTO CURVA DI TARATURA E CONTROLLI

La curva di taratura si ottiene dosando quantità note di ormone non marcato a concentrazioni crescenti. I punti della curva sono stati preparati partendo dalla concentrazione di 100 ng/ml di steroide diluito in etanolo come indicato in Tab. 4.

ormone	Range di concentrazione
TESTOSTERONE	200-3 pg/50 µl
ESTRADIOLO	200-1,5 pg/50 µl
PROGESTERONE	360-2,5 pg/50 µl

Tab. 4 – Range di concentrazione delle curve di taratura.

Per stimare l'affidabilità e l'accuratezza del dosaggio, in ciascun piastra sono stati allestiti alcuni pozzetti di controllo. In questi pozzetti sono stati valutati parametri quali: l'Attività Totale (AT), il legame non specifico con l'anticorpo (NSB), il controllo del *coating* (CO) ed il dosaggio di una quantità nota di analita (Ctrl).

- **AT**: è stato caricato solamente il tracciante radioattivo e non sono stati effettuati risciacqui per stimarne la radioattività totale.

- **NBS**: non è stato caricato l'anticorpo specifico, ma solo il tampone RIA ed il tracciante radioattivo per stimare la componente di legame aspecifico.

- **CO**: sono stati caricati l'anticorpo primario, il secondario, il tampone RIA ed il tracciante radioattivo. Essendo l'unico antigene presente, l'antigene marcato occuperà tutti i siti di legame dell'anticorpo esprimendo la radioattività massima misurabile dal sistema.

- **Ctrl**: sono stati caricati l'anticorpo primario, il secondario, il tampone RIA ed il tracciante. E' presente un estratto di plasma bovino con concentrazione nota dell'analita per verificare l'affidabilità dell'elaborazione.

3.6.4 VALIDAZIONE DEL METODO DI DOSAGGIO

La validità di un metodo di dosaggio viene testata attraverso alcuni test capaci di stabilire l'accuratezza e la precisione del sistema analitico, tra i quali i test di diluizione e ripetibilità e resa estrattiva, utilizzati anche nel presente lavoro.

TEST DI DILUIZIONE

L'obiettivo di tale test è verificare che a diluizioni seriali del campione corrisponda una proporzionale riduzione della concentrazione dell'ormone da dosare. Questi campioni diluiti devono fornire risultati proporzionalmente correlati alle loro concentrazioni iniziali; in caso contrario, il sistema di misura deve essere definito "non accurato".

Le cause possono essere sostanzialmente due:

- a. un'erronea taratura del sistema (reazione immunologica, separazione libero-legato);
- b. la presenza di interferenti nel sistema che agiscono in maniera non proporzionale alla loro concentrazione, provocando una sovrastima o sottostima ad ogni diluizione.

Per misurare l'andamento di eventuali interferenti al diminuire della concentrazione dell'ormone vengono effettuate delle diluizioni seriali degli estratti, con fattori di diluizione compresi tra $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{16}$.

L'assenza di interferenti nel sistema è dimostrata quando la retta interpolante ($y=ax+b$) mostra un coefficiente di determinazione " r^2 " che tende a 1 (deve essere superiore a 0.98, indicativo di una ridotta dispersione dei valori) e l'intercetta all'origine "a" passa per il "punto zero".

TEST DI RIPETIBILITÀ

La precisione è l'indice di riproducibilità del sistema di analisi e si verifica inserendo fra i campioni incogniti dei campioni di controllo a concentrazioni note.

Questo test permette di valutare la riproducibilità all'interno dello stesso saggio (*intra-assay*) calcolando il coefficiente di variazione (C.V.% = Deviazione Standard x 100 / valore medio dei risultati).

Un sistema di analisi immunologica si ritiene presenti una buona riproducibilità se il C.V.% *intra-assay* è minore del 10%.

3.7 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata condotta mediante software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

I risultati riportati in seguito sono stati espressi come media \pm errore standard (ES) e sono stati considerati significativi quando il *p-value* era inferiore allo 0,05.

I valori d'espressione dell'mRNA di HSP70 e CYP1A1 sono stati sottoposti ad analisi mediante il programma di elaborazione dati "ABI 7500 System SDS Software" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ed il software Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software, CA, USA).

I valori di concentrazione degli steroidi sono stati inizialmente sottoposti al test di Levene per valutarne l'omogeneità della varianza, e successivamente trasformati in logaritmo: $\text{Log}(n+1)$. Le concentrazioni ormonali di *Z. ophiocephalus* sono state sottoposte ad analisi GLM (*General Linear Model*) nidificata per valutarne l'influenza dei fattori, quali: sito di campionamento, sesso e stagione. Le concentrazioni ormonali di *T. philippinarum* sono state inizialmente sottoposte a test t per valutare le differenze complessive riscontrate tra gli anni di campionamento (2007 e 2008), e successivamente è stata applicata l'analisi GLM nidificata per valutare l'influenza dei diversi fattori su tali concentrazioni.

4. RISULTATI

I risultati sotto riportati fanno riferimento ad entrambi i campionamenti (primavera ed autunno) per quanto concerne il dosaggio degli steroidi sessuali in entrambe le specie e l'espressione proteica della vitellogenina in *Z. ophiocephalus*. Gli altri marcatori sono stati al momento valutati solo nei campioni di un'unica stagione: la primavera per l'espressione genica di HSP70 e CYP1A1, l'autunno per i marcatori dello stress ossidativo (immunoistochimica e Western blot).

4.1 ANALISI Real Time

4.1.1 HSP70 inducibile

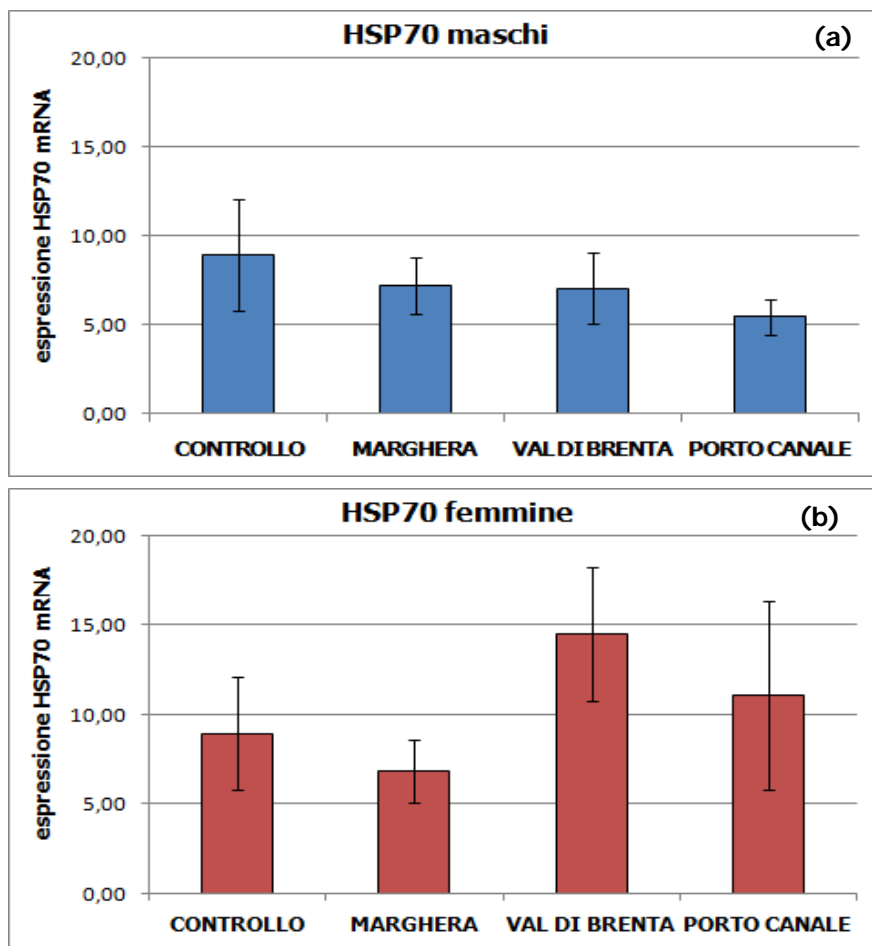


Fig. 8 – Espressione (in unità arbitraria) del mRNA della forma inducibile di HSP70 in maschi (a) e femmine (b) di *Z. ophiocephalus*.

L'analisi Real Time PCR è stata effettuata mediante primer specifici (HSP70for 5'-ATGAAGCCGTGGCCTATGG-3' - HSP70rev 5'-GAGTGACGTCCAAAAGCA-3') ottenuti mediante Primer3 Input (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), sequenziati mediante il servizio sequenziamento e analisi di DNA di BMR Genomics (<http://www.bmr-genomics.it/>) e sottoposti a GenBank (bankit 1129773).

L'analisi, sottoposta ad algoritmo, non ha permesso di evidenziare, in entrambi i sessi, una diversa espressione del messaggero della forma inducibile di HSP70 tra i campioni raccolti nei diversi siti della Laguna di Venezia ed il controllo rappresentato dagli animali stabulati in acqua artificiale per la detossificazione (Fig. 8).

4.1.2 CITOCROMO P450 1A1 (CYP1A1)

L'espressione del mRNA della citocromo P450 1A1 è stata effettuata utilizzando primer specifici per una specie omologa (*Gobius niger*).

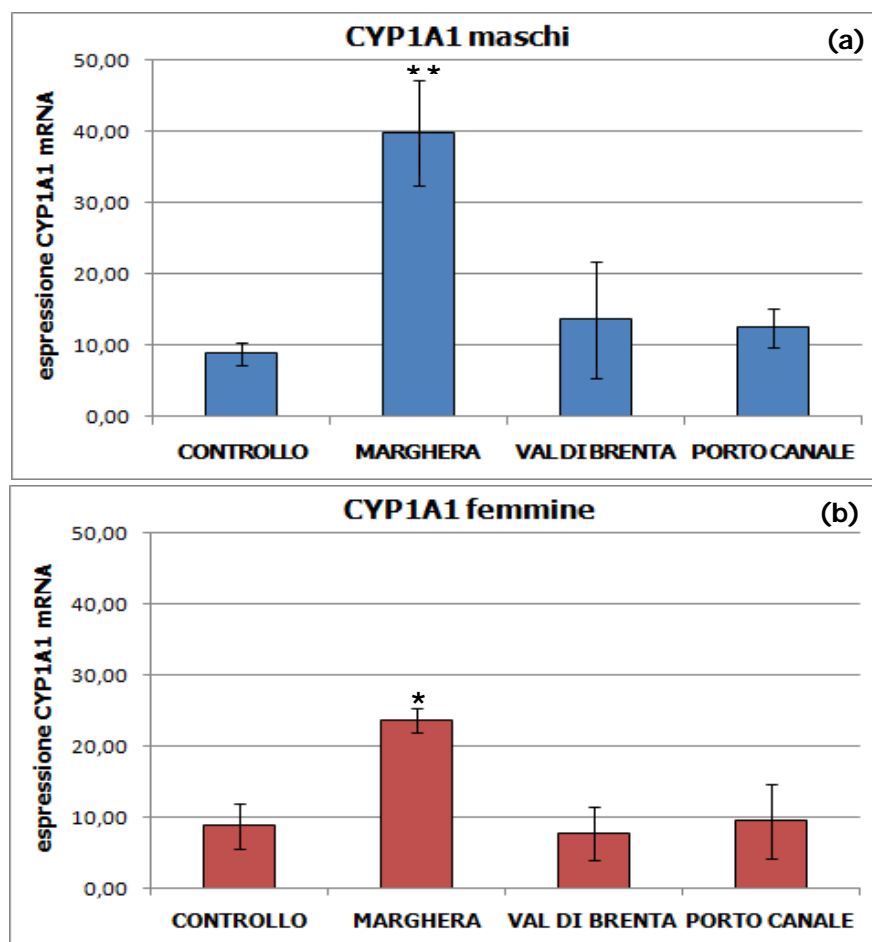


Fig. 9 - Espressione (in unità arbitraria) del mRNA di CYP1A1 in maschi (a) e femmine (b) di *Z. ophiocephalus*; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

L'analisi Real Time, sottoposta ad algoritmo, ha evidenziato valori d'espressione del messaggero significativamente più elevati negli animali di entrambi i sessi campionati a Porto Marghera (maschi: $p < 0,01$; femmine: $p < 0,5$). Nessuna differenza di espressione è stata invece riscontrata tra i campioni raccolti a Porto Canale e Val di Brenta ed il controllo rappresentato dagli animali stabulati in acqua artificiale per la detossificazione (Fig. 9).

4.2 IMMUNOISTOCHEMICA

4.2.1 HSP70 inducibile

Nessuna immunoreattività all'anticorpo anti-HSP70 inducibile è stata riscontrata nei tessuti esaminati provenienti dagli esemplari di *Z. ophiocephalus* campionati nei diversi siti della Laguna di Venezia.

4.1.2 STRESS OSSIDATIVO

Nessuna immunoreattività all'anticorpo anti-MDA e anti-acroleina è stata riscontrata in *Z. ophiocephalus*, mentre l'immunoreattività agli anticorpi anti-4-idrossi-2-nonenano (HNE) (Fig. 10) e anti-nitrotirosina (NT) (Fig. 11) è stata principalmente rilevata nei centri melanomacrofagici (CMM) a livello dei seguenti organi: milza, rene, fegato e ovaio.

I CMM sono gruppi distinti di cellule pigmentate coinvolte nella cattura e nello stoccaggio di prodotti della degenerazione cellulare e di materiali potenzialmente tossici. Il numero dei CMM è in diretta relazione con le condizioni di stress a cui sono sottoposti gli animali.

Data la correlazione con lo stress, allo scopo di verificare eventuali differenze tra i siti, è stata condotta un'analisi quantitativa condotta su sezioni immunocolorate di milza. Il numero più elevato di CMM è stato riscontrato negli animali campionati a Marghera, mentre un numero inferiore è stato osservato rispettivamente nella milza degli individui raccolti a Porto Canale e a Val di Brenta.

Nei tessuti degli animali stabulati per la detossificazione non è mai stata osservata immunoreattività ai due marcatori confermando che le differenze osservate tra i tre siti possono essere legate all'assunzione di contaminanti.

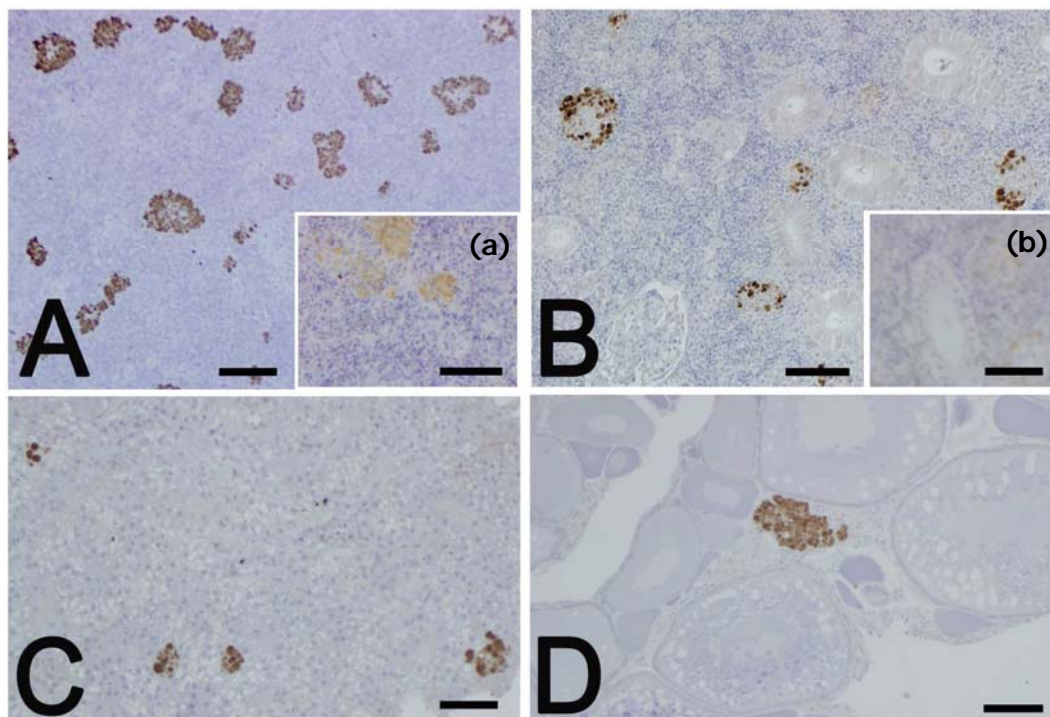


Fig. 10 – Immunoreattività all'anticorpo anti-HNE presente a livello dei CMM nella milza (A), rene (B), fegato (C) e ovaio (D) di *Z. ophiocephalus*. Con la lettera (a) è indicato il controllo negativo rappresentato dall'assenza di immunoreattività negli animali stabulati in acqua artificiale; con la lettera (b) è indicato il controllo negativo ottenuto incubando le sezioni con PBS anziché siero secondario. 1 cm = 12,5 μ m.

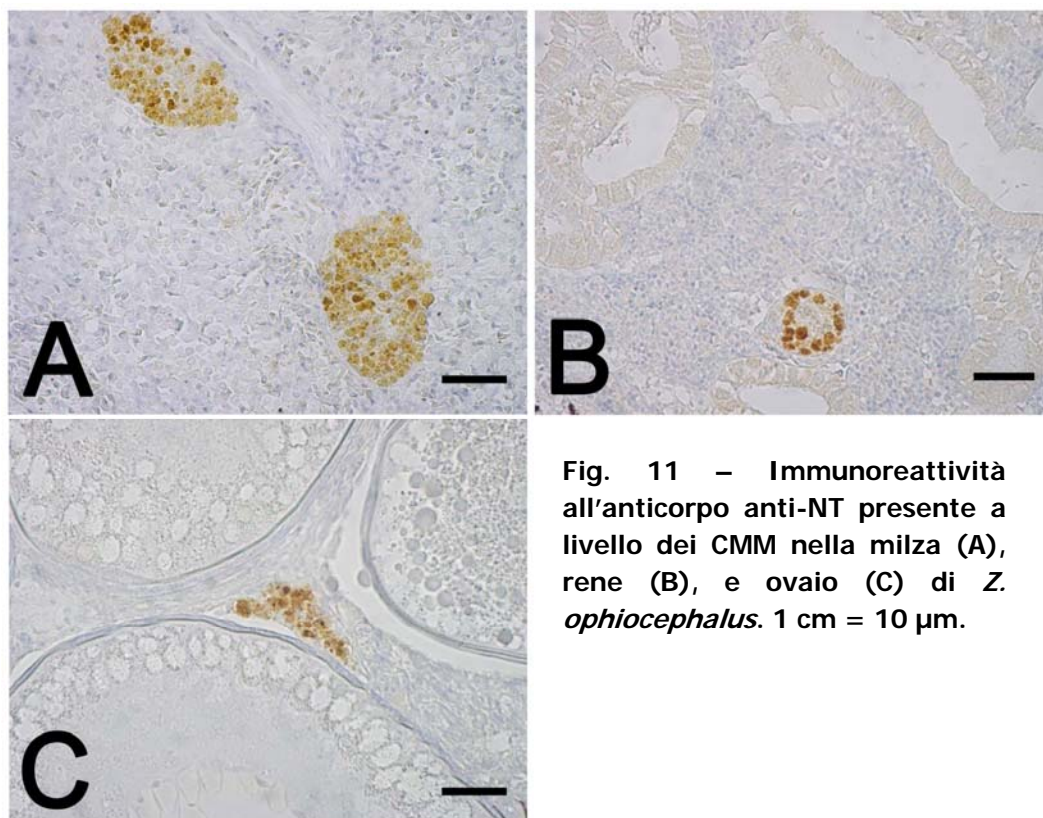


Fig. 11 – Immunoreattività all'anticorpo anti-NT presente a livello dei CMM nella milza (A), rene (B), e ovaio (C) di *Z. ophiocephalus*. 1 cm = 10 μ m.

4.3 WESTERN BLOT

4.3.1 COLORAZIONE COMASSIE

La colorazione di *Comassie* ha permesso di verificare le condizioni di corsa elettroforetica del gel SDS-PAGE 10%, le condizioni di carico (6 µg/lane) e l'integrità dei campioni analizzati (Fig.12).

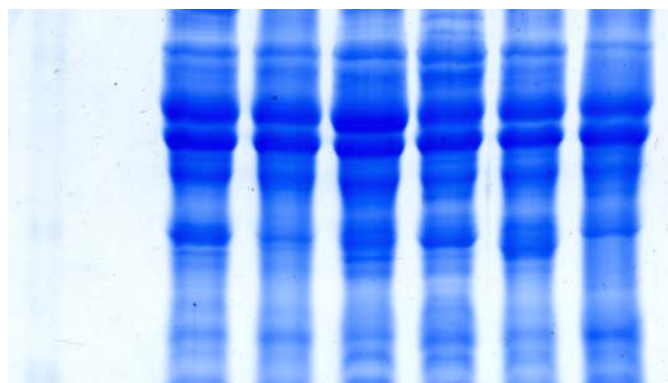


Fig. 12 – Colorazione di Comassie del gel SDS-PAGE 10%.

4.3.2 VITELLOGENINA

L'analisi Western blot per la proteina vitellogenina nel plasma di *Z. ophiocephalus* non ha evidenziato differenti espressioni proteiche tra i due campionamenti; mentre differenze d'espressione sono state rilevate tra i sessi indipendentemente dalla stagione. Utilizzando il programma di elaborazione ImageMaster–TotalLab (GE Healthcare, UK) è stata rivelata una singola banda di 66 kDa nelle femmine (Fig.13a), mentre nei maschi (Fig. 13b) è stata evidenziata la presenza di forme multiple della proteina rivelando, oltre alla banda a 66 kDa, un'ulteriore banda a 75 kDa. (Fig. 13).

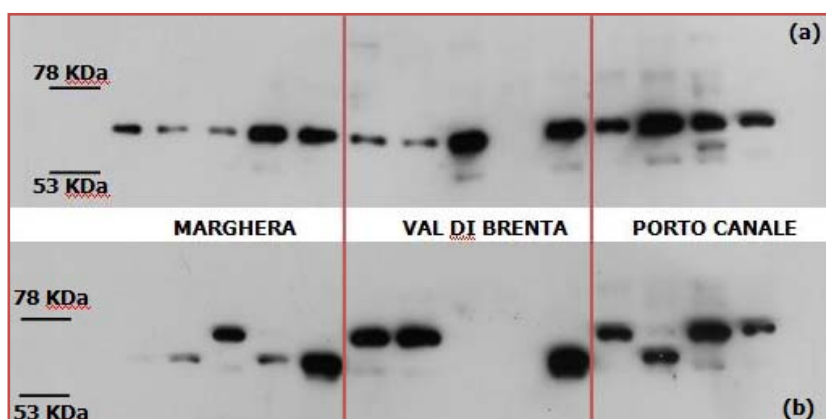


Fig. 13 – Analisi Western blot per VTG in plasma di femmine (a) e maschi (b) di *Z. ophiocephalus*.

Osservando l'espressione proteica dei maschi, si riscontra maggiormente la banda a minor peso molecolare negli individui campionati a Marghera, mentre la banda a 75kDa è espressa prevalentemente negli animali raccolti a Porto Canale.

4.3.3 STRESS OSSIDATIVO

L'analisi Western blot condotta sui campioni di fegato raccolti in autunno non ha permesso di evidenziare alcuna specificità per gli anticorpi anti-Acroleina e anti-MDA, mentre risultati interessanti sono stati ottenuti utilizzando gli anticorpi anti-HNE (Fig. 14a) e anti-NT (Fig. 14b).

Tali anticorpi hanno marcato le proteine danneggiate dallo stress ossidativo al di sotto dei 66 KDa (ImageMaster–TotalLab, GE Healthcare, UK) evidenziando un andamento crescente di espressione secondo il seguente schema: Valle di Brenta, Porto Canale, Marghera. Inoltre, i controlli rappresentati dagli animali stabulati in acqua artificiale presentavano i livelli più bassi di espressione proteica.

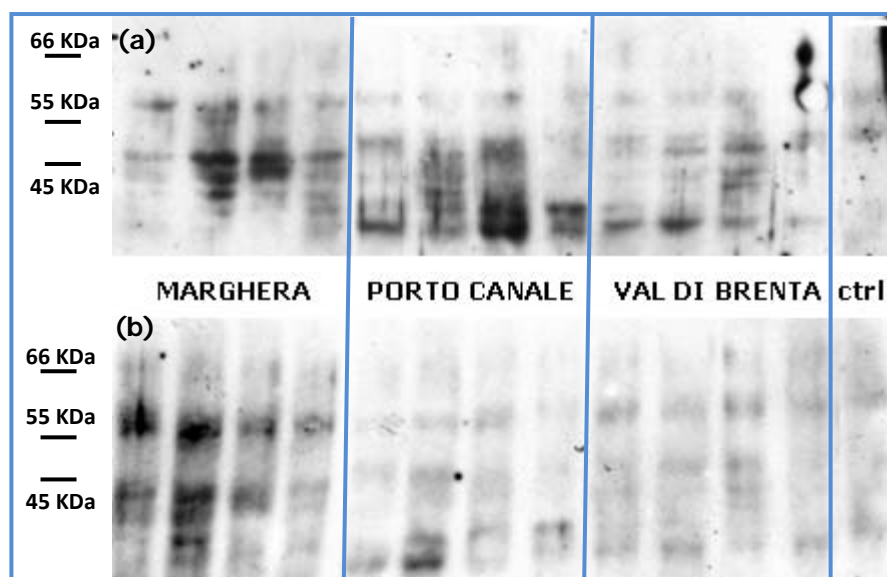


Fig. 14 – Analisi Western blot per HNE (a) e NT (b) in fegato di *Z. ophiocephalus* campionati in autunno.

4.4 ANALISI T-BARS

I risultati della determinazione della MDA plasmatica mediante saggio dell'acido tiobarbiturico (TBA) sono ancora preliminari. L'analisi è stata condotta su 10 animali per sito (5 maschi e 5 femmine) e su 4 animali di controllo.

La determinazione spettrofotometrica della sostanza TBA reattiva (TBA-*reactive substance*, TBARS) negli animali campionati in Laguna di Venezia ha evidenziato il valore medio più elevato di MDA plasmatica nelle femmine raccolte a Porto Marghera, mentre il valore più basso è stato riscontrato nei maschi di Porto Canale (Tab. 5). Inoltre, valori molto inferiori a quelli riscontrati negli animali campionati nella Laguna di Venezia sono stati riscontrati negli individui di controllo, rappresentati dagli animali stabulati in acqua artificiale. Tuttavia, la quantificazione della MDA plasmatica ha messo in evidenza un'elevata variabilità individuale in tutti i gruppi analizzati.

sito	sex	min	max	media	Dev.St	Err.St.	n
MARGHERA	M	33,92	114,04	91,42	32,53	14,55	5
	F	43,27	340,67	178,76	125,38	56,07	5
VAL DI BRENTA	M	45,99	119,63	81,92	31,09	13,90	5
	F	86,86	278,28	135,03	81,85	36,61	5
PORTO CANALE	M	41,16	119,28	78,99	28,10	12,56	5
	F	22,40	191,66	102,26	65,07	29,10	5
CONTROLLO	M	13,75	64,46	37,01	20,94	10,47	4

Tab. 5 – Valori di MDA plasmatica in *Zosterisessor ophiocephalus* espressi come MDA μM .

4.5 DOSAGGIO DEGLI STEROIDI

4.5.1 VALIDAZIONE DEL DOSAGGIO IN *Zosterisessor ophiocephalus* e *Tapes philippinarum*

I risultati dei test di diluizione e di ripetibilità per gli steroidi sessuali sono riportati in Tabb. 6 e 7. Sia in *Zosterisessor ophiocephalus* che *Tapes philippinarum*, il coefficiente di determinazione (r^2) evidenzia una ridotta dispersione dei punti e il valore medio del coefficiente di variazione *intra-assay* (C.V. %) conferma la buona riproducibilità del sistema di dosaggio.

<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>				
ORMONE	$y = ax + b$	r^2	C.V. %	R.E. %
TESTOSTERONE	$y = 9,84x + 0,09$	0,997	6,26	94,87
ESTRADIOLO	$y = 11,28x - 0,11$	0,996	8,24	95,44
PROGESTERONE	$y = 14,98x - 0,97$	1,00	9,02	96,02

Tab. 6 – Risultati dei test di validazione in *Z. ophiocephalus*.

<i>Tapes philippinarum</i>				
ORMONE	$y = ax + b$	r^2	C.V. %	R.E. %
TESTOSTERONE	$y = 16,36x - 0,13$	0,983	7,23	66,53
ESTRADIOLO	$y = 7,70x - 0,17$	0,997	8,40	55,82
PROGESTERONE	$y = 16,28x - 0,28$	0,996	4,82	68,38

Tab. 7 – Risultati dei test di validazione in *T. philippinarum*.

4.5.2 *Zosterisessor ophiocephalus*

Il dosaggio RIA ha consentito la quantificazione degli steroidi sessuali nel muscolo di *Z. ophiocephalus* e i risultati così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica al fine di evidenziare l'influenza delle variabili stagione di campionamento, sito di prelievo e sesso sui livelli dei tre ormoni dosati: progesterone, testosterone, ed estradiolo.

TESTOSTERONE

L'analisi GLM (*General Linear Model*) nidificata applicata ai livelli di testosterone indica che il sito di campionamento ($p < 0,01$) e, in maniera meno marcata, il sesso ($p < 0,01$) sono i fattori che influenzano maggiormente i livelli di testosterone mentre la stagione sembra ininfluenza ($p = 0,46$) (Tab. 8 e Fig. 15).

Se si analizzano separatamente i dati delle due stagioni, primavera ed autunno, la differenza dovuta al sito di campionamento si mantiene in entrambi ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, rispettivamente). Per quanto riguarda la differenza dovuta al sesso, essa è fortemente presente in primavera (riproduzione), mentre scompare in autunno (riposo sessuale) rimanendo al limite della significatività ($p < 0,01$; $p = 0,05$ rispettivamente).

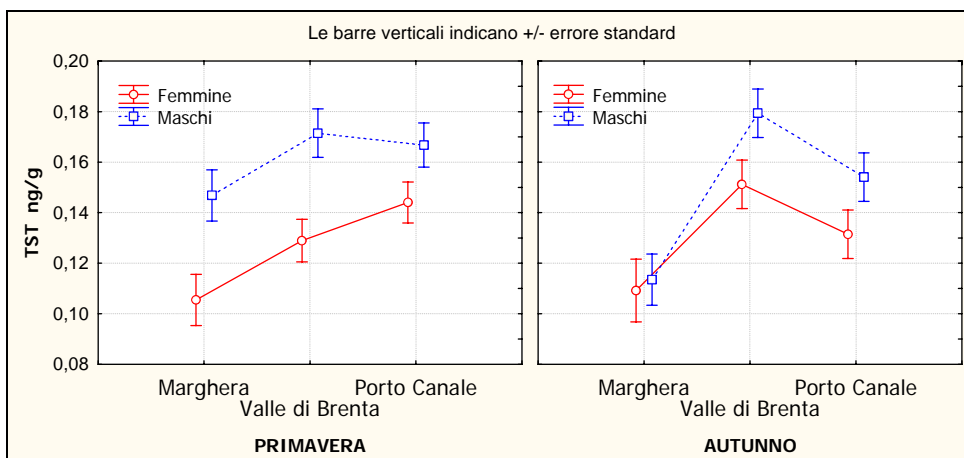


Fig. 15 – Livelli di testosterone (TST) in muscolo di *Z. ophiocephalus* nei diversi siti nelle due stagioni campionate.

ESTRADIOLO

Sottoponendo i valori di concentrazione dell'estradiolo ad analisi GLM nidificata si evidenzia l'influenza della stagione di campionamento ($p < 0,05$) e del sesso ($p < 0,05$), mentre il sito di campionamento in questo caso non sembra influenzare l'ormone ($p = 0,12$) (Tab. 9 e Fig. 16).

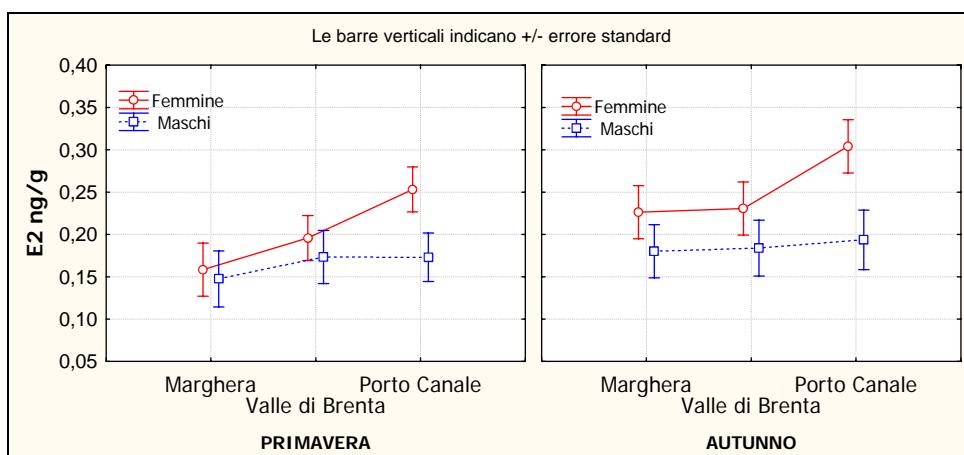


Fig. 16 – Livelli di estradiolo (E2) in muscolo di *Z. ophiocephalus* nei diversi siti nelle due stagioni campionate.

PROGESTERONE

Il dosaggio del progesterone su muscolo di *Z. ophiocephalus* ha rilevato valori di concentrazione dell'ormone più elevati di quelli degli altri steroidi sessuali analizzati, quali estradiolo e testosterone (Tab. 10 e Fig. 17).

L'analisi GLM (*General Linear Model*) nidificata applicata ai livelli di progesterone indica che il fattore che maggiormente influenza questo ormone è il sito di campionamento ($p < 0,001$) mentre il sesso e la stagione sembrano ininfluenti ($p = 0,49$ e $p = 0,09$ rispettivamente).

L'analisi distinta per le due stagioni di campionamento conferma questo risultato indicando che i livelli di progesterone sono influenzati unicamente dal sito di campionamento e non dal sesso degli animali (primavera: $p < 0,06$ e $p = 0,24$ rispettivamente; autunno: $p < 0,01$ e $p = 0,93$ rispettivamente).

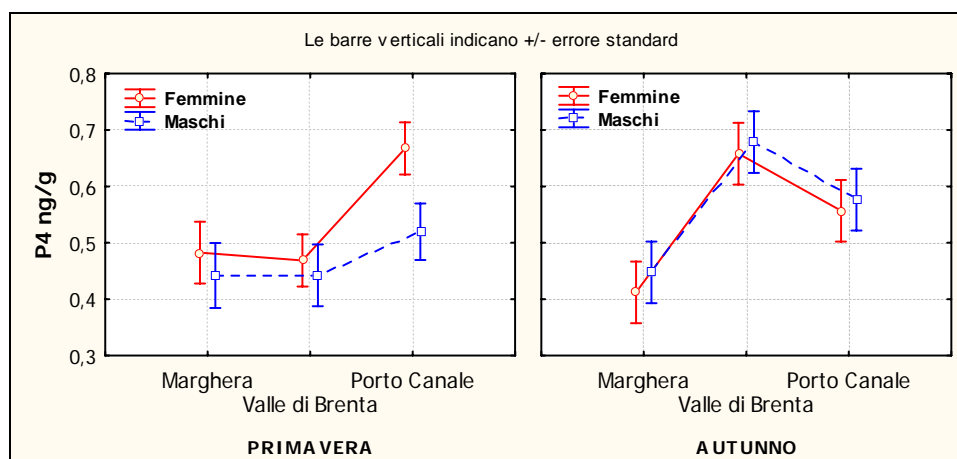


Fig. 17 – Livelli di progesterone (P4) in muscolo di *Z. ophiocephalus* nei diversi siti nelle due stagioni campionate.

TST ng/g		PRIMAVERA						AUTUNNO					
sito	sessso	min	max	media	DS	ES	n	min	max	media	DS	ES	n
MARGHERA	M	0,10	0,19	0,15	0,03	0,01	9	0,08	0,17	0,11	0,03	0,01	9
	F	0,08	0,17	0,11	0,03	0,01	9	0,08	0,15	0,11	0,02	0,01	6
VAL DI BRENTA	M	0,11	0,23	0,17	0,03	0,01	10	0,11	0,24	0,18	0,04	0,01	10
	F	0,08	0,21	0,13	0,04	0,01	13	0,12	0,18	0,15	0,02	0,01	10
PORTO CANALE	M	0,13	0,20	0,17	0,02	0,01	12	0,13	0,21	0,15	0,03	0,01	10
	F	0,11	0,26	0,14	0,04	0,01	14	0,11	0,17	0,13	0,02	0,01	10

Tab. 8 - Valori di concentrazione di testosterone in muscolo di *Z. ophiocephalus* espressi in ng/g.

E2 ng/g		PRIMAVERA						AUTUNNO					
sito	sessso	min	max	media	DS	ES	n	min	max	media	DS	ES	n
MARGHERA	M	0,10	0,21	0,15	0,04	0,01	10	0,10	0,24	0,18	0,05	0,01	10
	F	0,11	0,21	0,16	0,03	0,01	10	0,09	0,37	0,23	0,08	0,02	10
VAL DI BRENTA	M	0,10	0,24	0,17	0,04	0,01	10	0,08	0,28	0,18	0,08	0,03	9
	F	0,13	0,30	0,20	0,04	0,01	14	0,12	0,41	0,23	0,09	0,03	10
PORTO CANALE	M	0,12	0,28	0,17	0,04	0,01	12	0,15	0,22	0,19	0,02	0,01	8
	F	0,14	1,07	0,25	0,24	0,06	14	0,16	0,47	0,30	0,11	0,03	10

Tab. 9 - Valori di concentrazione di estradiolo in muscolo di *Z. ophiocephalus* espressi in ng/g.

P4 ng/g		PRIMAVERA						AUTUNNO					
sito	sessso	min	max	media	DS	ES	n	min	max	media	DS	ES	n
MARGHERA	M	0,22	0,75	0,44	0,19	0,06	9	0,17	0,65	0,45	0,14	0,05	10
	F	0,24	0,71	0,48	0,15	0,05	10	0,17	0,77	0,41	0,19	0,06	10
VAL DI BRENTA	M	0,25	0,59	0,44	0,11	0,03	10	0,51	0,99	0,68	0,18	0,06	10
	F	0,19	0,78	0,47	0,18	0,05	14	0,52	0,81	0,66	0,11	0,03	10
PORTO CANALE	M	0,23	0,78	0,52	0,17	0,05	12	0,37	0,75	0,58	0,11	0,03	10
	F	0,31	1,24	0,67	0,26	0,07	14	0,29	0,78	0,56	0,16	0,05	10

Tab. 10 - Valori di concentrazione di progesterone in muscolo di *Z. ophiocephalus* espressi in ng/g.

4.5.3 *Tapes philippinarum*

Il dosaggio RIA ha consentito la quantificazione degli steroidi sessuali (progesterone, testosterone ed estradiolo) nella ghiandola digestiva di *T. philippinarum*. I risultati ottenuti sono stati quindi sottoposti ad analisi statistica al fine di evidenziare l'influenza delle variabili stagione, anno di campionamento e sito di prelievo sui livelli degli ormoni dosati.

Non è stato possibile analizzare i dati distinguendo gli animali per sesso perché nella maggior parte dei casi i gameti non erano riconoscibili.

Gli steroidi si sono rivelati dosabili e presenti in tutti i campioni; il progesterone rappresenta l'ormone dosato in concentrazioni maggiori rispetto agli altri steroidi monitorati.

TESTOSTERONE

I valori di testosterone (TST) quantificati nella primavera 2007 sono simili per tutti i siti, ad eccezione di Cà Roman, che presenta valori significativamente più elevati (ANOVA, $p < 0,01$). In autunno 2007 non vi sono, invece, differenze statisticamente significative tra i quattro siti ($p = 0,07$) (Tab. 11 e Fig. 18).

Nella primavera del 2008 i valori di TST più elevati si registrano a Palude del Monte, mentre i più bassi a Valle di Brenta (ANOVA, $p = 0,013$). L'analisi GLM nidificata individua la maggior fonte di variabilità nel fattore sito ($p < 0,001$), mentre i fattori anno e stagione non influenzano la variabile indipendente.

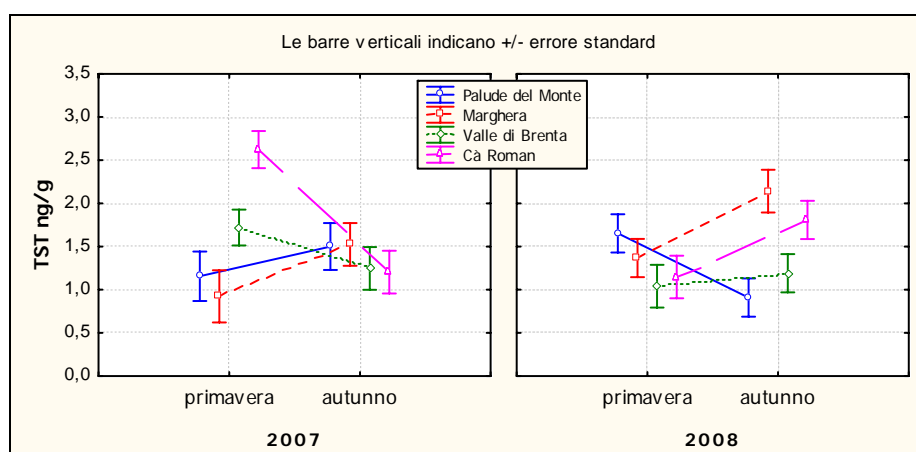


Fig. 18 – Livelli di testosterone (TST) in ghiandola digestiva di *T. philippinarum* nei diversi siti di prelievo nei due anni di campionamento.

ESTRADIOLO

I valori di estradiolo (E2) riscontrati nei campioni raccolti nel 2007 risultano più elevati di quelli del 2008 (test t, $p < 0,01$), come osservato per il progesterone. Dall'analisi GLM nidificata dei fattori anno, stagione e sito di campionamento, la variabile che maggiormente influenza la concentrazione di E2 risulta essere il sito, seguita dalla variabile anno. La stagione di campionamento non influenza, invece, in modo significativo la concentrazione dell'ormone (Tab. 12 e Fig. 19).

Nella primavera del 2007 i valori di E2 sono significativamente più elevati nei siti Valle di Brenta e Cà Roman, rispetto a Palude del Monte e Marghera. Nell'autunno dello stesso anno la situazione è invertita, con valori di E2 più elevati in questi ultimi due siti.

Nel 2008 la situazione primaverile non si discosta molto da quanto osservato nell'anno precedente: Valle di Brenta presenta i valori di E2 più bassi, mentre Palude del Monte i più elevati; gli altri due siti si collocano in una posizione intermedia. In autunno non sono state, invece, riscontrate differenze nei valori di concentrazione ormonale.

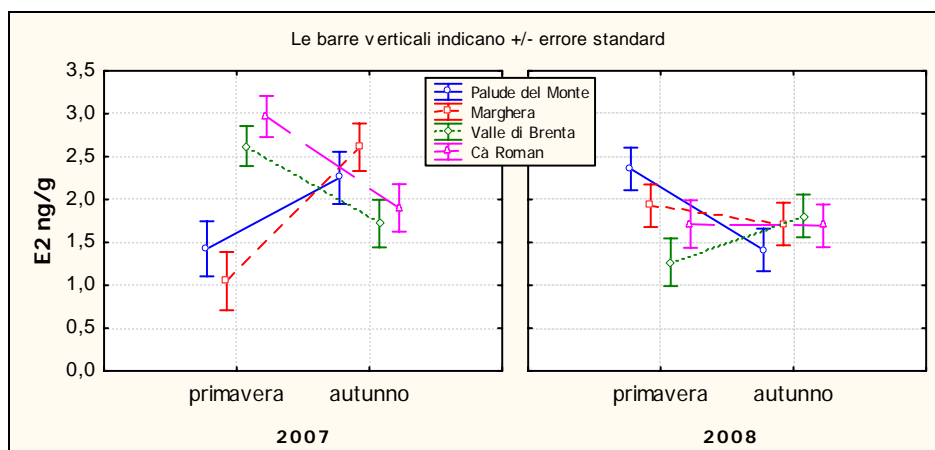


Fig. 19 – Livelli di estradiolo (E2) in ghiandola digestiva di *T. philippinarum* nei diversi siti di prelievo nei due anni di campionamento.

PROGESTERONE

I valori del progesterone riscontrati nei campioni di vongole del 2007 sono risultati essere globalmente più elevati di quelli del 2008 (test t, $p < 0,001$). Andando ad analizzare contemporaneamente i fattori, anno di campionamento, stagione e sito, tramite analisi GLM ad effetti nidificati, risulta essere l'anno il fattore che più influenza la variabilità (Tab. 13 e Fig. 20). Inoltre, significativa risulta anche l'influenza del sito ($p < 0,01$), mentre la stagione non ha alcun effetto sulla concentrazione ormonale ($p = 0,18$).

Data la differenza nei livelli del progesterone riscontrata tra i due anni di campionamento è stata effettuata un'analisi separata per il 2007 e il 2008. Nella primavera del 2007 i valori di P4 risultano essere significativamente inferiori nei siti di Marghera e Palude del Monte, rispetto a Valle di Brenta e Cà Roman, mentre nell'autunno dello stesso anno questo andamento si inverte, con valori più elevati di P4 a Palude del Monte e a Marghera. Tali differenze non si evidenziano nel 2008, né in primavera né in autunno.

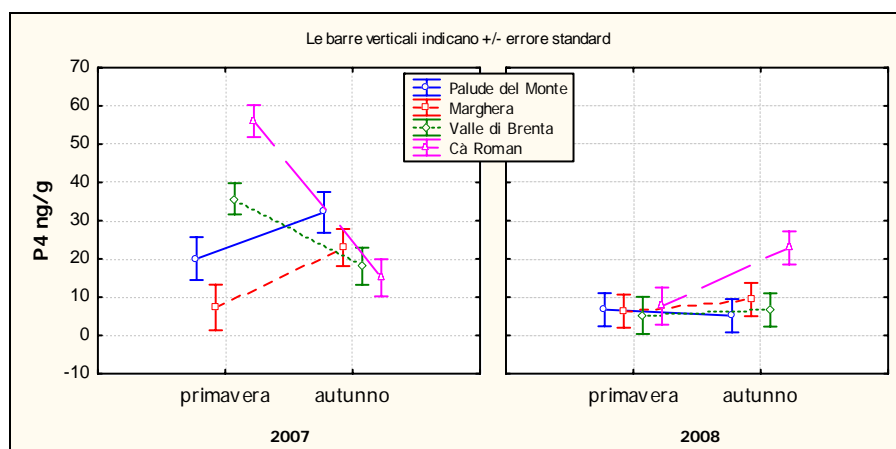


Fig. 20 – Livelli di progesterone (P4) in ghiandola digestiva di *T. philippinarum* nei diversi siti di prelievo nei due anni di campionamento.

TST ng/g	PRIMAVERA						AUTUNNO						
	sito	min	max	media	DS	ES	n	min	max	media	DS	ES	n
anno	PALUDE DEL MONTE	0,49	1,75	1,16	0,48	0,16	9	0,89	2,47	1,50	0,48	0,15	10
	MARGHERA	0,59	1,44	0,92	0,26	0,09	8	1,12	1,78	1,52	0,21	0,06	12
2007	VAL DI BRENTA	0,88	3,29	1,72	0,77	0,19	17	0,51	2,15	1,25	0,50	0,14	12
	CA' ROMAN	1,27	5,69	2,54	1,11	0,28	16	0,84	1,54	1,20	0,22	0,06	12
anno	PALUDE DEL MONTE	0,62	3,56	1,65	0,76	0,20	15	0,38	2,21	0,91	0,50	0,13	15
	MARGHERA	0,86	2,08	1,37	0,37	0,10	15	0,73	7,13	2,14	1,80	0,52	12
2008	VAL DI BRENTA	0,62	1,45	1,04	0,26	0,07	12	0,62	3,14	1,19	0,63	0,16	15
	CA' ROMAN	0,66	2,11	1,15	0,40	0,12	12	0,49	6,18	1,81	1,83	0,47	15

Tab. 11 - Valori di concentrazione di testosterone in ghiandola digestiva di *T. philippinarum* espressi in ng/g.

E2 ng/g	PRIMAVERA						AUTUNNO						
	sito	min	max	media	DS	ES	n	min	max	media	DS	ES	n
anno	PALUDE DEL MONTE	0,77	2,11	1,43	0,48	0,16	9	1,50	3,50	2,25	0,62	0,20	10
	MARGHERA	0,76	1,62	1,05	0,28	0,10	8	1,94	3,49	2,61	0,41	0,12	12
2007	VAL DI BRENTA	1,38	4,88	2,62	1,10	0,27	17	0,90	2,97	1,72	0,66	0,19	12
	CA' ROMAN	1,31	6,48	2,97	1,32	0,33	16	1,58	2,25	1,90	0,21	0,06	12
anno	PALUDE DEL MONTE	1,37	4,95	2,36	0,94	0,24	15	0,69	2,97	1,41	0,70	0,18	15
	MARGHERA	1,01	3,07	1,93	0,61	0,16	15	0,51	6,35	1,71	1,49	0,38	15
2008	VAL DI BRENTA	0,70	2,01	1,27	0,34	0,10	12	1,00	5,51	1,81	1,09	0,28	15
	CA' ROMAN	0,66	3,26	1,71	0,92	0,27	12	0,45	5,30	1,69	1,66	0,43	15

Tab. 12 - Valori di concentrazione di estradiolo in ghiandola digestiva di *T. philippinarum* espressi in ng/g.

P4 ng/g	PRIMAVERA						AUTUNNO						
	sito	min	max	media	DS	ES	n	min	max	media	DS	ES	n
anno	PALUDE DEL MONTE	4,12	55,24	20,09	17,13	5,71	9	7,47	95,38	32,17	24,19	7,65	10
	MARGHERA	3,49	12,34	7,32	3,99	1,41	8	9,99	53,42	22,99	10,51	3,03	12
2007	VAL DI BRENTA	14,29	76,54	35,75	19,77	4,79	17	4,85	33,59	18,09	9,58	2,77	12
	CA' ROMAN	10,16	115,53	56,05	30,48	7,62	16	8,34	22,31	15,11	3,44	0,99	12
anno	PALUDE DEL MONTE	3,93	13,14	6,75	3,06	0,79	15	1,39	21,24	5,17	4,84	1,25	15
	MARGHERA	4,45	8,64	6,35	1,52	0,39	15	2,66	32,24	9,37	7,58	1,96	15
2008	VAL DI BRENTA	3,18	8,28	5,27	1,76	0,51	12	2,82	22,82	6,67	5,00	1,29	15
	CA' ROMAN	2,82	15,80	7,67	4,75	1,37	12	1,43	125,00	22,89	40,16	10,37	15

Tab. 13 - Valori di concentrazione di progesterone in ghiandola digestiva di *T. philippinarum* espressi in ng/g.

5. DISCUSSIONE

L'analisi dei risultati ottenuti è di seguito presentata analizzando, per ciascuna specie monitorata, i singoli marcatori presi in esame.

5.1 BIOINDICATORI

Il pesce bentonico *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei: Gobiidae) e la vongola verace *Tapes philippinarum* sono stati selezionati come bioindicatori nel presente studio di biomonitoraggio in quanto vivono a stretto contatto con il fondo, sono stanziali e reperibili in Laguna di Venezia.

I risultati ottenuti confermano l'efficacia di *Z. ophiocephalus* come modello di valutazione della qualità ambientale e l'utilità dei marcatori analizzati. Infatti, la quasi totalità delle analisi condotte su tale specie ha messo in evidenza differenze tra i diversi siti campionati ed il controllo rappresentato dagli animali stabulati in acqua artificiale.

Al contrario, l'impossibilità di definire facilmente il sesso, lo stadio di gametogenesi, l'asincronicità che caratterizza la gonade dei bivalvi e l'influenza dei fattori ambientali contribuiscono a rendere difficile l'utilizzo di *Tapes philippinarum* come bioindicatore, soprattutto analizzando come marcatore il solo dosaggio ormonale.

5.2 HSP70 INDUCIBILE

L'analisi Real Time sui campioni di fegato di *Z. ophiocephalus*, seppur condotta con *primers* specifici per la specie in esame, non ha permesso di evidenziare una diversa espressione del messaggero della forma inducibile di HSP70. In particolare, nessuna variazione significativa è stata individuata nei campioni raccolti nei diversi siti della Laguna di Venezia, né tra essi ed il controllo, rappresentato dagli animali stabulati in acqua artificiale. In base a queste osservazioni possiamo stabilire che l'espressione del messaggero della forma inducibile di HSP70 non sia un buon biomarcatore da utilizzare in studi di biomonitoraggio.

Infatti, seppure le HSP70 siano riconosciute come buoni indicatori di stress nei pesci (Basu *et al.*, 2002; Iwama *et al.*, 2004), esse non possono essere

considerate un biomarcatore discriminatorio poiché l'esposizione a contaminanti non sempre comporta un'induzione dell'espressione di tale gene e/o proteina (Carnevali e Maradonna, 2007). Ad esempio, nessuna variazione d'espressione è stata riscontrata nelle gonadi di *Danio rerio* a seguito di un'esposizione a nonilfenolo ed etilestradiolo (Lin e Janz, 2006); al contrario, in individui di *Gobius niger* esposti a differenti contaminanti è stato osservato un incremento d'espressione genica di HSP70 a livello epatico (Maradonna e Carnevali, 2007).

La mancata alterazione d'espressione riscontrata nei nostri campioni può essere giustificata anche dal sistema di attivazione di tale gene. Infatti, si ritiene che l'espressione delle HSP avvenga in conseguenza del legame di un fattore per la trascrizione dell'HSP attivato (HSF – *Heat Shock Transcription Factor*), con particolari regioni promoter chiamate HSE (*Heat Shock Element*) situate vicino ai geni codificanti per l'HSP. La maggior parte di questi geni non contiene introni, per cui l'mRNA può essere immediatamente tradotto in proteine entro pochi minuti dall'esposizione allo stressore (Mayer *et al.*, 2000), in un tempo troppo rapido per poter ritenere discriminatoria l'alterazione d'espressione di tale gene in individui esposti a contaminazione ambientale.

Del resto, anche con l'analisi immunocistochemica, nessuna immunoreattività all'anticorpo HSP70 è stata riscontrata nei diversi tessuti processati. Tuttavia, l'anticorpo commerciale utilizzato in tale studio ha permesso precedentemente di distinguere la forma inducibile di HSP70 in diverse specie ittiche: branzino (Poltronieri *et al.*, 2007), trota e carpa (Poltronieri *et al.*, 2008) sottoposte a stress da trasporto.

La mancanza di immunoreattività all'anticorpo può essere direttamente collegata ai livelli d'espressione del messaggero. Pur essendo la Real Time una metodica molto sensibile, nei campioni analizzati sono stati determinati bassi livelli d'espressione che comportano una limitata traduzione in proteina, tale da essere difficilmente rilevabile mediante analisi immunocistochemica.

L'assenza di immunoreattività potrebbe anche dipendere dalla mancata traduzione dell'mRNA in proteina al momento della fissazione dei campioni analizzati, rendendo vana l'analisi effettuata.

Per tali motivi HSP70 è considerato un biomarcatore non specifico e poco affidabile in studi di biomonitoraggio (Carnevali e Maradonna, 2007) sebbene sia stato utilizzato recentemente in diversi studi di esposizione a contaminanti (Weber, 2004; Migliarini *et al.*, 2005).

5.3 CITOCROMO CYP1A1

Nei pesci, la subfamiglia CYP1A, che comprende i geni CYP1A1 e CYP1A2, è responsabile dei processi di biotrasformazione di moltissime sostanze xenobiotiche, come gli idrocarburi policiclici aromatici (PAH), i policlorobifenili (PCB) e diossine (Goksøy e Förlin, 1992). L'induzione della citocromo P4501A (CYP1A) nei pesci è stata definita come un segnale d'allerta precoce, sensibile e opportuno per la presenza di contaminanti xenobiotici in ambiente acquatico (Goksøy e Förlin, 1992; Bucheli e Fent, 1995; Goksøy, 1995). Pertanto, l'induzione di CYP1A1 può fornire importanti informazioni sull'inquinamento ambientale pur non identificando le sostanze chimiche che l'hanno indotta (Goksøy e Förlin, 1992).

Ad esempio, Courtenay *et al.* (1999) hanno osservato valori d'espressione del messaggero di CYP1A1 differenti confrontando popolazioni di *Microgadus tomcod* campionati in zone inquinate e siti non contaminati.

Nel nostro studio, l'analisi Real Time PCR sui campioni di fegato di *Z. ophiocephalus* ha permesso di evidenziare espressioni del messaggero di CYP1A1 significativamente più elevati negli animali campionati a Porto Marghera, sia nei maschi che nelle femmine. Nessuna differenza di espressione è stata invece riscontrata tra i campioni raccolti a Porto Canale e Val di Brenta e gli animali di controllo stabulati in acqua artificiale. In base a questa osservazione, possiamo affermare che l'elevato valore d'espressione del messaggero di CYP1A1 riscontrato negli animali di Porto Marghera potrebbe essere associato ad una maggior concentrazione di contaminanti in tale area rispetto alle altre zone monitorate in Laguna di Venezia.

Tale conclusione concorda con quanto riportato sullo stato ambientale dei bacini della Laguna di Venezia da Losso e Volpi Ghirardini (2010). Gli autori, basandosi sui numerosi studi di biomonitoraggio della Laguna di Venezia, hanno concluso che il bacino di Lido è la zona maggiormente impattata poiché influenzata dalla presenza di un'estesa area industriale e della città di Venezia. In particolare, analizzando il solo bacino del Lido, risultano maggiormente inquinate le zone limitrofe all'area industriale di Porto Marghera dove è elevata la tossicità dei sedimenti (Losso e Volpi Ghirardini, 2010).

5.4 VITELLOGENINA

Tra tutti i biomarcatori utilizzati nei programmi di biomonitoraggio, la vitellogenina (VTG) è il *biomarker* più importante per testare il potenziale estrogenico dei contaminanti e l'esposizione degli animali a sostanze estrogeniche presenti in ambiente (Hiramatsu *et al.*, 2006).

La VTG è una proteina presente normalmente solo nelle femmine mature, ma i distruttori endocrini estrogenici possono mimare gli effetti degli estrogeni naturali inducendo la sintesi di vitellogenina anche nei maschi e nelle femmine immature (Christensen *et al.*, 1999; Pantere *et al.*, 1998; Arukwe *et al.*, 2000b). Nei pesci, la presenza e l'incremento dei valori di VTG nel plasma dei maschi esposti a contaminanti sono stati dimostrati in numerosi studi di laboratorio (ad esempio, Sumpter e Jobling, 1995; Arukwe *et al.*, 2000a; Lindholst *et al.*, 2000; Hemmer *et al.*, 2001) e in diversi studi di monitoraggio (ad esempio, Purdom *et al.*, 1994; Mellanen *et al.*, 1999; Lye *et al.*, 1999).

Nel nostro studio, mediante Western blot, è stata evidenziata l'espressione proteica della vitellogenina anche nei maschi di *Zosterisessor ophiocephalus* campionati nei diversi siti della Laguna di Venezia. L'anticorpo anti-VTG ha permesso di riconoscere due bande distinte di tale proteina: un prodotto con peso molecolare di 66 KDa, riscontrato anche nelle femmine e un prodotto con peso molecolare di 75 KDa, la cui espressione varia tra i differenti siti campionati.

Tale dato ci permette di ipotizzare la presenza di contaminanti ambientali nei diversi siti campionati in Laguna di Venezia che possono indurre la sintesi di VTG. Inoltre, la differente espressione proteica tra i diversi siti e la presenza di forme multiple della proteina ci inducono ad ipotizzare la presenza di differenti contaminanti ambientali tra i diversi bacini campionati tali da indurre la sintesi anche di differenti forme di VTG nei maschi di *Z. ophiocephalus*. Tale osservazione trova riscontro in quanto osservato in altre specie, dove sono stati isolati diversi geni VTG e sono state determinate tre diverse forme, denominate Vg-A, Vg-B e Vg-C o Pv-less (Matsubara *et al.*, 2003). Inoltre, è stato ipotizzato che ciascuna forma di VTG possa svolgere una differente funzione fisiologica (Carnevali e Maradonna, 2007) e possa avere una differente reattività all'estradiolo, come dimostrato da Takemura e Kim (2001) in tilapia *Oreochromis mossambicus*.

Nelle femmine di *Z. ophiocephalus* l'anticorpo anti-VTG ha permesso di evidenziare un unico prodotto con peso molecolare di 66 kDa con la pressoché medesima espressione proteica tra i siti campionati, a differenza di quanto

riscontrato negli individui di sesso maschile. Probabilmente, nelle femmine, la presenza di contaminanti ambientali influenza poco l'espressione proteica della vitellogenina poiché in questi animali è maggiore la concentrazione dell'estradiolo (Carnevali e Maradonna, 2007), come riscontrato, in questo studio, mediante analisi radioimmunologica.

In base a quanto osservato, e a quanto riportato in letteratura, possiamo confermare l'efficacia e la validità della vitellogenina come *biomarker* in studi di biomonitoraggio.

5.5 STRESS OSSIDATIVO

L'uso di parametri dello stress ossidativo in studi di biomonitoraggio e di inquinamento ambientale negli ultimi anni è sempre più diffuso soprattutto associato ad ulteriori *biomarker* (Valavanidis *et al.*, 2006).

Nel presente studio è stata valutata la produzione di malondialdeide (MDA), acroleina, 4-idrossi-2-nonenale (HNE) e nitrotirosina (NT) come biomarcatori di stress ossidativo mediante analisi immunoistochimica, Western blot e saggio TBARS. MDA, acroleina e HNE rappresentano i prodotti di perossidazione degli acidi grassi, mentre la NT è considerata un biomarcatore specifico per la perossidazione dell'acido nitrico (Ischiropoulos *et al.*, 2002; Aldini *et al.*, 2007).

L'analisi immunoistochimica ha permesso di evidenziare una positività agli anticorpi anti-HNE e anti-NT a livello dei centri melanomacrofagici (CMM) in milza, rene, fegato e ovaio di *Z. ophiocephalus*.

I CMM sono gruppi distinti di cellule pigmentate presenti nei tessuti di vertebrati eterotermi (per *review*, Agius e Roberts, 2003). Tra le numerose funzioni, i CMM sono coinvolti nella cattura e nello stoccaggio di prodotti della degenerazione cellulare e di materiali potenzialmente tossici, come la melanina, i radicali liberi e i cataboliti, ed il loro numero è in diretta relazione con le condizioni di stress a cui sono sottoposti gli animali (per *review*, Agius e Roberts, 2003). Basandosi su questa peculiarità, Wolke *et al.* (1995) hanno sostenuto in modo convincente l'utilizzo dei CMM come biomarcatori per la valutazione degli effetti innescati da un'esposizione a contaminanti. Inoltre, Fournie *et al.* (2001) hanno effettuato una dettagliata valutazione dell'utilizzo dei CMM come indicatori generali di esposizione in pesci campionati in ambienti degradati.

Nel presente studio, effettuando un'analisi quantitativa, nelle sezioni di milza, è stato osservato un numero di CMM immunoreattivi agli anticorpi anti-HNE e

anti-NT significativamente più elevato negli animali campionati a Marghera rispetto a quanto osservato negli individui di Porto Canale e Val di Brenta. In base a questa osservazione, possiamo affermare che l'incremento del numero di CMM potrebbe essere associato direttamente all'inquinamento ambientale. Tale conclusione concorda con quanto riportato negli ultimi anni in letteratura: diversi autori hanno dimostrato che il numero di CMM aumenta nella milza e nel fegato di pesci esposti a contaminazione ambientale (per *review*, Agius e Roberts, 2003).

L'ipotesi formulata viene avvalorata dalla mancata immunoreattività riscontrata sia per l'anticorpo anti-HNE che per l'anti-NT nei tessuti degli animali stabulati e detossificati confermando l'idoneità della conta dei CMM come bioindicatore specifico per valutare possibili condizioni di stress in ambiente acquatico.

Tali osservazioni sono supportate da quanto emerso dall'analisi dell'espressione proteica di HNE e NT mediante Western blot.

Mediante Western blot, sia l'anticorpo anti-HNE che l'anticorpo anti-NT hanno permesso il riconoscimento di prodotti con peso molecolare simile a quanto riportato in letteratura (Tanaka *et al.*, 2001). Inoltre, l'analisi Western blot ha evidenziato un segnale qualitativamente più marcato negli animali prelevati a Marghera rispetto agli individui raccolti a Porto Canale e Val di Brenta. Un debole segnale è stato, invece, evidenziato per entrambi i marcatori negli animali di controllo confermando che le differenze osservate tra i tre siti della Laguna di Venezia potrebbero essere legate all'esposizione di contaminanti.

Quanto osservato nella nostra condizione sperimentale concorda con le conclusioni tratte da Carney Almroth *et al.* (2008) che osservarono i valori più elevati di HNE nei pesci campionati in un fiume inquinato determinando che i parametri dello stress ossidativo erano in diretta correlazione con i livelli di rilascio delle sostanze tossiche in ambiente. Recentemente, Padmini *et al.* (2009) hanno osservato, mediante studi di Western blot, un incremento d'espressione della nitrotirosina in pesci campionati in estuari inquinati.

L'anticorpo policlonale anti-MDA non ha permesso di evidenziare l'espressione dei prodotti specifici della perossidazione lipidica né mediante Western blot né mediante analisi immunostochimica. Pertanto, è stata quantificata la MDA plasmatica mediante saggio TBARS: analisi ampiamente utilizzata per monitorare e quantificare la perossidazione lipidica (Armstrong e Browne, 1994; Duran e Talas, 2009; El-Sharaky *et al.*, 2009). Nel presente studio, i livelli più elevati di MDA plasmatica sono stati individuati negli animali campionati a Marghera,

mentre livelli inferiori sono stati determinati negli individui di Val di Brenta e Porto Canale, a differenza di quanto emerso con l'analisi immunocitochimica e Western blot, dove gli animali di Val di Brenta presentavano i minori livelli d'espressione. Tuttavia, i livelli più bassi di MDA plasmatica sono stati riscontrati negli animali di controllo.

Tali dati concordano con quanto descritto da Padmini e Usha Rani (2009) che determinarono un incremento significativo di MDA negli epatociti di pesci campionati in estuari inquinati se comparati con quelli provenienti da individui raccolti in estuari incontaminati, ribadendo l'importanza dei parametri dello stress ossidativo come biomarcatori in studi di monitoraggio ambientale. Inoltre, i dati emersi dal nostro studio concordano con quanto osservato da Pampanin *et al.* (2005), sempre in Laguna di Venezia, che osservarono un incremento di concentrazione di MDA nei mitili campionati nel bacino centro-settentrionale e i livelli più bassi negli animali raccolti nel bacino meridionale (Ca' Roman e Chioggia). Ulteriore riscontro ai dati emersi nel presente lavoro sono gli studi di biomonitoraggio condotti da Valavanidis *et al.* (2006) e Kochhann *et al.* (2009) che osservarono un incremento della concentrazione di MDA in numerosi tessuti di diverse specie ittiche esposte a contaminanti organici e metalli.

5.6 DOSAGGIO DEGLI STEROIDI SESSUALI

Gli steroidi sessuali, testosterone (TST), estradiolo (E2) ed progesterone (P4), si sono dimostrati presenti e quantificabili con la metodica radioimmunologica (RIA) sia nel muscolo di *Z. ophiocephalus* che nella ghiandola digestiva di *T. philippinarum*.

In *Z. ophiocephalus*, i risultati sembrano indicare una chiara influenza del sito di campionamento con livelli più bassi di testosterone e progesterone negli animali di Marghera rispetto a quelli riscontrati negli animali della laguna sud: Val di Brenta e Porto Canale. L'estradiolo invece, sebbene sia teoricamente l'ormone più sensibile all'azione dei distruttori endocrini, non sembra influenzato dal sito di campionamento. Le differenze riscontrate nella produzione di alcuni steroidi sessuali degli animali campionati nei diversi siti lagunari possono essere determinate dalla presenza di inquinanti che influenzano la maturazione gonadica e quindi la produzione degli ormoni. Tuttavia, analizzando i risultati, è necessario considerare dal punto di vista ambientale la localizzazione dei siti di campionamento. L'ubicazione delle zone campionate comporta inevitabilmente

alcune variazioni in termini di temperatura che possono influenzare il ciclo riproduttivo e di conseguenza i livelli degli steroidi sessuali determinando differenze che possono portare a conclusioni sbagliate.

In *T. philippinarum*, il progesterone si è confermato l'ormone maggiormente rappresentato fra quelli monitorati in questo studio così come già evidenziato da Negrato *et al.* (2008).

Rispetto alle variazioni dei livelli degli steroidi e alle loro possibili interazioni con i contaminanti presenti nell'ambiente, l'analisi statistica dei dati non ha indicato un andamento ben definito ma piuttosto differenze puntiformi e scostanti in tutti gli ormoni dosati. Alcune differenze, inoltre, sono quasi certamente imputabili a fattori ambientali diversi dai contaminanti, come dimostrato dal primo campionamento. Le analisi effettuate sugli animali di questo prelievo hanno evidenziato le maggiori differenze di concentrazione fra i siti per quasi tutti gli steroidi dosati, ma ciò è probabilmente dovuto all'intervallo di tempo troppo ampio intercorso fra i prelievi del bacino sud (Cà Roman e Val di Brenta) e quelli del bacino nord (Marghera e Palude del Monte), determinato da problemi di carattere tecnico. Lo sfasamento temporale di circa un mese ha comportato un grado di sviluppo gonadico maggiore e, di conseguenza, un diverso valore di concentrazione degli steroidi negli animali della laguna sud. Questo fenomeno, del tutto scomparso l'anno successivo, grazie probabilmente ad un campionamento più sincrono, indica che gli animali sono fortemente influenzati nel loro ciclo dai parametri ambientali, quali temperatura e fotoperiodo, e questo può essere fuorviante ai fini del monitoraggio sull'inquinamento ambientale. Il legame stretto fra i livelli di steroidi sessuali e il ciclo gametogenico e l'influenza che i diversi parametri hanno sul ciclo gonadico della vongola, rende quindi molto complesso indagare possibili alterazioni nei livelli di steroidi sessuali indotte dalla presenza di distruttori endocrini. D'altronde molti studi hanno dimostrato l'influenza dei parametri ambientali sul ciclo riproduttivo dei bivalvi e, oltre alla temperatura e al fotoperiodo, sono stati identificati anche ulteriori parametri, quali la disponibilità di cibo e la salinità (Rodríguez-Moscoso *et al.*, 1992; Urrutia *et al.*, 1999).

La mancanza di alterazioni statisticamente significative nelle concentrazioni degli steroidi riscontrate in questo lavoro trova riscontro con quanto osservato da Lavado *et al.* (2006b) nel mitilo *Mytilus edulis* esposto ad una miscela di alchilfenoli. Lo studio ha messo in evidenza che l'esposizione ai contaminanti non produceva alterazioni nelle concentrazioni degli steroidi liberi rilevate nelle gonadi.

In conclusione, i risultati ottenuti per *Z. ophiocephalus* dovrebbero essere approfonditi acquisendo informazioni precise sul rapporto tra la temperatura dell'acqua e la maturazione gonadica delle specie. Pertanto, in questo studio, il dato di concentrazione degli steroidi sessuali da solo non è sufficiente ai fini del monitoraggio ambientale mediante bioindicatori, tuttavia può fornire indicazioni utili se correlato agli altri parametri. Invece, in *T. philippinarum*, la variabilità nei livelli di steroidi sessuali, probabilmente determinata dalla stretta influenza dei parametri ambientali sullo sviluppo della gonade, riduce la loro potenzialità di essere usati come indicatori di effetti determinati da distruttori endocrini. Inoltre, la difficoltà di definire facilmente il sesso, lo stadio di gametogenesi e l'asincronicità che caratterizza la gonade dei bivalvi contribuiscono a rendere difficile l'utilizzo di questi animali in tal senso.

6. CONCLUSIONI

Lo studio di biomonitoraggio condotto su *Zosterisessor ophiocephalus* e *Tapes philippinarum* ha evidenziato:

- l'efficacia di *Z. ophiocephalus* come modello di valutazione della qualità ambientale e il difficile utilizzo di *T. philippinarum* come bioindicatore, se si analizza come marcatore il solo dosaggio ormonale;
- l'idoneità di molti bioindicatori analizzati: l'induzione dell'espressione genica di CYP1A e proteica della vitellogenina e dei marcatori dello stress ossidativo si è rivelata un segnale sensibile alla presenza di contaminanti ambientali;
- l'inefficacia del dosaggio ormonale e dell'espressione genica di HSP70 come bioindicatori. Il dosaggio ormonale degli steroidi sessuali si è rivelato non sufficiente, da solo, a condurre un'indagine di monitoraggio ambientale, ma può fornire indicazioni utili se correlato agli altri parametri;
- la necessità di individuare nuovi bioindicatori in *Tapes philippinarum*, come la vitellogenina o i marcatori dello stress ossidativo;
- l'importanza di ampliare l'area monitorata identificando altri siti di campionamento in tutti i bacini della Laguna al fine di ottenere un quadro più completo dello stato dell'intero ambiente lagunare;
- la necessità di aumentare il numero di esemplari da sottoporre a stabulazione in acqua artificiale campionando gli animali dai diversi bacini della Laguna di Venezia per allestire un esperimento di controllo completo.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adiyodi R.G. e Adiyodi K.G., 1983. Reproductive Biology of the Invertebrates. In: Adiyodi R.G., Adiyodi K.G. (Eds.), Oogenesis, Oviposition, Oosorption. vol. 1. Wiley, New York. 700 pp.
- Agius C. e Roberts R.J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis* 26, 499-509.
- Ahmad I., Hamid T., Fatima M., Chand H.S., Jain S.K., Athar M. e Raisuddin S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim Biophys Acta* 1523, 37-48.
- Aldini G., Dalle-Donne I., Maffei Facino R., Milzani A. e Carini M., 2007. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med Res Rev* 27, 817-868.
- Armstrong D. e Browne R., 1994. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol* 366, 43-58.
- Apitz S.E., Barbanti A., Bocci M., Carlin A., Montobbio L. e Berstein A.G., 2007. Sediments of the Venice Lagoon evaluated in a screening risk assessment approach to inform risk management strategies: Part I – Application of International sediment quality guidelines (SQGs). *IEAM* 3, 393-414.
- Arukwe A., Celius T., Walther B.T. e Goksøyr A., 2000a. Effects of xenoestrogene treatment on *zona radiata* protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol* 49, 159-170.
- Arukwe A., Förlin L. e Goksøyr A., 1997. Xenobiotic and steroid biotrasformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compounds, 4-nonylphenol. *Environ Toxicol Chem* 16, 2576-2583.
- Arukwe A., Knudsen F.R. e Goksøyr A., 1996. Fish zona radiate (eegshel) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 105, 418-422.
- Arukwe A., Thibaut R., Ingebrigtsen K., Celius T., Goksøyr A. e Cravedi J.P., 2000b. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol* 49, 289-304.
- Au D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar Pollut Bull* 48, 817-834.

- Barata C., Varo I., Navarro J.C., Arun S. e Porte C., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp Biochem Physiol C* 140, 175-186.
- Bargagli B., Cruscanti M., Leonzio C. e Bacci E., 1998. I bioindicatori. In: Vighi M., Bacci E., Ecotossicologia. UTET, Torino, Italia, pp. 237
- Basu N., Todgham A.E., Ackerman P.A., Bibeau M.R., Nakano K., Schulte P.M. e Iwama G.K., 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295, 173-183.
- Battocchio M., Gabai G., Mollo A., Veronesi M.C., Soldano F., Bono G. e Cairoli F., 1999. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. *Theriogenology* 51, 1059-1069.
- Bayne B.L., Livingstone D.R., Moore M.N. e Widdows J., 1976. A cytochemical and a biochemical index of stress in *Mytilus edulis* L.. *Mar Pollut Bull* 7, 221-224.
- Billinghurst Z., Clare A.S., Matsumura K. e Depledge M.H., 2000. Induction of cypris major protein in barnacle larvae by exposure of 4-*n*-nonylphenol and 17 β -oestradiol. *Aquat Toxicol* 47, 203-212.
- Blaise C., Gagné F., Pellerin J. e Hansen P.D., 1999. Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): a potential biomarker for endocrine disruption. *Environ Toxicol* 14, 455-465.
- Breder C.M.Jr. e Rosen D.E., 1966. Modes of reproduction in fishes. The American Museum of Natural History Press, New York, pp. 941.
- Bucheli T.D. e Fent K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit Rev Environ Sci Technol* 25, 201-268.
- Carnevali O. e Maradonna F., 2007. Genomic and proteomic approaches to study the effects of environmental toxicants on fish. *The Endocrine Disruptors*, 29-52.
- Carney Almroth B., Sturve J. e Förlin L., 2008. Oxidative damage in rainbow trout caged in a polluted river. *Mar Environ Res* 66, 90-91.
- Casillas E., Misitano D., Johnson L.L., Rhodes L.D., Collier T.K., Stein J.E., McCain B.B. e Varanasi U., 1991. Inducibility of spawning and reproductive success of female English sole (*Parophrys vetulus*) from urban and nonurban areas of Puget Sound, Washington. *Mar Environ Res* 31, 99-122.
- Cesari M. e Pellizzato M., 1990. Biologia di *Tapes philippinarum*. In: E.S.A.V., *Tapes philippinarum*, Biologia e Sperimentazione. E.S.A.V., Treviso, pp. 21-46.

- Chan Z. e Hoixebone B.R., 1995. A QSAR for steroidal compound interaction with cytochrome P4501A1. *Environ Toxicol Chem* 14, 597-603
- Chapman P.M. e Wang F., 2001. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ Toxicol Chem* 20, 3-22.
- Christensen L.J., Korsgaard B. e Bjerregaard P., 1999. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. *Aquat Toxicol* 46, 211-219.
- Ciocca D.R., Oesterrech S., Chamness G.C., McGuire W.L. e Fuqua S.A., 1993. Biological and clinical implications of Hsp27. A review. *J Natl Cancer Inst* 85, 1558-1570.
- Cionna C., Maradonna F., Olivotto I., Pizzonia G. e Carnevali O., 2006. Effects of nonylphenol on juveniles and adults grey mullet, *Liza aurata*. *Reprod Toxicol* 22, 449-454.
- Clark S.L., Teh S.J. e Hinton D.E., 2000. Tissue and cellular alterations in Asia clam (*Potamocorbula amurensis*) from San Francisco Bay, toxicological indicators of exposure and effect? *Mar Environ Res* 50, 301-305.
- Colborn T., 1998. Building scientific consensus on endocrine disruptors. *Environ Toxicol Chem* 17, 1-2.
- Colborn T., Vom Saal T. e Soto A.M., 1993. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101, 378-384.
- Courtenay S.C., Grunwald C.M., Kreamer G.L., Fairchild W.L., Arsenault J.T., Ikonomou M. e Wirgin I.I., 1999. A comparison of the dose and time response of CYP1A1 mRNA induction in chemically treated Atlantic tomcod from two populations. *Aquat Toxicol* 47, 43-69.
- Da Ros L. e Nesto N., 2005. Cellular alterations in *Mytilus galloprovincialis* (LMK), *Tapes philippinarum* (Adams, Reeve, 1850) as biomarkers of environmental stress: field studies in the Lagoon of Venice (Italy). *Environ In* 31, 1078-1088.
- De Girolamo M., 1994. Osservazioni sulla pressione di pesca nelle acque della Laguna di Venezia e sulla struttura di popolazione e biologia riproduttiva di tre gobidi (*Pisces, Teleostei*). Tesi di Laurea in Scienze Biologiche, Facoltà di Scienze MM. FF. NN.. Università degli Studi di Padova, A.A. 1993-1994.
- den Besten P.J., Elenbaas J.M.L., Maas J.R., Dieleman S.J., Herwig H.J. e Voogt P.A., 1991. Effects of cadmium and polychlorinated biphenyls (Clophen A50) on steroid metabolism and cytochrome P-450 monooxygenase system in the sea star *Asterias rubens*. L. *Aquat Toxicol* 20, 95-110.

- Depledge M.H., 1994. The rational basis of the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi M.C. e Leonzio C., *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 271-295.
- Depledge M.H. e Billinghamurst Z., 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Mar Pollut Bull* 39, 32-38.
- Depledge M.H. e Fossi M.C., 1994. The role of biomarker in environmental assessment: invertebrates. *Ecotoxicology* 3, 173-179.
- Devauchelle N., 1990. Sviluppo sessuale e maturità di *Tapes philippinarum*. In: E.S.A.V. (Ed.), *Tapes philippinarum*, Biologia e sperimentazione. E.S.A.V., Treviso, pp. 49-58.
- Duran A. e Talas Z.S., 2009. Biochemical changes and sensory assessment on tissues of carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) using sale conditions. *Fish Physiol Biochem* 35, 709-714.
- El-Sharaky A.S., Wahby M.M., Bader El-Dein M.M., Fawzy R.A. e El-Shahawy I.N., 2009. Mutual anti-oxidative effect of gossypol acetic acid and gossypol-iron complex on hepatic lipid peroxidation in male rats. *Food Chem Toxicol* 47, 2735-2741.
- Epifani R., 2009. Indicatori per il monitoraggio ambientale. Tesi di Dottorato di ricerca in Colture Erbacee, Sistemi Agroterritoriali e Genetica Agraria. Università degli Studi di Bologna.
- Fink A.L. e Goto Y., 1998. Molecular chaperones in the life cycle of proteins: structure, function, and mode of action. *New York: Marcel Dekker*.
- Fossi M.C., 2000. Biomarkers. Strumenti di diagnosi e prognosi ambientale. Rosini Editrice s.r.l., Firenze, Italia. pp. 136.
- Fossi M.C., Casini S., Marsili L., Neri G., Mori G., Ancora S., Moscatelli A., Ausili A. e Notarbartolo-di-Sciara G., 2002. Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish. *Mar Environ Res* 54, 667-671.
- Fournie J.W., Summers J.K., Courtney L.A., Engle V.D. e Blazer V.S., 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *J Aquat Anim Health* 13, 195-116.
- Franzini M., Fornaciari I. e Fierabracci V., 2009. Indici di laboratorio di stress ossidativo (Rassegna). *Ligand Assay* 14, 41-50.
- Fränzle O., 2006. Complex bioindication and environmental stress assessment. *Ecol Indic* 6, 114-136.

- Gabai G., Marinelli L., Simontacchi C. e Bono G., 2004. The increase in plasma C₁₉Δ⁵ steroids in subcutaneous abdominal and jugular veins of dairy cattle pregnancy is unrelated to estrogenic activity. *Steroids* 69, 121-127.
- Gandolfi G., Zerunian S., Torricelli P. e Marconato A., 1991. I pesci delle acque interne italiane. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, pp617.
- Giese A.C., 1959. Comparative physiology, annual reproductive cycle of marine invertebrates. *Annu Rev Physiol* 21, 547-576.
- Goksøyr A., 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl* 17,80-95.
- Goksøyr A. e Förlin L., 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicol* 22, 287-312.
- Gooding M.P., Wilson V.S., Folmar L.C., Marcovich D.T. e LeBlanc G.A., 2003. The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *Environ Health Perspect* 111, 426-430.
- Granmo Å., Ekelund R., Magnusson K. e Berggren M., 1989. Lethal and sublethal toxicity of 4-nonylphenol to the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environ Pollut* 59, 115-127.
- Gray E.S., Woodin B.R. e Stegeman J.J., 1991. Sex differences in hepatic monooxygenases in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and scup (*Stenotomus chrysops*) and regulation of P450 forms by estradiol. *J Exp Zool* 259, 330-342.
- Hahn M.E., 2002. Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment. *Sci Total Environ* 28, 49-69.
- Halliwell B. e Gutteridge J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 527.
- Hemmer M.J., Hemmer B.L., Folmar L.C., Marcovich D., Høglund M.D., Bowman C.J., Kroll K.J. e Denslow N.D., 2001. Effects of *p*-nonylphenol, methoxychlor, and endosulfan on vitellogenin induction and expression in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegates*). *Environ Toxicol Chem* 20, 336-343.
- Hiramatsu N., Hara A., Hiramatsu K., Fukada H., Weber G.M., Denslow N.D. e Sullivan C.V., 2002. Vitellogenin-derived yolk proteins of white perch, *Morone Americana*: Purification, Characterization, and vitellogenin-Receptor Binding. *Biol Reprod* 67, 655-667.

- Hiramatsu N., Matsubara T., Fujita T., Sullivan C.V. e Hara A., 2006. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Mar Biol* 149, 35-47.
- Hoffman E.C., Reyes H., Chu F.F., Sander F., Conley L.H., Brooks B.A. e Hankinson O., 1991. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252, 954.
- Holland H.J. e Chew K.K., 1974. Reproductive cycle of the Manila clam *Venerupis japonica* from Hood Canal, Washington. *Proc Natl Shellfish Assoc* 64, 53-58.
- Hugget R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M. e Bergman H.L., 1992. In: AA.VV., Biomarkers: biochemical, physiological and histological Markers of anthropogenic stress. Lewis: Boca Raton, FL, pp. 265.
- Ioannides C. e Parke D.V., 1993. Induction of Cytochrome P4501 as an Indicator of Potential Chemical Carcinogenesis. *Drug Metab Rev* 25, 485-501.
- Ischiropoulos H., Zhu L., Chen J., Tsai M., Martin J.C., Smith C.D. e Beckman J.S., 2002. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298, 431-437.
- Iserentant R. e De Sloover J., 1976. Le concept de bioindicateur. *Mem Soc Roy Bot Belg* 7, 15-24.
- Iwama G.K., Afonso L.O.B., Todgham A., Ackerman P. e Nakano K., 2004. Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? *J Exp Biol* 207, 15-19.
- Janer G., Lavado R., Thibaut R. e Porte C., 2004. Effects of 17 β -estradiol exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res* 58, 443-446.
- Johnson L.L., Casillas E., Collier T., McCain B.B. e Varanasi U., 1998. Contaminant effects on ovarian development in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget sound, Washington. *Can J Fish Aquat Sci* 45, 2133-2146.
- Kochhann D., Pavanato M.A., Llesuy S.F., Correa L.M., Konzen Riffel A.P., Loro V.L., Mesko M.F., Flores E.M., Dressler V.L. e Baldisserotto B., 2009. Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. *Chemosphere* 77, 384-391.
- Kortner T.M., Vang S. e Arukwe A., 2009. Modulation of salmon ovarian steroidogenesis and growth factor responses by the xenoestrogen, 4-nonylphenol. *Chemosphere* 77, 989-998.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680-685.

- LaFleur G.J.Jr., Byrne M.B., Kanungo J., Nelson L.A., Greenberg R. M. e Wallace R.A., 1995. *Fundulus heteroclitus* vitellogenin: The deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline, liquid-phase yolk protein. *J Mol Evol* 41, 505–521.
- Lam P.K.S. e Gray J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar Pollut Bull* 46, 182-186.
- Langston W.J., Burt G.R., Chesman B.S. e Vane C.H., 2005. Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment. *J Mar Biol Assoc UK* 85, 1-31.
- Lavado R., Barbaglio A., Candia Carnevali M.D. e Porte C., 2006a. Steroid levels in crinoid echinoderms are altered by exposure to model endocrine disruptors. *Steroids* 71, 489-497.
- Lavado R., Janer G., Porte C., 2006b. Steroid level and steroid metabolism in the Mussel *Mytilus edulis*: The modulating effect of dispersed crude oil and alkylphenols. *Aquat Toxicol* 78, 65-72.
- Le Curieux-Belfond O., Moslemi S., Mathieu M. e S eralini G.E., 2001. Androgen metabolism in oyster *Crassostera gigas*: evidence for 17 β -HSD activities and characterization of an aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78, 359-366.
- Leonzio C., Fossi M.C., Marsili L. e Casini S., 2003. Indagini ecotossicologiche sugli organismi del benthos. *Biol Mar Mederiterr*, 549-576 suppl.
- Lin L.L. e Janz D.M., 2006. Effects of binary mixtures of xenoestrogens on gonadal development and reproduction in zebrafish. *Aquat Toxicol* 80, 382–395.
- Lindholm C., Petersen K.L. e Pedersen S.N., 2000. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 48, 87-94.
- Lindquist S., 1986. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151-1191.
- Livingstone D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42, 656-666.
- Losso C. e Volpi Ghirardini A., 2010. Overview of ecotoxicological studies performed in the Venice Lagoon (Italy). *Environ Int* 36, 92-121.
- Lowe D.M., 1988. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar Ecol Prog Ser* 46, 91-100.

- Lye C.M., 2000. Impact of oestrogenic substances from oil production at sea. *Toxicol Lett* 112-113, 265-272.
- Lye C.M., Frid C.L.J., Gill M.E., Cooper D.W. e Jones D.M., 1999. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and water from the UK Tyne and Tees estuaries. *Environ Sci Technol* 33, 1009-1014.
- Madigou T., Le Goff P., Salbert G., Cravedi J.P., Segner H., Pakdel F. e Valotaire Y., 2001. Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 53, 173-186.
- Maguire R.J., 1999. Review of the persistence on nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. *Water Qual Res J Canada* 34, 37-78.
- Manning, W.J. e Feder W.A. (1980). Biomonitoring air pollutants with plants. Applied Science Pub. Ltd, London, UK, pp. 142.
- Maradonna F. e Carnevali O., 2007. Vitellogenin, zona radiata protein, cathepsin D and heat shock protein 70 as biomarkers of exposure to xenobiotics. *Biomarkers* 12, 240-255.
- Maradonna F., Polzonetti V., Bandiera S.M., Migliarini B. e Carnevali O., 2004. Modulation of the hepatic CYP1A1 system in the marine fish *Gobius niger*, exposed to xenobiotic compounds. *Environ Sci Technol* 38, 6277-6282.
- Maranghi F. e Mantovani A., 2003. I contaminanti ambientali con effetti endocrini: problemi e prospettive. *Not Ist Super Sanità* 16, 3-9.
- Marconato A., Rasotto M.B. e Mazzoldi C., 1996. On the mechanism of sperm release in three gobbi fishes (*Teleostei: Gobiidae*). *Environ Biol of Fish* 46, 321-327.
- Matozzo V., Ballarin L. e Marin M.G., 2004. Exposure of the clam *Tapes philippinarum* to 4-nonylphenol: changes in anti-oxidant enzyme activities and re-burrowing capability. *Mar Pollut Bull* 48, 563-571.
- Matozzo V., Deppieri M., Moschino V. e Marin M.G., 2003. Evaluation of 4-nonylphenol toxicity in the clam *Tapes philippinarum*. *Environ Res* 91, 179-185.
- Matozzo V., Gagné F., Marin M.G., Ricciardi F. e Blaise C., 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environ Int* 34, 531-545.
- Matozzo V. e Marin M.G., 2005. Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? *Environ Res* 97, 43-49.

- Matozzo V., Tomei A. e Marin M.G., 2005. Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar Pollut Bull* 50, 1686-1693.
- Matsubara T., Ohkubo N., Andoh T., Nagae M., Sawaguchi S., Hiramatsu N., Sullivan C.V. e Hara A., 2003. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts. *Fish Physiol Biochem* 28, 295-299.
- Matthiessen P., 2003. Endocrine disruption in marine fish. *Pure Appl Chem* 75, 2249-2261.
- Mayer M.P., Schröder H., Rüdiger S., Paal K., Laufen T. e Bukau B., 2000. Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of HSP70. *Nature Struct Biol* 7, 586-593.
- Mazzoldi C., 1999. Studio comparativo della dinamica di accoppiamento e fecondazione in Teleostei ad uova demerse. Tesi di Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica. Ciclo XII. Università degli Studi di Padova.
- McCarthy F. e Shugart L.R., 1990. Biomarker of environmental contamination. Lewis Publisher, Chelsea, MI, USA, pp. 457.
- Mellanen P., Soimasuo M., Holmborn B., Oikari A. e Santii R., 1999. Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s./.) exposed to effluents from pulp and paper mills. *Ecotoxicol Environ Safe* 43, 133-137.
- Meneghetti F., Moschino V. e Da Ros L., 2004. Gametogenic cycle and variations in oocyte size of *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture* 240, 473-488.
- Migliarini B., Campisi A.M., Maradonna F., Truzzi C., Annibaldi A., Scarponi G., Carnevali O., 2005. Effects of cadmium exposure on testis apoptosis in the marine teleost *Gobius niger*. *Gen Comp End* 142, 241-247.
- Miller P.J., 1984. The tokology of gobioid fishes. In: Potts G.W. e Wooton J.R. (Eds.) *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*. Academic Press, London/New York, pp. 119-153.
- Mimura J., Ema M., Sogawa K. e Fujii-Kuriyama Y., 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13, 20-25.
- Morcillo Y., Alabalat A. e Porte C., 1999. Mussels as sentinels of organotin pollution: bioaccumulation and effects on P450-mediated aromatase activity. *Environ Toxicol Chem* 18, 1203-1208.

- Morcillo Y., Ronis M.J.J. e Porte C., 1998. Effects of tributyltin on the phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam *Ruditapes decussata*. *Aquat Toxicol* 42, 1-13.
- Morimoto R.I. e Santoro M.G., 1998. Stress inducible responses and Hsp: new pharmacological target for cytoprotection. *Nat Biotechnol* 16, 833-838.
- Mosser D.D. e Bools N.C., 1998. Relationship between heat-shock protein synthesis and termotolerance in rainbow trout fibroblasts. *J Comp Physiol B* 158, 457-467.
- Nagler J.J., Ruby S., Idler D.R. e So Y.P., 1987. Serum phosphoprotein phosphorus and calcium levels as reproductive indicators of vitellogenin in highly vitellogenic mature female and estradiol-injected emature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can J Zool* 65, 2421-2425.
- Nasci C., Da Ros L., Nesto N., Sperti L., Passarini F. e Pavoni B., 2000. Biochemical, histochemical responses to environmental contaminants in clam, *Tapes philippinarum*, transplanted to different polluted areas of Venice Lagoon, Italy. *Mar Environ Res* 50, 425-430.
- National Research Council (NRC), 1987. Biological Markers in Environmental Health Research. *Environ Health Perspect* 74, 3-9.
- Navas J.M. e Segner H., 2000. Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. *Mar Environ Res* 50,157.
- Nebert D.W. e Gonzales F.J., 1987. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56, 945-993.
- Negrato E., Marin M.G., Bertotto D., Matozzo V., Poltronieri C. e Simontacchi C., 2008. Sex steroids in *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve 1850) during gametogenic cycle: preliminary results. *Fres Environ Bull* 17, 1466-1470.
- Nicolas J.M., 1999. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. Review. *Aquat Toxicol* 45, 77-90.
- Oberdörster E. e Cheek A.O., 2001. Gender benders at the beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms. *Environ Toxicol Chem* 20, 23-36.
- Ohba S., 1959. Ecological studies in the natural population of a clam *Tapes japonica* with special reference to seasonal variation in the size and structure of population and to individual growth. *Biol J Okayama Univ* 5, 13-43.
- Ohkubo N., Mochida K., Adachi A., Hara A., Hotta K., Nakamura Y. e Matsubara T., 2003. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for two forms

- of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen Comp Endocrinol* 131, 353-364.
- Padmini E. e Usha Rani M., 2009. Evaluation of oxidative stress biomarkers in hepatocytes of grey mullet inhabiting natural and polypure estuaries. *Sci Total Environ* 407, 4533-4541.
- Padmini E., Vijaya Geetha B. e Usha Rani M., 2009. Pollution induced oxidative stress and heat shock protein 70 overexpression in fish liver mitochondria. *Sci Total Environ* 407, 1307-1317.
- Pampanin D.M., Marangon I., Volpato E., Campesan G. e Nasci C., 2005. Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). *Environ Pollut* 136, 103-107.
- Panter G.H., Thompson R.S. e Sumpter J.P., 1998. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquat Toxicol* 42, 243-253.
- Parsell D.A. e Lindquist S., 1993. The function of Hsps in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet* 27, 437-496.
- Payne J.F., 1977. Mixed function oxidases in marine organisms in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection. *Mar Pollut Bull* 8, 112-116.
- Peakall D., 1992. Animal Biomarkers as pollution indicators. Chapman and Hall, New York, USA. 291 pp.
- Poltronieri C., 2000. Variabilità nella produzione di uova in tre specie di Gobiidae (Pisces: Teleostei) della Laguna di Venezia. Tesi di Laurea in Scienze Biologiche, Facoltà di Scienze MM. FF. NN.. Università degli Studi di Padova, A.A. 1999-2000.
- Poltronieri C., Maccatrozzo L., Simontacchi C., Bertotto D., Funkenstein B., Patrino M. e Radaelli G., 2007. Quantitative RT-PCR analysis and immunohistochemical localization of HSP70 in sea bass *Dicentrarchus labrax* exposed to transport stress. *Eur J Histochem* 51, 125-135.
- Poltronieri C., Negrato E., Bertotto D., Simontacchi C. e Radaelli G., 2008. Immunohistochemical localization of constitutive and inducible Heat Shock Protein 70 in carp (*Cyprinus carpio*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to transport stress. *Eur J Histochem* 52, 191-198.
- Porte C., Janer G., Lorusso L.C., Ortiz-Zarragoitia M., Cajaraville M.P., Fossi M.C. e Canesi L., 2006. Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comp Biochem Physiol C* 143, 303-315.

- Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R. e Sumpter J.P., 1994. Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8, 275-285.
- Ravera O., 2000. The lagoon of Venice: the result of both natural and human influence. *J Limnol* 59, 19-30.
- Rikans L.E. e Hornbrook K.R., 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1362, 116-127.
- Rodriguez-Moscoso E., Pazo J.P., Garcia A. e Fernandez Cortes F., 1992. Reproductive cycle of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams, Reeve, 1850) in Ria of Vigo (NW Spain). *Sci Mar* 56, 61-67.
- Ronis M.J.J. e Mason A.Z., 1996. The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: Effects of trybutyl tin. *Mar Environ Res* 42, 161-166.
- Santos M.M., ten Hallers-Tjabbes C.C., Vieira N., Boon J.P. e Porte C., 2002. Cytochrome P450 differences in normal and imposex-affected female whelk *Buccinum undatum* from the open North Sea. *Mar Environ Res* 54, 661-665.
- Scaggiante M., 1995. Dinamica di accoppiamento e di fecondazione in due gobiidi mediterranei. Tesi di Laurea in Scienze Biologiche, Facoltà di Scienze MM. FF. NN.. Università degli Studi di Padova, A.A. 1994-1995.
- Scaggiante M., Mazzoldi C., Petersen C.W. e Rasotto M.B., 1999. Sperm competition and mode of fertilization in the grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei: Gobiidae). *J Exp Zool* 283, 81-90.
- Schlenk D., 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessment. *Mar Pollut Bull* 39, 48-53.
- Shugart L. R., 1995. Biomarkers of DNA damage. In: de Serres F.D. & Bloom A.D, Ecotoxicity and Human Health: a biological approach to environmental remediation. pp. 123-141.
- Soto A.M., Sonnenschein C. e Chung K.L., 1995. The E-Screen as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103, 113-122.
- Sumpter J.P. e Jobling S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103, 173-178.
- Tagliapietra D. e Volpi Ghirardini A., 2006. Notes on coastal lagoon typology in the light of the EU Water Framework Directive: Italy as a case study. *Aquat conserve: Mar Freshw Ecosyst* 16, 457-467.

- Takemura A. e Kim B.H., 2001. Effects of estradiol-17 β treatment on in vitro and in vivo synthesis of two distinct vitellogenins in tilapia. *Comp Biochem Physiol A – Mol Integr Physiol* 129, 641-651.
- Tanaka N., Tajima S., Ishibashi A., Uchida K. e Shigematsu T., 2001. Immunohistochemical detection of lipid peroxidation products, protein-bound acrolein and 4-hydroxynonenal protein adducts, in actin elastosis of photodamaged skin. *Arch Dermatol Res* 293, 363-367.
- Thornton J.W., Need E. e Crews D., 2003. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signalling. *Science* 301, 1714-1717.
- Tian Y., Rabson A.B. e Gallo M.A., 2002. Ah receptor and NF- κ B interactions: mechanisms and physiological implications. *Chem Biol Interac* 141, 97-115.
- Tillmann M., Schulte-Oehlmann U., Duft M., Markert B. e Oehlmann J., 2001. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III. Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10, 373-388.
- Timbrell J.A., 1998. Biomarkers in toxicology. *Toxicology* 129, 1-12.
- Towbin H., Staehelin T. e Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76, 4350-4354.
- Uchida K., 2003. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 42, 318-343.
- Uchida K. e Stadtman E.R., 1992. Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89, 4544-4548.
- Urrutia M.B., Ibarrola I., Iglesias J.I.P. e Navarro E., 1999. Energetics of growth and reproduction in a high-tidal population of the clam *Ruditapes decussatus* from Urdaibai Estuary (Basque Country, N. Spain). *J Sea Res* 42, 35-48.
- Vainio H., 1998. Use of biomarkers – new frontiers in occupational toxicology and epidemiology. *Toxicol Lett* 102-103, 581-589.
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M. e Scoullou M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Safety* 64, 178-169.
- Valli G., Mazzolini D. e Raimondi V., 1996. Ciclo riproduttivo e biometria in *Tapes philippinarum* (Adam and Reeve, 1850) dell'Alto Adriatico durante un ciclo annuale. *Ann Hydrores* 12, 41-53.
- Van der Oost R., Goksøyr A., Celander M., Heida H. e Vermeulen P.E., 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II.

- Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquat Toxicol* 36, 189-222.
- Verslycke T., Poelmans S., De Wasch K., Vercauteren J., Devos C., Moens L., Sandra P., De Brabander H.F. e Janssen C.R., 2003. Testosterone metabolism in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea; Mysidacea) following tributyltin exposure. *Environ Toxicol Chem* 22, 2030-2036.
- Vos J.G., Dybing E., Greim H.A., Ladefoged O., Lambre C., Tarazona J.V., Brandt I. e Vethaak A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 30, 71-133.
- Weber L.P., 2004. Acute ex vivo effects of dimethylbenz[a]anthracene and heat shock on rat tail artery. *Cardiovasc Toxicol* 4, 355-362.
- Welch W.J., 1993. How cells respond to stress. *Sci Am* 269, 56-64.
- Wolke R.E., George C.J. e Blazer V.S., 1995. Pigmented macrophage accumulations (MMC; PMB): possible monitors of fish health. In: Hargis WJ Parasitology and pathology of the world oceans. NOAA technical report, NMFS, Washington, DC, 25, 27-33.
- Wu R.S.S., Siu W.H.L. e Shin P.K.S., 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring, *Mar Pollut Bull* 51, 623-634.
- Yamamoto K. e Iawata F., 1956. Studies on the bivalve *Venerupis japonica*, in Akklesh Lake: II. Growth rate and biological minimum size. *Bull Hokkaido Reg Fish Res Lab* 14, 57-63.
- Yamashita M., Hirayoshi K. e Nakata K., 2004. Characterization of multiple members of the hsp70 family in platyfish culture cells: molecular evolution of stress protein hsp70 in vertebrates. *Gene* 336, 207-218.
- Yoshida Y., Itoh N., Hayakawa M., Piga R., Cynshi O., Jishage K. e Niki E., 2005. Lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride and its inhibition by antioxidant as evaluated by an oxidative stress marker, HODE. *Toxicol Appl Pharmacol* 208, 87-97.
- Zhou Q., Zhang J., Fu J., Shi J. e Jiang G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta* 606, 135-150.