

Università degli Studi della Calabria

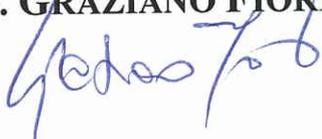
DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE
SETTORE DISCIPLINARE BIO/05
CICLO XX

Le patelle delle coste campane: aspetti sistematici, cromosomici e valutazione dello *stress* genomico.

Dott.ssa Agnese Petraccioli

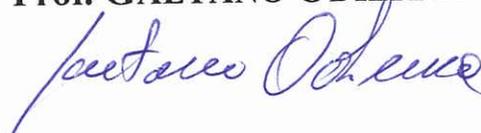
Tutor

Dr. GRAZIANO FIORITO



Co-Tutor

Prof. GAETANO ODIERNA



Coordinatore del Dottorato

Ch.mo Prof BRUNO TOTA



ANNO ACCADEMICO 2006-2007

Indice

Abstract	pag. 1
1. Introduzione	pag. 3
1.1. L'inquinamento delle acque ed il biomonitoraggio	pag. 3
1.2. I molluschi come <i>biomarkers</i>	pag. 4
1.3. <i>Patella</i> come bioindicatore	pag. 5
2. Scopo della ricerca	pag. 7
3. La determinazione specifica, indagine tassonomica	pag. 9
3.1. La determinazione specifica dei campioni	pag. 9
3.2. Analisi cariologiche	pag. 10
3.2.1. Risultati	pag. 11
3.2.1.a. <i>Patella caerulea</i>	pag. 11
3.2.1.b. <i>Patella rustica</i>	pag. 15
3.3. Indagine molecolare	pag. 18
3.3.1. Risultati	pag. 19
3.4. Discussione	pag. 23
4. Materiali e metodi	pag. 27
4.1. Siti di campionamento	pag. 27
4.2. Indagini cromosomiche	pag. 35
4.2.1. Allestimento dei cromosomi e colorazioni	pag. 35
4.3. Analisi Molecolare	pag. 38
4.4. Istologia	pag. 39

4.4.1. Prelievo delle branchie	pag. 40
4.4.2. Protocollo di inclusione in paraffina	pag. 40
4.4.3. Colorazione delle sezioni	pag. 41
4.4.4. Tecnica citochimica TUNEL	pag. 41
4.4.5. Criteri per la valutazione delle alterazioni istopatologiche a carico delle branchie.	pag. 43
5. Risultati	pag. 45
5.1. Alterazioni cito- ed istopatologiche e stress genomico nelle branchie di <i>Patella caerulea</i>	pag. 45
5.1.1. Struttura istologica delle branchie in esemplari di riferimento	pag. 45
5.1.2. Analisi cito- isto- patologica delle branchie	pag. 46
5.1.3. Risultati del Test TUNEL	pag. 54
5.2. Analisi delle frequenza delle aberrazioni cromosomiche in gonadi di <i>Patella caerulea</i>	pag. 56
6. Discussione	pag. 60
6.1. Indagini sulle alterazioni cromosomiche	pag. 60
6.2. Indagini sulle alterazioni a carico delle branchie	pag. 66
7. Conclusioni	pag. 73
Appendice I. Sistematica, distribuzione, caratteri morfologici, aspetti biologici ed ecologici di <i>Patella</i>	pag. 81
I.1. Sistematica	pag. 81
I.2. Cenni di anatomia	pag. 81
I.3. Distribuzione	pag. 83
I.4. Biologia ed ecologia	pag. 84

I.5. Le specie italiane	pag. 85
Appendice II. Frequenza per individuo di aberrazioni cromosomiche per sito.	pag. 89
Bibliografia	pag. 95

Abstract

By applying advanced techniques that are available now days, it is relatively feasible to determine and monitor the degree of pollution of marine systems. However, it is still difficult to evaluate the effects that pollution may have on marine organisms and, in general, on the environment.

A way to overcome this limit is by biomonitoring, *i.e.* by monitoring the biological responses of selected organisms (namely biomarkers) to pollutants. Many species of molluscs have been labelled as efficient biomarkers. In my research project the aim was to verify the appropriateness of limpets (*Patella caerulea*) as biomarkers by analyzing specimens of *Patella* collected in sites with different degrees of pollution along the coasts of the Campania region (Italy). To reach my goal, I measured the potential damage of pollutants at two levels: somatic (by monitoring gill histopathologies) and germinal (by monitoring gonad chromosomic aberrations).

My results suggest that pollutants caused a significant damage in natural populations of *P. caerulea*.

The gills of specimens collected from polluted sites presented structural changes, cell and tissue degeneration (cells with vacuoles, dissociation of haemocyte septa, nuclear alterations), or the development of compensative mechanisms related to environmental toxicity (epithelium swelling, hyperplasia and fusion of septa). Furthermore, although preliminary, the results suggest that the level of gill injury appeared to be related to the degree of pollution of the study site. Finally, gill aberrations were always higher in each study site compared to the reference site.

The gonads of individuals of polluted sites also showed comparatively higher rates of chromosome aberrations, which are supposed to be a by product of an exposition to heavy metal and organic pollutants.

In conclusion, the results obtained in my research project suggest that pollutants may act on the cells both of the somatic and germinal lineage in *Patella* and are thus potentially dangerous for the whole natural population of limpets of the Campania region.

1. Introduzione

1.1. L'inquinamento delle acque ed il biomonitoraggio

Il nostro mare è esposto a disturbi molto seri ed a cambiamenti significativi causati dall'azione umana. L'inquinamento marino costituisce, infatti, un grave pericolo sia per l'ecosistema marino stesso che per la salute umana. Di fatto, anche se le concentrazioni di alcuni tipi di inquinanti con il passare del tempo diminuiscono, persistono gli effetti che essi producono sull'ambiente e sui bioti.

Sono disponibili numerose tecniche per la determinazione dei livelli di inquinamento di acque e sedimenti ma non altrettanto valide per valutarne gli effetti a lungo termine sull'ecosistema.

Le concentrazioni degli agenti inquinanti, infatti, sono molto variabili nello spazio e nel tempo (Shugart & Theodorakis, 1996) ed i sistemi automatici, anche i più accurati, ne rilevano un numero limitato. Inoltre, nonostante la precisione delle misure, tali sistemi non sono in grado di fornire informazioni sulla biodisponibilità degli inquinanti, sui loro possibili effetti biologici (anche di tipo additivo e/o sinergico), né misurano inquinanti non convenzionali come i metalli potenzialmente tossici (PTM).

Tali problemi possono essere superati tramite il biomonitoraggio, ovvero il monitoraggio ambientale effettuato utilizzando lo studio delle risposte biologiche messe in atto da selezionati organismi alle variazioni delle condizioni del loro ambiente. Il biomonitoraggio rappresenta un utile strumento che complementa i sistemi di monitoraggio fisico-chimico nel controllo e nella tutela del territorio.

L'uso dei *biomarkers*, infatti, non sostituisce il monitoraggio chimico o gli studi sulle strutture di popolazione ma li integra, contribuendo alla determinazione della tossicità degli inquinanti, anche quando essi siano presenti a concentrazioni al di sotto di quelle letali.

Il biomonitoraggio può essere applicato a vari livelli: dallo studio delle comunità a quello molecolare e cellulare.

Qualunque sia il livello di interesse è importante che i *biomarkers* (bioaccumulatori/bioindicatori) posseggano alcuni requisiti (Tabella 1.1).

Tabella 1.1. Requisiti richiesti affinché una specie animale possa essere considerata un bioaccumulatore e/o un bioindicatore.

	Bioaccumulatori	Bioindicatori
Tolleranza agli inquinanti considerati	Elevata	Accertata sensibilità
Capacità di accumulo	Illimitata	Sufficiente di metalli pesanti
Distribuzione nell'area di studio	Ampia	Ampia
Mobilità	Ridotta	Ridotta
Ciclo vitale	Lungo	Lungo
Reperibilità/ Campionamento	-	Facile

Al fine di salvaguardare l'ambiente marino, l'attenzione di numerosi studiosi è stata rivolta alla ricerca di organismi che meglio rispondono alle caratteristiche di bioindicatori e che possano dare risposte soddisfacenti nel minor tempo possibile (con il minor dispendio di energie e risorse), garantendo comunque il minimo impatto sulle popolazioni stesse.

1.2. I molluschi come *biomarkers*

Fra gli organismi animali i molluschi (fra questi molti bivalvi e gasteropodi eduli) già da alcuni decenni vengono utilizzati con successo come specie indici, in studi sia di campo che in condizioni sperimentali, per valutare gli effetti dovuti al bioaccumulo di metalli pesanti (Abdel-Moati & Atta, 1991; Herut *et al.*, 1999; Feldestein *et al.*, 2003; Baršienė *et al.*, 2006; Nakhlé *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007) e di inquinanti organici ed idrocarburi (Raffin *et al.*, 1991; Lauenstein, 1995; Peña-Méndez & García-Montelongo, 1998; Glegg *et al.*, 1999; Timpanaro *et al.*, 2006).

In tali studi i danni biologici sono stati dedotti in base ai meccanismi di azione di tali inquinanti, valutandone le deviazioni dalle concentrazioni limite o determinando la variazione della densità delle popolazioni in seguito ad aumento della concentrazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA).

Nell'ultimo ventennio, alle determinazioni chimico-fisiche sono state anche affiancati studi mirati a rilevare le alterazioni morfologiche in organi bersaglio (ad esempio le branchie) e/o quelli a carico del genoma (aberrazioni cromosomiche, analisi dei micronuclei, COMET test, ecc.). Tali metodiche, sviluppate nei mammiferi, sono state applicate con successo dapprima a pesci e crostacei (Nowak, 1992; Bhavan & Geraldine, 2000; Machado & Fanta, 2003; Koca *et al.*, 2005), e negli ultimi anni anche ai molluschi, comprese le patelle (Bolognesi *et al.*, 1996, 2004; Bresler *et al.*, 1999, 2003a; Dailianis *et al.*, 2003; Dalla Venezia *et al.*, 1994).

1.3. *Patella* come bioindicatore

Tra i molluschi, le patelle sembrano rispondere in maniera soddisfacente ai requisiti di un buon bioindicatore.

Esse, infatti, sono:

- 1) presenti lungo tutte le nostre coste;
- 2) localmente molto abbondanti;
- 3) di facile reperibilità e prelievo per tutto il periodo dell'anno;
- 4) caratterizzate da una mobilità ristretta a pochi centimetri sul substrato sul quale vivono adese;
- 5) distribuite lungo le coste rocciose nel livello superficiale dell'acqua, tra la bassa e l'alta marea e quindi direttamente esposte anche ad inquinanti provenienti dalla terra ferma.

Molteplici ricerche effettuate negli ultimi anni hanno dimostrato che le specie appartenenti al genere *Patella* possiedono la capacità di accumulare metalli pesanti ed inquinanti organici (in *Patella* sp.: Herut *et al.*, 1999; Nakhlé *et al.*, 2006; *P. vulgata*: Abdel-Moati & Atta, 1991; Glegg *et al.*, 1999; in *P. ulysiponensis*: Peña-Méndez & García-Montelongo, 1998; in *P. caerulea*:

Feldestein *et al.*, 2003; Bresler *et al.*, 2003b; Storelli & Marcotrigiano, 2005; Timpanaro *et al.*, 2006).

2. Scopo della ricerca

Scopo della ricerca è stato quello di contribuire alla caratterizzazione dei danni causati in popolazioni naturali di *Patella caerulea* da inquinanti; per questo studio l'area in esame è stata la costa campana, di cui è noto il differente grado di inquinamento.

In particolare è stata valutata la presenza di lesioni istopatologiche a carico dell'epitelio branchiale in diversi esemplari. In aggiunta è stato valutato l'eventuale stress genomico in cellule della linea somatica (branchie) e della linea germinale (gonadi), al fine di verificare che gli agenti inquinanti, presenti nei siti esaminati, agissero anche a livello delle cellule germinali.

L'importanza di tale comparazione è ovvia in quanto i danni genomici ristretti alla linea somatica restano confinati all'individuo, mentre quelli riguardanti la linea germinale possono essere trasmessi alla progenie e quindi riguardare l'intera popolazione.

Lo studio è stato concentrato in particolare su *Patella caerulea* in quanto essa è la più comune ed abbondante delle specie di *Patella* italiane.

Le branchie sono state scelte per tale studio sia perché esse sono direttamente esposte ad agenti xenobiotici inquinanti (essendo a diretto contatto con l'acqua) sia perché sono già state utilizzate nei molluschi per indagare gli effetti prodotti dagli inquinanti.

La sensibilità delle cellule branchiali ai metalli pesanti è stata, infatti, testata in *Patella caerulea* da Bresler e coautori (2003b). In questo lavoro gli autori, tramite un microfluorimetro equipaggiato con obiettivi a contatto, hanno valutato l'effetto del Cd e del DDT sul metabolismo dei mitocondri delle cellule branchiali, osservando un decremento nel rapporto tra la fluorescenza blu intrinseca del NADH ridotto e la fluorescenza verde della flavoproteina ossidata dopo l'aggiunta di Cd e DDT. Essi hanno osservato un decremento di oltre 2/3 nel metabolismo dei mitocondri delle cellule branchiali.

Bresler e coautori (2003a) hanno anche condotto una serie di studi di campo su esemplari di patella provenienti dal sito inquinato di Shemen e da siti di controllo (Rosh Haniqra e Caesarea, sempre lungo le coste israeliane). Di questi

individui sono stati valutati diversi parametri, tra i quali la frequenza delle alterazioni a carico di alcuni organi bersaglio, come branchie ed epatopaneas. In particolare, gli autori hanno riscontrato nelle branchie di tutti gli esemplari lesioni cito- ed istopatologiche, classificate in gradi (dal I al III lungo un gradiente; Tabella 2.1), dimostrando che il danno maggiore era riscontrabile negli animali prelevati dal sito inquinato e praticamente assenti nei siti di riferimento.

Tabella 2.1. Danni citologici ed istologici nelle branchie di *Patella caerulea* espressi in numero di individui e percentuale (in parentesi) prelevati da siti inquinati (Shemen) e di riferimento (Rosh Haniqra e Cesarea) della costa mediterranea israeliana. I danni sono classificati in: I (debole swelling, pochi vacuoli); II (debole swelling, molti vacuoli); III (debole swelling, molti vacuoli, alterazioni nucleari). Da Bresler *et al.* (2003a).

Siti di prelievo	N. individui	Numero di individui per Cito- istopatologie		
		I	II	III
Shemen	120	33 (28%)	38 (32%)	13 (11%)
Rosh Aniqra	20	3 (15%)	0	0
Caesarea	60	7 (12%)	0	0

Per gli scopi di questo progetto di dottorato ci si è riferiti, per l'analisi delle branchie al lavoro di Nuwayhid e coautori (1978) che hanno descritto la struttura delle branchie per *P. vulgata* (cfr. sezione I.2 in appendice I). In aggiunta è stato necessario un approfondimento sulla struttura delle branchie di *P. caerulea* – oggetto di questo studio – utilizzando individui raccolti in un sito di riferimento (Acciaroli).

Per quanto riguarda le informazioni carilogiche, in *Patella* le uniche informazioni disponibili riguardavano il numero e la forma dei cromosomi delle specie presenti in Italia (Cervella *et al.*, 1988; Espinosa *et al.*, 2007).

3. La determinazione specifica, indagine tassonomica

3.1. La determinazione specifica dei campioni

Le tre specie di *Patella* più diffuse lungo le nostre coste, *P. caerulea*, *P. ulyssiponensis* e *P. rustica* (cfr. appendice I) esibiscono morfe simili e in parte sovrapposte (Ghisotti & Melone, 1970). Le chiavi dicotomiche disponibili per *Patella*, basate su caratteri morfologici, non conducono, quindi, alla corretta identificazione specifica. Ghisotti & Melone (1970) riportano per *P. caerulea*: “è specie talmente polimorfa, da aver ricevuto in passato almeno una cinquantina di denominazioni diverse fra sinonimi, sottospecie, varietà, forme, mutazioni, colorazioni, ecc.”. *Patella caerulea*, inoltre, presenta morfe molto simili a quelle di altre specie ed in particolare di *P. ulyssiponensis*, con la quale è spesso confusa. La determinazione delle specie effettuata sulla base dei caratteri morfologici delle conchiglie, così come quella effettuata sulla base delle differenze delle parti anatomiche degli animali (Cretella *et al.*, 1991), non risulta, pertanto, sufficiente (Mauro *et al.*, 2001, 2003).

Durante il presente studio si è reso, quindi, necessario condurre un’analisi tassonomica, effettuata attraverso studi cariologici e molecolari. Le analisi tassonomiche sono state eseguite sia su campioni per i quali l’analisi dei caratteri dava adito a dubbi sia su un campione casuale di esemplari delle quattro specie provenienti da differenti siti, al fine di accertare l’affidabilità della determinazione su base morfologica.

Negli invertebrati la presenza di specie criptiche o con morfologie sovrapponibili, è un fenomeno diffuso. In questi casi l’insufficiente differenziazione morfologica può dar luogo ad identificazioni e delimitazioni specifiche dubbie o errate (Pfenninger *et al.*, 2006). In tali casi vengono eseguite analisi alternative, quali analisi cariologiche e molecolari (analisi della sequenza

di specifici geni del DNA mitocondriale) (Mauro *et al.*, 2003; Pfenninger *et al.*, 2006).

3.2. Analisi carilogiche.

L'uso del cariotipo ai fini citotassonomici è da lungo tempo in uso ed è basato sul fatto che il cariotipo, ovvero il numero e la morfologia dei cromosomi sono specie specifici (White, 1973). Ulteriore potenziamento si è avuto con l'introduzione dei più potenti e perfezionati metodi di colorazione di bandeggio cromosomico, che hanno consentito di discriminare tra specie con cariotipo uguale per numero e morfologia di cromosomi. Secondo Morescalchi (1983) è impossibile che due specie, anche strettamente imparentate, esibiscano *pattern* di C-bandeggi identici, in altre parole il *pattern* di bandeggio cromosomico è caratteristico di ogni specie. La citogenetica, ad esempio, è risultata essenziale, quando si è dovuto risolvere preliminarmente il problema di identificazione specifica delle diverse forme di rane verdi (Ragghianti *et al.*, 1995, 2004; Razzetti *et al.*, 2001), prima di eseguire lo studio della dinamica di popolazione nelle diverse condizioni ambientali.

In *Patella* le uniche informazioni carilogiche disponibili riguardano numero e forma dei cromosomi di *P. caerulea*, *P. rustica*, *P. ulyssiponensis* e *P. ferruginea*.

Cervella e coautori (1988) hanno descritto il cariotipo di *P. caerulea*, *P. rustica* e *P. ulyssiponensis*. Le prime due specie possiedono entrambe $2n = 18$ cromosomi, metacentrici nelle prime sette coppie e telocentrici nelle ultime due coppie. *Patella ulyssiponensis* possiede, invece, un cariotipo di $2n = 16$ cromosomi, tutti metacentrici.

Recentemente Espinosa e coautori (2007) hanno descritto il cariotipo di *P. ferruginea*, che presenta $2n = 18$ cromosomi, con cinque coppie di elementi metacentrici, una coppia di meta-submetacentrici, una di submetacentrici, una coppia di subtelocentrici ed una di telocentrici.

3.2.1. Risultati.

Per quanto concerne la mia ricerca, risultati soddisfacenti per le analisi cromosomiche sono stati ottenuti in esemplari di *P. caerulea* e *P. rustica*.

Un adeguato numero di piastre metafisiche, con nessuno o pochi cromosomi sovrapposti, sono state ottenute, in tutte le popolazioni esaminate, soprattutto nelle gonadi femminili di entrambe le specie durante la stagione riproduttiva (metà dicembre-fine aprile).

3.2.1.a. *Patella caerulea*.

Cariotipo:

In tutti gli esemplari, inclusi quelli delle morfe subplana, la formula cromosomica è risultata essere costituita da $2n = 18$ cromosomi, tutti metacentrici eccetto quelli delle ultime coppie che erano telocentrici (Fig. 3.1 A e B). I metacentrici delle prime due coppie differivano leggermente in lunghezza, ma erano nettamente più grandi dei metacentrici delle successive cinque coppie, a loro volta leggermente degradanti in lunghezza (Tabella 3.1).

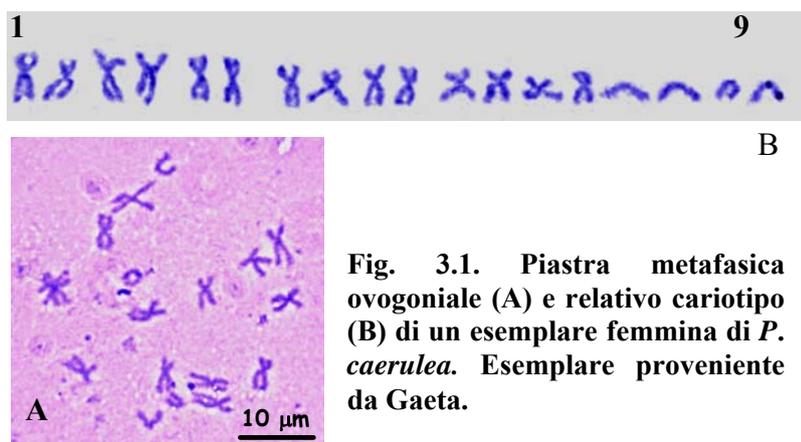


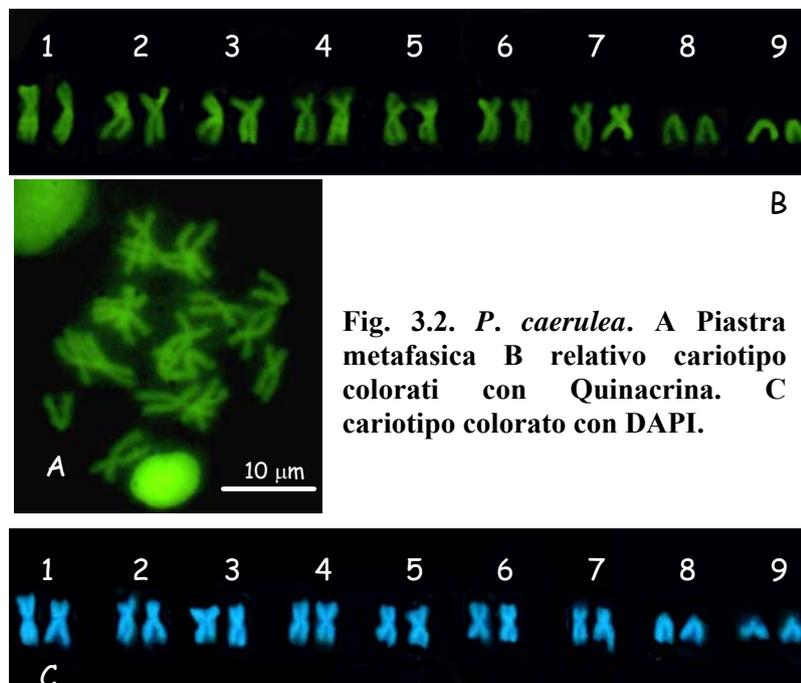
Fig. 3.1. Piastra metafasica ovogoniale (A) e relativo cariotipo (B) di un esemplare femmina di *P. caerulea*. Esemplare proveniente da Gaeta.

Tabella 3.1. Parametri morfometrici Lunghezza relativa (RL), indice centromerico (CI) e classificazione dei cromosomi di *P. caerulea*.

Cromosoma	RL	CI	Tipo di cromosoma
1	16,3 ± 0,8	42,3 ± 3,4	m
2	15,7 ± 0,6	47,4 ± 4,1	m
3	13,5 ± 0,6	47,0 ± 3,9	m
4	11,9 ± 0,8	40,2 ± 3,0	m
5	11,0 ± 0,5	41,9 ± 4,1	m
6	9,8 ± 0,4	43,6 ± 4,4	m
7	9,4 ± 0,5	45,5 ± 3,9	m
8	6,6 ± 0,6	0	t
9	5,8 ± 0,7	0	t

Eterocromatina:

In seguito alle colorazioni con la quinacrina e con il DAPI i cromosomi risultavano uniformemente colorati (Figura 3.2 A, B e C).



In tale specie con le normali condizioni di bandeggio i cromosomi risultavano completamente svuotati. Solo operando a condizioni meno drastiche, ovvero conducendo l'idrolisi a temperatura ambiente e la riassociazione in 2xSSC a 50°C, risultò possibile osservare sui cromosomi le bande C eterocromatiche. L'eterocromatina è risultata presente nelle regioni centromeriche di tutti i cromosomi; bande telomeriche eterocromatiche furono anche osservate su quasi tutti i cromosomi (Fig. 3.3).

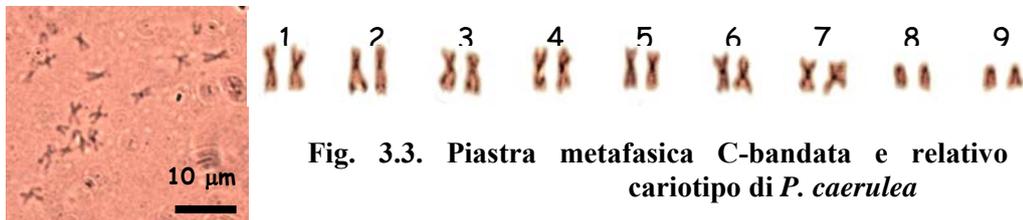


Fig. 3.3. Piastra metafasica C-bandata e relativo cariotipo di *P. caerulea*

In seguito alle colorazioni sequenziali di bandeggio C più i fluorocromi CMA₃ e DAPI (Fig. 3.4) le regioni centromeriche di tutti i cromosomi risultavano colorate con il DAPI, quindi ricche in AT, mentre solo le regioni centromeriche della prima, terza, ottava e nona coppia risultavano positive anche con la CMA₃, quindi contenere sequenze ricche anche in GC (Figura 3.4).

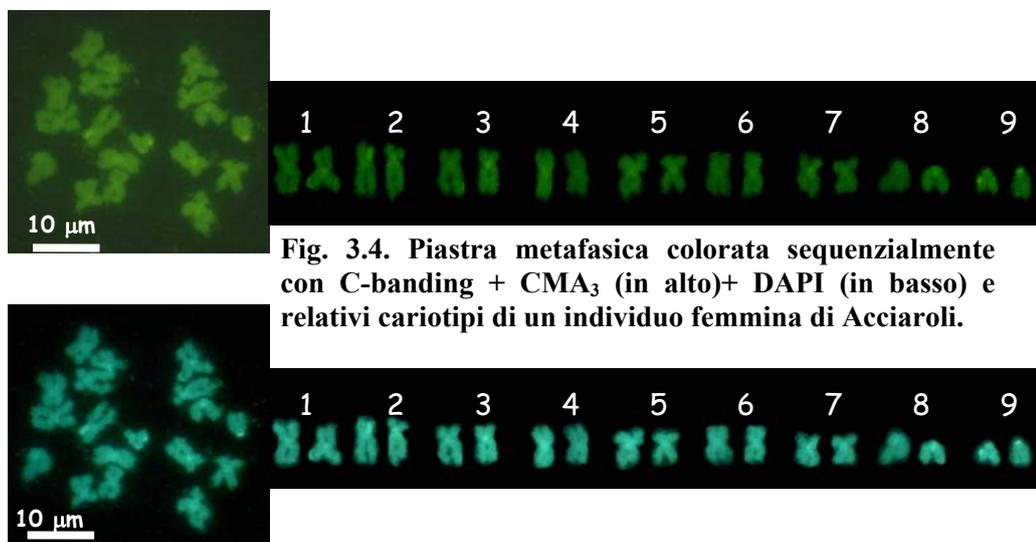


Fig. 3.4. Piastra metafasica colorata sequenzialmente con C-banding + CMA₃ (in alto)+ DAPI (in basso) e relativi cariotipi di un individuo femmina di Acciaroli.

Loci NORs:

Le colorazioni con l'Ag-NOR banding evidenziavano i loci NORs (organizzatori nucleolari) localizzati sul braccio corto della prima coppia di cromosomi molto vicino ai centromeri (Figura 3.5, A).

Tali loci Ag-NOR positivi furono evidenziati anche dalle colorazioni con il CMA₃-banding e con le NOR-FISH (Fig 3.5 B e B' e Fig. 4.1).

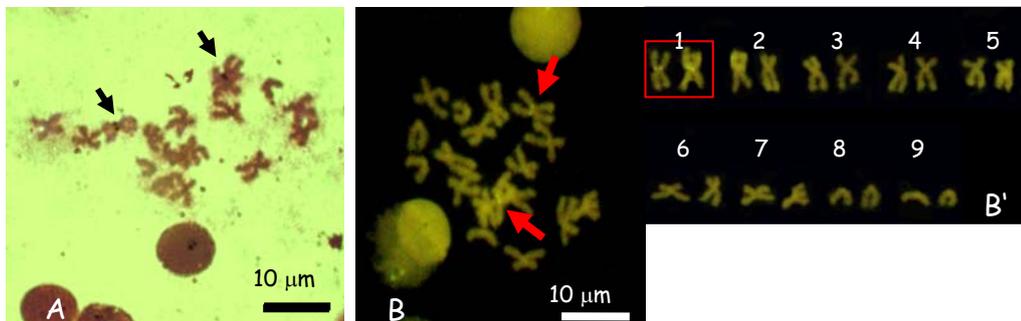


Fig. 3.5. Piastre metafasiche di *P. caerulea* (A) e (B) e relativo cariotipo (B') colorate con Ag- NOR banding (A) e CMA₃ (B). Esempolari provenienti da Acciaroli.

Con le colorazioni con il fluorocromo CMA₃ risultavano differenzialmente colorate le regioni pericentromeriche del braccio corto della prima coppia di cromosomi (Fig 3.5 B e B'). Queste stesse regioni risultavano evidenziate in seguito alle ibridazioni NOR-FISH. Risultati soddisfacenti sono stati ottenuti grazie a modifiche apportate al protocollo e descritte nella sezione Materiali e Metodi (Figura 3.6 A e B).

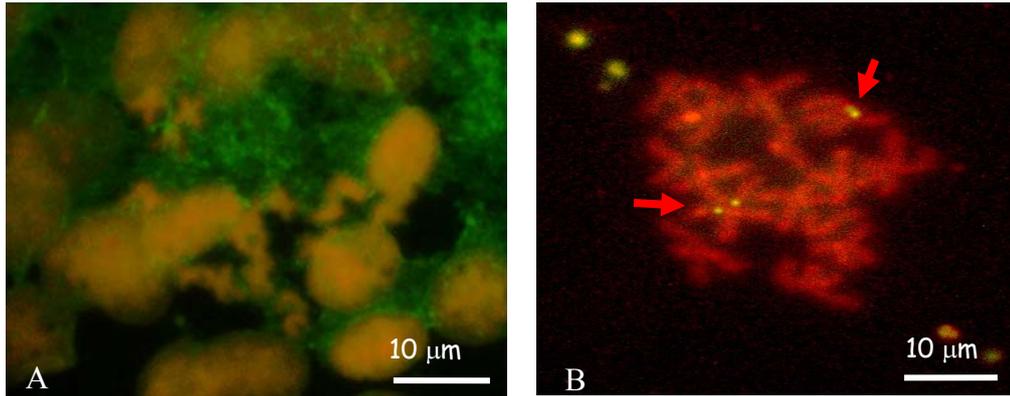


Fig. 3.6. NOR-FISH su piastre metafasiche di *P. caerulea* senza pretrattamento (A) e con pretrattamento di tipo C (B). Esempolari provenienti da Gaeta. Le frecce indicano i loci NORs.

3.2.1.b. *Patella rustica*.

Cariotipo:

La formula cromosomica in questa specie è risultata anch'essa costituita da $2n = 18$ cromosomi, erano metacentrici quelli delle coppie 1-7, e telocentrici quelli della ottava e nona coppia (Figura 3.7 e Tabella 3.2).

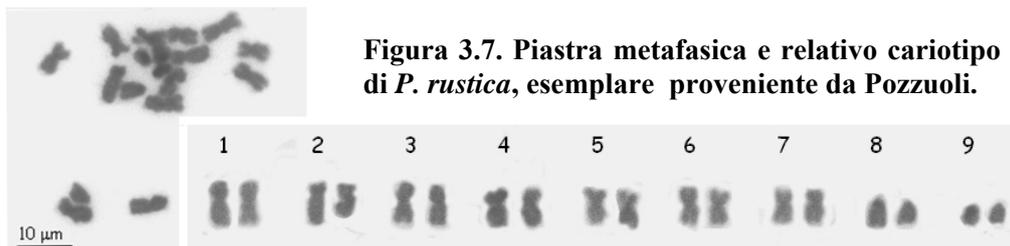


Figura 3.7. Piastra metafasica e relativo cariotipo di *P. rustica*, esemplare proveniente da Pozzuoli.

Tabella 3.2. Parametri morfometrici (Lunghezza relativa, RL, e indice centromerico, CI, e classificazione dei cromosomi di *P. rustica*.

Cromosoma	RL	CI	Tipo di cromosoma
1	16,0 ± 0,8	45,3 ± 3,4	m
2	15,5 ± 0,6	38,4 ± 4,1	m
3	13,2 ± 0,6	45,1 ± 3,9	m
4	12,3 ± 0,8	42,4 ± 3,0	m
5	11,2 ± 0,5	44,7 ± 4,1	m
6	9,5 ± 0,4	40,8 ± 4,4	m
7	9,2 ± 0,5	43,1 ± 3,9	m
8	6,8 ± 0,6	0	t
9	6,0 ± 0,7	0	t

Eterocromatina:

Le colorazioni con DA/DAPI coloravano uniformemente i cromosomi (Figura 3.8A), mentre le colorazioni del C- banding evidenziavano esili bande centromeriche sui centromeri di tutte le coppie di cromosomi (Figura 3.8 B). Tali bande in seguito a trattamento con il C-banding e colorazione sequenziali con CMA₃ e DAPI, risultavano negative ad entrambi i fluorocromi (Figura 3.7 C).

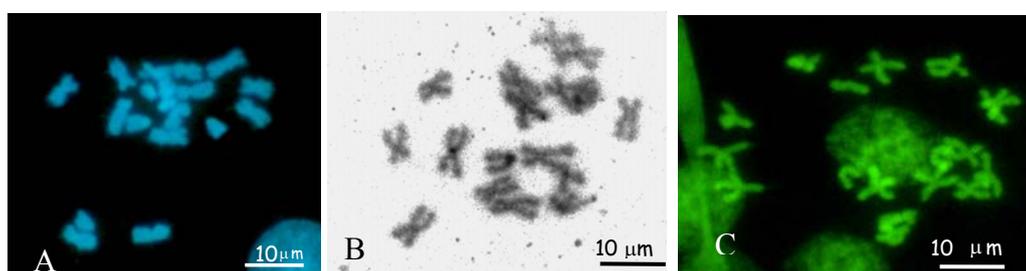


Figura 3.8. Piastra metafasica e relativo cariotipo di *P. rustica* colorata con DA/DAPI (A) con C-banding (B) C-banding/CMA₃ (C). Esempi provenienti da Pozzuoli.

Loci NORs:

Sia le colorazioni dell'Ag-NOR sia quelle con il fluorocromo CMA₃ (Figura 3.9) coloravano differenzialmente la regione pericentromerica del braccio corto dei cromosomi della prima coppia.

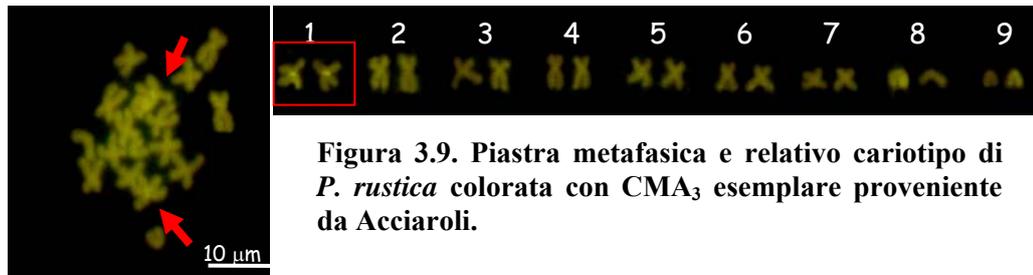


Figura 3.9. Piastra metafasica e relativo cariotipo di *P. rustica* colorata con CMA₃ esemplare proveniente da Acciaroli.

3.3. Indagine molecolare

Le indagini molecolari sono state effettuate tramite lo studio di sequenze dei geni mitocondriali 12S e 16S rRNA. Le sequenze di tali geni sono disponibili in GeneBank, in quanto già utilizzate in studi di filogenesi molecolare dei Patellidi (Koufopanou *et al.*, 1999; Sà-Pinto *et al.*, 2005).

L'analisi di sequenze del genoma mitocondriale (mtDNA) trova largo uso soprattutto in studi filogenetici. Infatti, l'mtDNA ha parecchi vantaggi rispetto al genoma nucleare. Anzitutto è una molecola circolare relativamente piccola, con dimensioni variabili tra le specie animali tra le 15700 a 15900 coppie di basi, ovvero circa 2500 volte più piccola delle dimensioni dei più piccoli DNA genomici degli animali. Il genoma mitocondriale contiene due geni per rRNA (12S e 16S), 22 geni per tRNA mitocondriale, 13 geni per subunità proteiche di enzimi di trasporto di elettroni e ATP sintetasi, e una parte regolatrice contenente i siti di partenza della replicazione del DNA. E' presente in più copie (e quindi in grossa quantità) in ciascun mitocondrio. Inoltre è facilmente estraibile ed è aploide (da cui nessun polimorfismo intrinseco). Il suo modello di ereditarietà, esclusivamente lungo la linea materna, lo porta ad essere considerato un eccellente marcatore per studi filogenetici. Infine, l'analisi di sequenze di geni mitocondriali, quali quelli della COI (citocromo ossidasi I), del 12S o 16S rRNA, è largamente usata ai fini tassonomici ed è alla base dell'ambizioso progetto (in cui sono impegnati gli scienziati di oltre 50 nazioni Italia inclusa), mirato ad accumulare un codice a barre (Barcoding) basato su corte sequenze di DNA ed identificativo per le oltre 10 milioni di specie attualmente conosciute sulla terra (Savolainen *et al.*, 2005).

L'analisi tassonomica molecolare basata sull'esame del DNA, oltre alle molteplici evidenze pratiche, rispetto ai metodi morfologici, ha l'enorme vantaggio di tenere conto della diretta ereditarietà dei caratteri utilizzati per l'identificazione. A differenza, infatti, di molti caratteri morfologici le sequenze

di DNA non sono soggette a modifiche ambientali o di sviluppo, che sono potenzialmente fuorvianti (Pfenninger *et al.*, 2006).

3.3.1. Risultati.

Le sequenze dei geni mitocondriali 12S e 16S rRNA, ottenute dagli esemplari delle quattro specie di *Patella* esaminate, sono state confrontate con quelle disponibili in GeneBank per le stesse specie ed hanno generato gli alberi filogenetici mostrati nelle figure 3.10, 3.11, 3.12 A e B. Le sequenze ottenute saranno inserite in GeneBank. L'analisi molecolare ha evidenziato alcuni casi di errata identificazione specifica sulla base dei caratteri morfologici (Figura 3.10). Le forme poligonali (subplana) della *P. caerulea* raggruppano con gli esemplari con forme tipiche della specie (Figura 3.10).

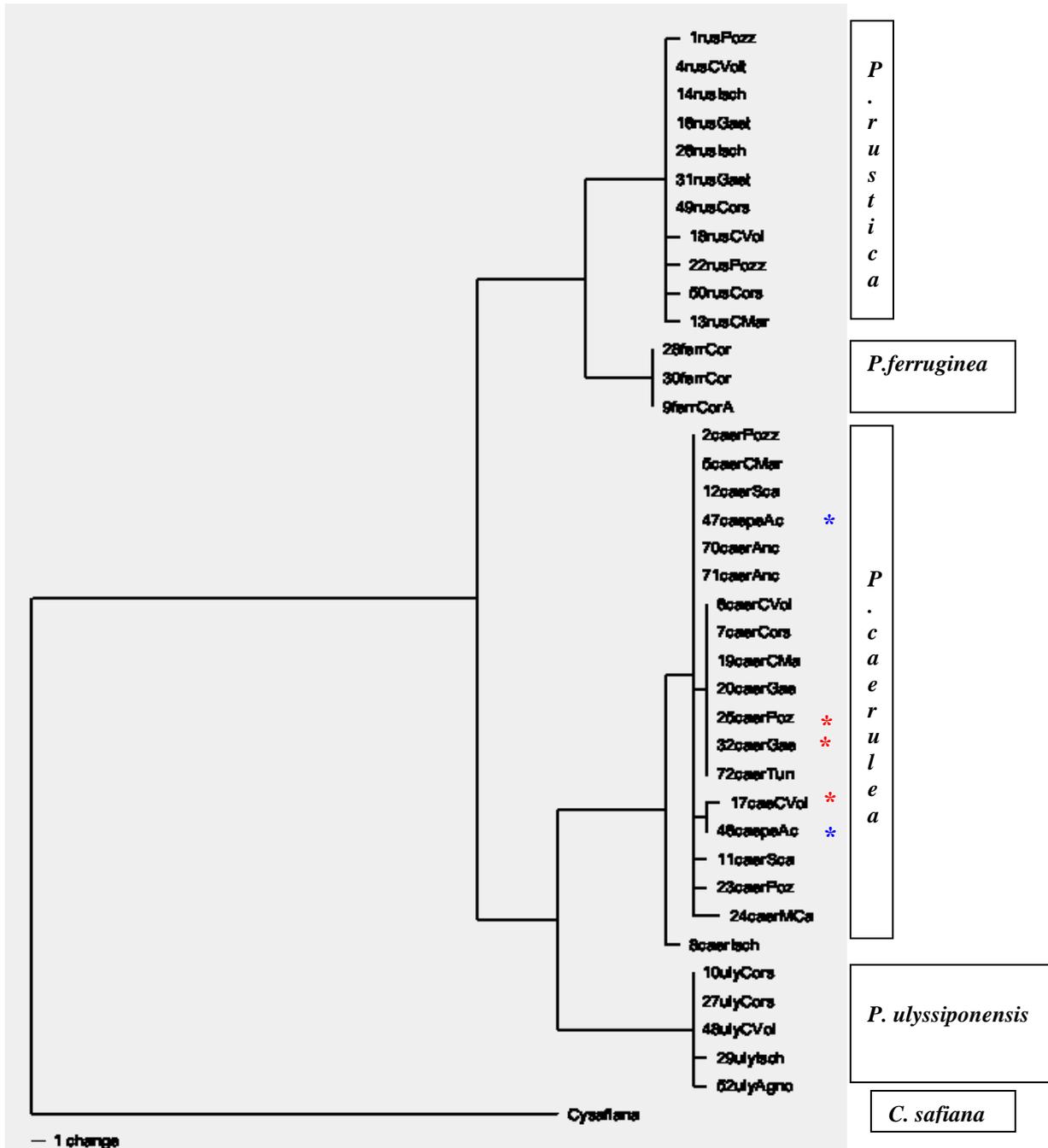


Figura 3.10. 16S rRNA Analisi Cladistica - upgma method. *Cymbula safiana* come out group. Gli asterischi rossi indicano gli esemplari di *P. caerulea* che in base all'analisi morfologica erano stati assegnati a *P. rustica* (esemplare 32caerGae) o a *P. ulyssiponensis* (esemplari 17caerCVol e 26caerPoz). Gli asterischi blu indicano le forme "subplana" della *P. caerulea*.

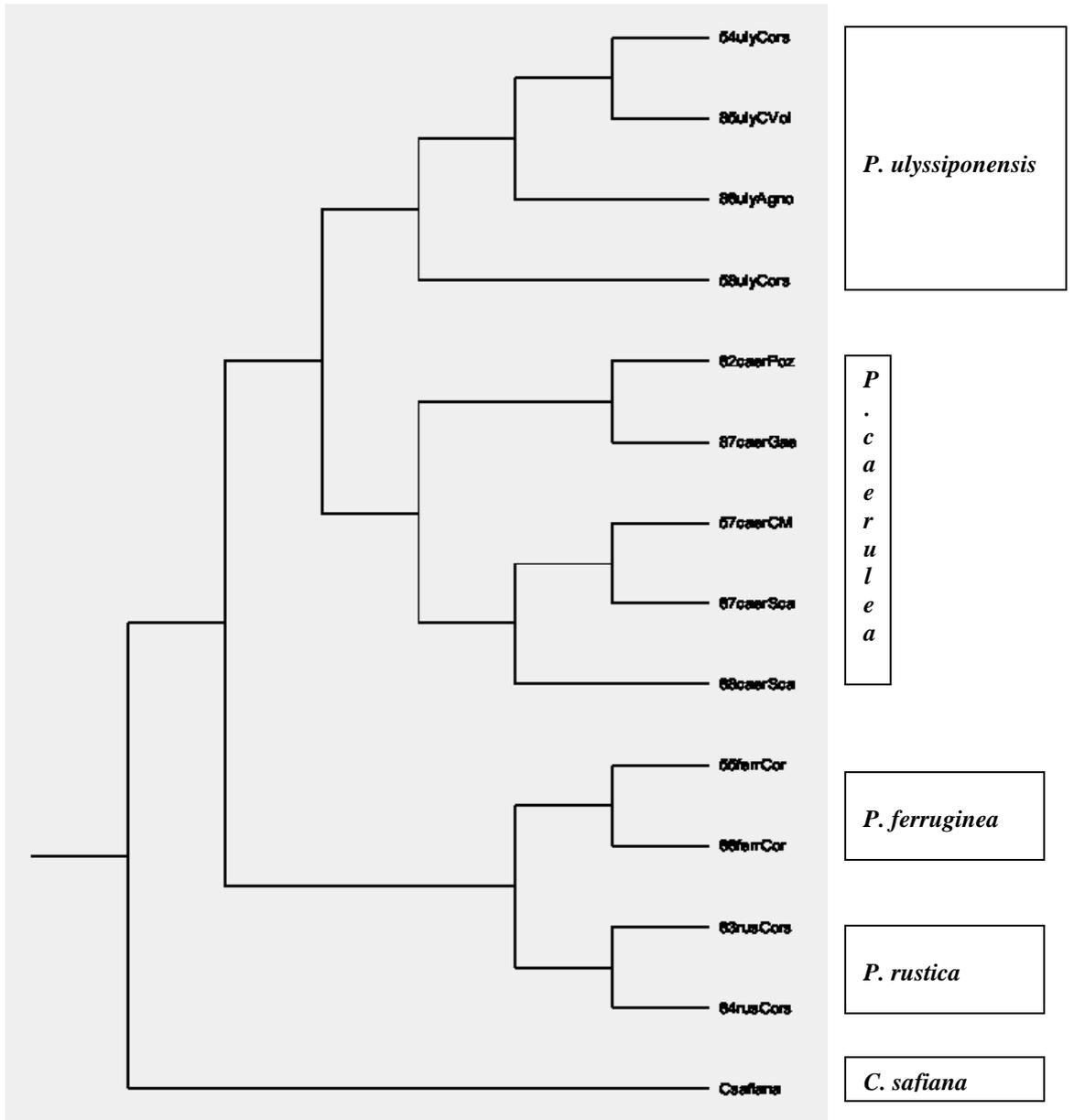


Figura 3.11. 12S rRNA Analisa Cladistica - UPGMA method. *Cymbula saifana* come out group.

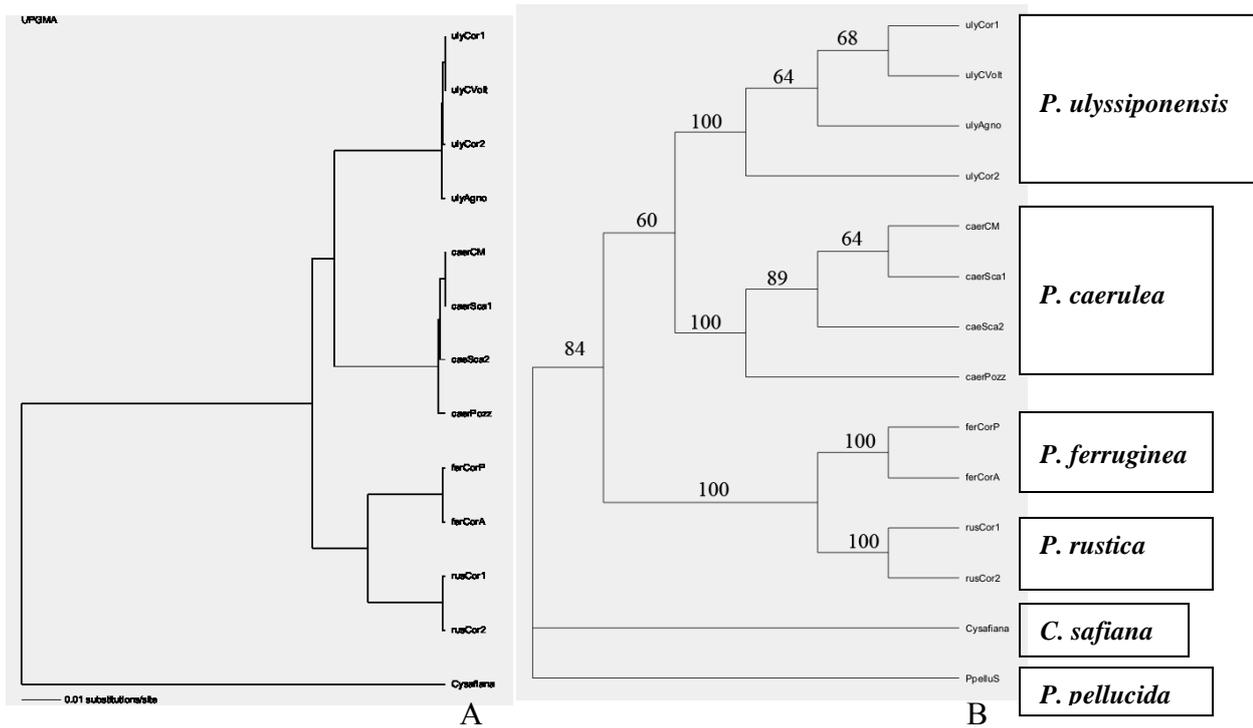


Figura 3.12. 12S + 16SrRNA. Analisi Cladistica - upgma method. *Cymbula safiana* come out group. (A). Analisi Cladistica - Bootstrap distance - Heuristic method. *Cymbula safiana* e *Patella pellucida* come out groups (B).

3.4. Discussione

I risultati ottenuti dall'analisi delle sequenze dei geni 12S e 16S rRNA del DNA mitocondriale dagli esemplari di *Patella* evidenziano che l'idea, alla base del progetto internazionale "Barcoding" (Savolainen *et al.*, 2005) in cui corte sequenze di DNA di geni mitocondriali o nucleari possano essere identificative per le oltre 10 milioni di specie esistenti sulla terra, è un metodo affidabile ed oggettivo per l'attribuzione specifica di campioni di *Patella*. Infatti, i 38 campioni di *Patella* sequenziati, attribuiti in base alla morfologia alle 4 specie *P. caerulea*, *P. rustica*, *P. ulyssiponensis* e *P. ferruginea* sono stati ripartiti in 4 gruppi, relativi alle specie esaminate (in seguito all'analisi delle sequenze dei geni 12S e 16S rRNA). Ciononostante l'attribuzione specifica dei campioni effettuata con criteri morfologici e quella effettuata su base molecolare hanno mostrato una corrispondenza buona ma non assoluta. Nei casi di discrepanza, la più approfondita analisi morfologica, riconosceva la *misidentification* della precedente attribuzione. Nella maggior parte dei casi l'errore di determinazione riguardava l'attribuzione di esemplari di *P. caerulea* a *P. ulyssiponensis* o a *P. rustica*. Gli errori di determinazione non hanno riguardato *P. ferruginea*, facilmente distinguibile dalle specie congeneriche sintopiche in base ai peculiari caratteri morfologici. Gli errori di *misidentification* morfologica di esemplari di *P. caerulea* possono essere attribuiti alla straordinaria variabilità delle sue forme, che presentano caratteri che si sovrappongono con quelli di *P. rustica* e di *P. ulyssiponensis* (Ghisotti & Melone, 1970). L'analisi molecolare dei geni 12S e 16S rRNA, pertanto, si dimostra di maggiore affidabilità rispetto a quella morfologica nell'attribuzione specifica di esemplari di *Patella* delle nostre coste, in accordo con Mauro e coautori (2003). Nei casi in cui dall'analisi morfologica emergano dubbi riguardo alla attribuzione specifica, per non escludere dall'indagine gli esemplari in questione, è necessario l'uso della tassonomia molecolare. L'indagine molecolare ha, inoltre, il vantaggio di essere rapida, fornendo la diagnosi in poche ore; per la sua esecuzione non è indispensabile disporre di specifiche competenze o di particolari attrezzature, in quanto

esistono centri di servizio di Biologia molecolare, che a costi accessibili, effettuano l'analisi sul campione recapitato o su una piccola porzione di un suo organo.

Gli studi cariologici di Cervella e coautori (1988) condotti con metodi di colorazione convenzionali su *P. caerulea*, *P. rustica* e *P. ulyssiponensis* hanno evidenziato che solo *P. ulyssiponensis*, presentando un cariotipo di $2n = 16$ elementi tutti a due braccia, poteva essere discriminata dalle altre due specie sintopiche, con cariotipo di $2n = 18$ elementi, 14 dei quali metacentrici e 4 telocentrici. I risultati ottenuti nella presente indagine su esemplari campani di *P. caerulea* e di *P. rustica* confermano il cariotipo descritto da Cervella e coautori (1988) ed evidenziano che le due specie possono essere distinte tra loro in base alla distribuzione e composizione dell'eterocromatina. *Patella caerulea* presenta sui cromosomi evidenti blocchi di eterocromatina centromerica, contenente famiglie di DNA altamente ripetute ricche in AT e/o GC (positive al DAPI e/o CMA₃). *Patella rustica*, invece, possiede una scarsa quantità di eterocromatina centromerica con sequenze altamente ripetute di DNA non particolarmente ricche in AT o GC (negative al DAPI e/o CMA₃).

Sia le analisi cromosomiche che quelle delle sequenze dei geni 12S e 16S rRNA non hanno evidenziato alcun grado di diversificazione della morfa subplana di *P. caerulea*. Tale evidenza è in accordo con l'ipotesi che la forma della conchiglia delle differenti morfe sia una conseguenza dei fattori edafici e del differente grado di esposizione al moto ondoso a cui gli esemplari sono soggetti (Ghisotti & Melone, 1970).

L'analisi delle sequenze 12S e 16S hanno anche fornito risultati utili ai fini sistematici e filogenetici delle quattro specie esaminate. Le sequenze allineate e fatte girare nel programma di filogenesi molecolare PAUP usando, come suggerito da Sá-Pinto e coautori (2005), quale *out group* *Cymbula safiana*, hanno generato alberi filogenetici in cui le quattro specie risultavano ripartite in due cladi: uno comprendente *P. rustica* e *P. ferruginea*; l'altro *P. caerulea* e *P. ulyssiponensis*. Tali evidenze confermano i risultati dell'analisi filogenetica

molecolare ottenuti, sulle stesse regioni mitocondriali, in *Patella* da Koufopanou e coautori (1999) e da Sá-Pinto e coautori (2005). In entrambi gli studi, comunque, ed in particolare in quello di Sá-Pinto e coautori (2005), dove è stata operata una revisione sistematica di tutte le specie del genere *Patella*, gli esemplari di *P. caerulea*, *P. ulyssiponensis* e di *P. rustica* esaminati erano extra-italiani. In questa tesi le analisi sono state applicate ad individui italiani delle specie su indicate ed estese ad esemplari corsi di *P. ferruginea*.

La maggiore affinità tra *P. caerulea* e *P. ulyssiponensis* rispetto a *P. rustica* è stata evidenziata dai dati elettroforetici ottenuti da Cretella e coautori (1994), Sella e coautori (1993) e Mauro e coautori (2003). L'analisi delle sequenze della regione del cytochrome oxidase I (COI I) del mtDNA (Mauro *et al.*, 2003) mostra, invece, una maggiore affinità tra *P. ulyssiponensis* e *P. rustica* rispetto a *P. caerulea*. E' da evidenziare che in *Patella* Sá-Pinto e coautori (2005) hanno mostrato che le sequenze COI I generano alberi filogenetici di scarsa risoluzione e che differiscono da quelli ottenuti dall'analisi delle sequenze COI I+12S+16S.

Utili informazioni si ottengono anche integrando le evidenze molecolari in *P. caerulea* e *P. ulyssiponensis* con quelle cromosomiche, che indicano come derivato il cariotipo di *P. ulyssiponensis*. Tale specie presenta un cariotipo di $2n = 16$ cromosomi, tutti meta- o submetacentrici, mentre quello di *P. caerulea* presenta un corredo cromosomico di $2n = 18$ cromosomi, tutti a due braccia eccetto quelli telocentrici delle ultime due coppie. La transizione da un cariotipo all'altro può essere avvenuta o per riduzione o per incremento del numero cromosomico. Nel caso dell'incremento del numero cromosomico, si deve ipotizzare un'origine da un evento di fissione di una coppia di cromosomi metacentrici; pertanto il cariotipo di $2n = 16$ cromosomi sarebbe primitivo. Nel caso della riduzione del numero di cromosomi, è da ipotizzare una derivazione da un evento di fusione centrica tra due elementi telocentrici; in tal caso sarebbe primitivo il cariotipo di $2n = 18$ cromosomi. L'ultima ipotesi è supportata dalle evidenze cromosomiche in *P. caerulea* in cui gli eventi di fusione centrica avvengono con relativa frequenza. In esemplari di tale specie sono state osservate piastre metafasiche con 17 cromosomi, di cui 15 metacentrici e due

telocentrici, ovvero con un cromosoma metacentrico in più e due telocentrici in meno. D'altra parte in numerosi taxa, molluschi inclusi (Thiriot-Quièvreux, 2002, 2003) i riarrangamenti robertsoniani (fissioni/fusioni centriche) sono considerati i principali motori dell'evoluzione cariologica.

4. Materiali e metodi

4.1. Siti di campionamento

L'indagine è stata condotta attraverso una comparazione di esemplari provenienti da vari ambienti, classificati in base ai dati sulla balneabilità 2007 ARPAC, Progetto Si.Di.Mar. 2001-2006, dati Ministero della Salute, dati ICRAM 2002 (Tabella 4.1): ambienti fortemente degradati quali coste a ridosso di foce dei fiumi (inquinamento da prodotti di sintesi utilizzati in agricoltura, scarichi industriali e organici), coste adiacenti a fogne (inquinamento organico), porti (inquinamento da idrocarburi), ed ambienti ritenuti non contaminati come il Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, utilizzato come sito di controllo.

I siti scelti per il campionamento a partire da giugno 2006 fino a maggio 2007, per gli esemplari di *P. caerulea* sono stati:

- **Pozzuoli** (Napoli), allo sbocco di uno scarico controllato in prossimità del porto (Figura 4.1);
- **Mergellina** (Napoli), nelle adiacenze di uno scarico (Figura 4.2);
- **Castellammare di Stabia** (Napoli), a circa 200 m dalla foce del fiume Sarno (Figura 4.3);
- **Castelvoturno** (Caserta), a circa 200 m dalla foce del fiume Volturno (Figura 4.4);
- **Isola di Ischia** (Napoli), nel tratto costiero presso S. Angelo (Figura 4.5);
- **Gaeta** (Latina), lungomare Caboto, nelle adiacenze della base militare NATO (Figura 4.6).
- È stato scelto **Acciaroli** (Salerno) (Figura 4.7), all'interno del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano come sito di riferimento. Tale area è ritenuta incontaminata (dati ARPAC).

In base a precedenti studi sullo *status* ambientale delle coste campane (Comunicato stampa Goletta Verde, 2006 da www.legambiente.it, www.ulixes.it, dati ARPAC, progetto Si.Di.Mar, Ministero della Salute) risulta

che la foce dei fiumi Sarno e Volturno ed il porto di Pozzuoli siano fortemente inquinati, mentre l'isola d'Ischia ed il sito di Acciaroli risultano, rispettivamente, poco o per niente inquinate. Tuttavia alcune aree del Cilento, così come alcune zone di Napoli, presentano elevate concentrazioni, nel sedimento, di arsenico; tale dato potrebbe essere però dovuto ad una presenza naturale di tale elemento e non ad inquinamento in quanto la presenza di arsenico nelle acque profonde sembra essere in relazione all'idrochimica dei complessi vulcanici. È ormai noto, infatti, che gli acquiferi ubicati in aree vulcaniche attive con risalite di fluidi profondi (Vesuvio, Campi Flegrei, Ischia) sono caratterizzati dalla presenza nelle acque di arsenico (Progetto Si.Di.Mar. 2001-2006). Acciaroli, pertanto, può essere ragionevolmente equiparata a stazione di controllo.

Al contrario, la foce del fiume Sarno è quella che desta più preoccupazioni dal punto di vista ambientale nella regione campana per le intense attività agricole ed industriali (in particolare industrie conciarie). In tale fiume sono state riscontrate, nei sedimenti, elevate concentrazioni di cadmio, cromo, piombo, rame (cfr. Tabella 4.1). Riguardo la stazione di prelievo di Pozzuoli, la maggiore causa di inquinamento è costituita dagli scarichi inquinanti (navi nel porto) che non sono sottoposti a depurazione (www.ulixes.it). In alcune zone è addirittura vietata la balneazione (Comunicato stampa, Goletta Verde, 2006, ARPAC 2007). Il sito dove sono stati raccolti gli esemplari per il presente studio è nell'area portuale in prossimità dello sbocco di uno scarico controllato, dove le acque, visibilmente torbide, erano di colore bianco-latte.

La criticità delle acque marine della provincia di Caserta, in particolare alla foce del fiume Volturno, è stata confermata da precedenti indagini, che hanno rilevato una concentrazione, oltre 5 volte il limite ufficiale, di 500 *Escherichia coli*/100 ml (Comunicato stampa, Goletta Verde, 2006) ed elevate concentrazioni di PCB (Progetto Si.Di.Mar 2001-2006). Nel presente studio, la stazione di campionamento di Castelvoturno è a circa 200 m da tale foce.

Dalle stesse indagini l'isola di Ischia è risultata in molti punti poco o per niente inquinata con i parametri DPR 470/82 entro i limiti e *Escherichia coli* compreso tra 250 e 500 ufc/100 ml (Comunicato stampa, Goletta Verde, 2006);

in altri punti, come in vicinanza del porto, il grado di inquinamento è risultato maggiore (dati ARPAC 2007).

Mergellina è risultata località permanentemente non balneabile per cause diverse dall'inquinamento in base ai dati ARPAC 2007. In base ai dati Progetto Si.Di.Mar. 2001-2006 (riferite alla zona adiacente di Piazza Vittoria) le concentrazioni di inquinanti più elevate sono quelle riscontrate per il piombo (dovuto all'intenso traffico stradale), per il mercurio, l'arsenico, gli IPA e PCB (cfr. Tabella 4.1).

Per Gaeta risultano, dai dati del Ministero della Salute alcuni tratti di costa balneabili ed altri no, il lungomare Caboto risulta tra questi ultimi. Dai dati ICRAM, risultano per Gaeta elevate concentrazioni di cromo, mercurio, piombo ed arsenico (cfr. Tabella 4.1).

Le concentrazioni di metalli ed inquinanti organici sono stati riferiti agli *standards* di qualità dei sedimenti delle acque marino costiere, lagune e stagni costieri secondo la tabella n.2 All. A D. M. 367/2003 (Progetto Si.Di.Mar. 2001-2006).

Sono stati utilizzati in totale 241 esemplari di *P. caerulea*, provenienti dai diversi siti su elencati e in particolare: 61 sono stati utilizzati per lo studio delle istopatologie branchiali; 161 esemplari sono stati utilizzati per l'analisi cromosomica; 19 per l'analisi tassonomica molecolare (in quest'ultima analisi sono compresi esemplari occasionalmente campionati a Scario, Marina di Camerota, Ancona, Corsica e Tunisia).

Negli stessi siti sono, inoltre, stati raccolti campioni appartenenti a *P. rustica* (25 per le analisi cromosomica e 9 per l'analisi molecolare) e a *P. ulyssiponensis* (6 per l'analisi molecolare). Occasionalmente sono stati prelevati, per l'analisi tassonomica molecolare, 10 campioni di *P. rustica* e 9 di *P. ulyssiponensis* provenienti da Agnone e dalla Corsica, e tre esemplari di *P. ferruginea* provenienti dalla Corsica.

Tabella 4.1. Concentrazioni medie di sostanza secca (mg/kg) dei principali parametri analizzati rinvenuti nei sedimenti relativi al 2002 per Gaeta ed all'intervallo 2001-2004 per i restanti siti. In grassetto sono indicati i metalli e le sostanze organiche la cui concentrazione è superiore a quella standard. Da Progetto Si.Di.Mar. 2001-2006 e Dati ICRAM 2002.

Località	Siti di campionamento della tesi	Concentrazioni medie di sostanza secca dei principali parametri rinvenuti nei sedimenti (mg/Kg)									
		Cromo	Rame	Piombo	Mercurio	Arsenico	IPA	PCB	Zinco	Nichel	Cadmio
Foce Volturno	Castelvolturno	26,90	13,40	13,00	0,24	5,00	0,03	0,88	33,10	16,30	0,20
Napoli (P.zza Vittoria)	Mergellina	12,60	14,00	86,90	0,43	13,70	0,53	1,27	76,70	15,20	0,18
Portici		17,80	28,20	20,10	0,25	13,00	0,34	1,97	55,40	16,20	0,15
Foce Sarno	Castellammare di Stabia	84,40	50,50	58,20	0,28	8,10	0,11	2,95	55,40	16,60	0,36
Foce Picentino		14,10	4,60	6,90	0,28	5,80	0,01	0,26	68,00	11,30	0,15
PuntaTresino		5,70	1,30	4,70	0,08	22,90	0,01	0,62	43,80	5,90	0,04
Punta Licosa	Acciaroli	5,20	1,80	4,00	0,10	22,00	0,01	0,24	14,60	5,40	0,05
Gaeta	Gaeta (Lungomare Caboto)	59,56	25,60	49,96	0,12	30,00	-	-	79,99	26,36	0,09



Figura 4.3. Sito di campionamento di Castellammare di Stabia e relativi dati ARPAC 2007 sulla balneabilità e Si.Di.Mar 2001-2004. Negli ovali sono racchiusi i valori con concentrazione superiore a quella standard.

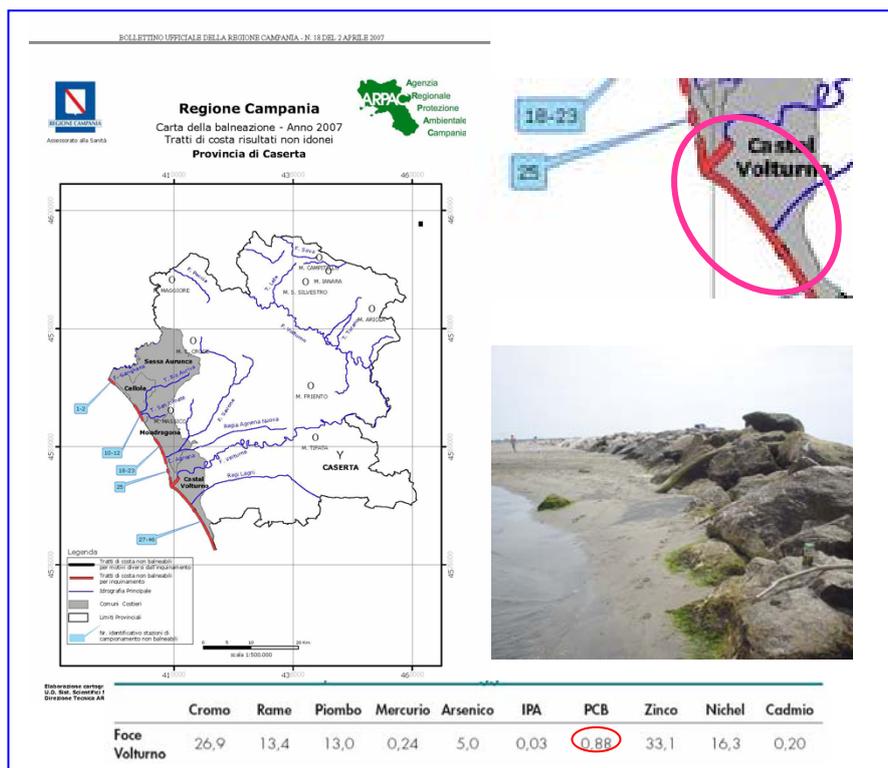


Figura 4.4. Sito di campionamento di Castelvoturno e relativi dati ARPAC 2007 sulla balneabilità e Si.Di.Mar 2001-2004. Nell'ovale è racchiuso il valore con concentrazione superiore a quella standard.

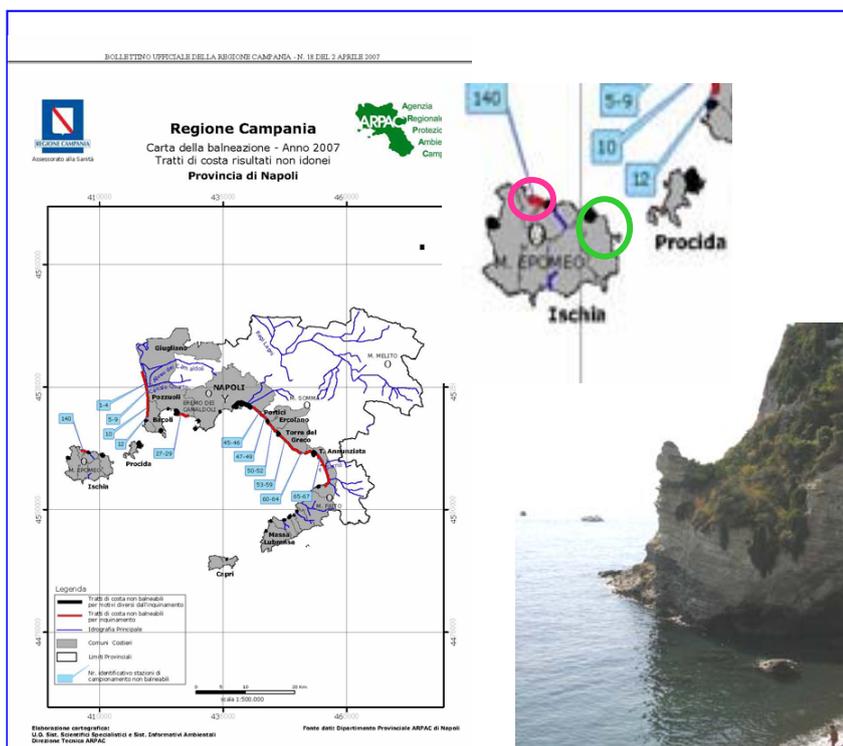


Figura 4.5. Sito di campionamento di Ischia e relativi dati ARPAC 2007 sulla balneabilità.

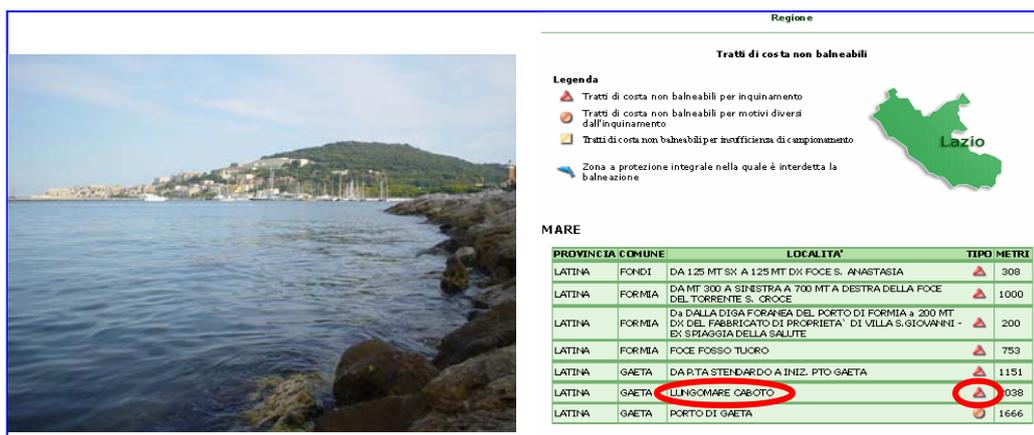


Figura 4.6. Sito di campionamento di Gaeta e relativi dati del Ministero della Salute sulla balneabilità.

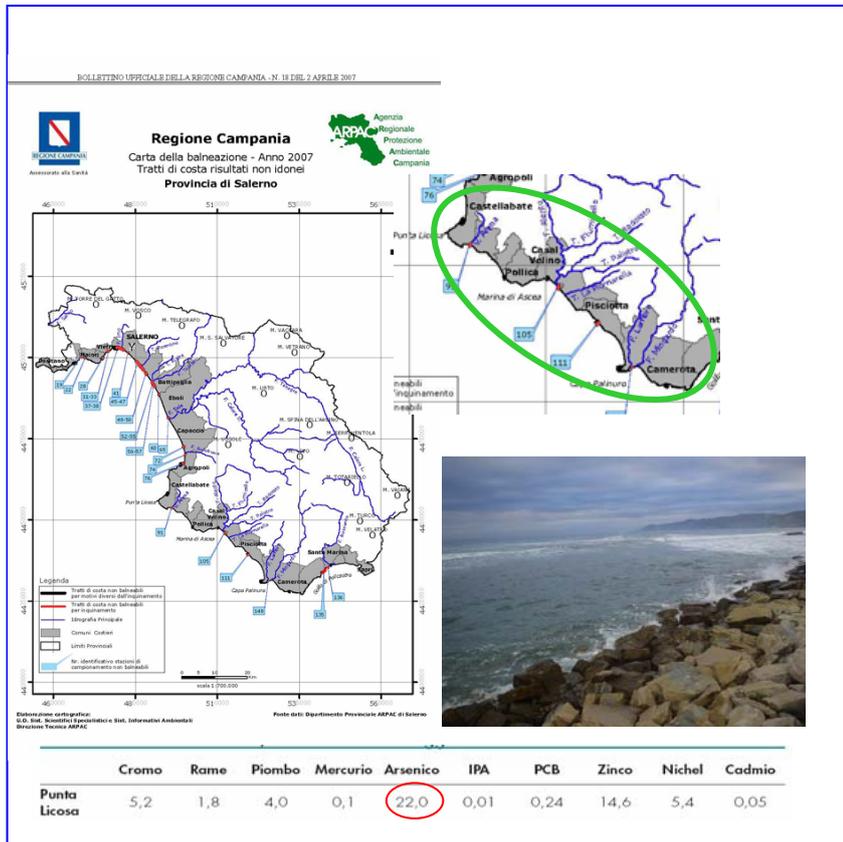


Figura 4.7. Sito di campionamento di Acciaroli e relativi dati ARPAC 2007 sulla balneabilità e Si.Di.Mar. 2001-2004. Nell'ovale è racchiuso il valore con concentrazione superiore a quella standard.

4.2. Indagini cromosomiche

I danni cromosomici sono stati valutati analizzando la presenza di lesioni cromosomiche, monitorando quelle mono- e dicromatidiche, e la presenza di fratture cromosomiche in piastre metafasiche. I cromosomi sono stati ottenuti da 161 esemplari di *P. caerulea* e 25 esemplari di *P. rustica* solo durante il periodo invernale, quando le due specie erano in attività riproduttiva.

La morfologia dei cromosomi è stata studiata analizzando le piastre metafasiche di esemplari provenienti dai diversi siti campionati e ricostruendone i relativi cariotipi. I cariotipi sono stati utilizzati per misurare i parametri morfometrici per i cromosomi; l'indice centromerico (CI) e la lunghezza relativa (RL). I cromosomi sono stati classificati in accordo con i criteri di Levan e coautori (1964), considerando metacentrici i cromosomi con indice centromerico tra 0,5 e 0,375; submetacentrici quelli con indice compreso tra 0,375 e 0,250; subtelocentrici quelli con indice compreso tra 0,250 e 0,125 e telocentrici quelli con indice compreso tra 0,125 e 0.

4.2.1. Allestimento dei cromosomi e colorazioni.

I cromosomi sono stati ottenuti mediante la tecnica dell' *air drying*. Sono state analizzate le gonadi e/o le branchie dei campioni di *Patella*: le cellule sono state bloccate in metafase iniettando agli animali da 0,05 a 0,1 ml, in dipendenza della taglia, una soluzione contenente colchicina allo 0,05% in acqua di mare, lasciata agire *over night*. Le branchie e le gonadi sono state incubate per 30 minuti in soluzione ipotonica (KCl 0,075 M + Na-citrato 0,5%, v./v.), poi fissati in soluzione metonoloacetica (alcol metilico ed acido acetico 3:1) per 10 minuti. Si è poi effettuato lo *scraping* dei tessuti su setacci (20 mesh/ cm²) e le sospensioni cellulari sono state conservate a -20°C. I vetrini sono stati sottoposti sia alla colorazione standard con Giemsa 5% a pH7, sia alle colorazioni di bandeggio, in particolare quelle per seguire la localizzazione degli organizzatori nucleolari (NOR): Ag-NOR *banding* secondo Howell & Black (1980) e Cromomicina A₃ colorazione CMA₃/Verde Metile secondo Sahar & Latt (1980). Per evidenziare la presenza di *clusters* di sequenze ricche in AT sono state anche

eseguite colorazioni con fluorocromi AT specifici (Quinacrina e DAPI) secondo Schmid (1978). La distribuzione dell'eterocromatina è stata seguita tramite colorazioni con C-banding/Giemsa (Sumner, 1972) e colorazioni sequenziali con C-banding/fluorocromi AT (DAPI) e CG (Cromomicina A₃) specifici (Odierna *et al*, 2006).

È stata inoltre effettuata l'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) dei cromosomi secondo la metodica di Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000). Tale tecnica permette di conoscere la localizzazione cromosomica di una sequenza specifica di acidi nucleici su preparati fissati di cromosomi metafasici, mediante l'uso di sonde di DNA. Nel corso del presente studio è stata utilizzata una sonda biotinilata contenente sequenze di quasi tutto il gene del 18S rRNA del mollusco antartico *Adamussium colbecki*, amplificata mediante PCR come descritto in Odierna e coautori (2006). In breve, dopo la denaturazione in Formamide al 70% e soluzione salina di sodio citrato 2x (SSC) per 2 min a 80°C, i vetrini sono stati incubati *over night* a 40°C con la *mix* di ibridazione (10 ng/μl sonda marcata con biotina 16 dUTP + 0.1 μg/μl *E. coli* DNA in 50% Formamide e 2x SSC). Dopo il lavaggio in 2x SSC, è stata effettuata l'evidenziazione citochimica utilizzando l'extravidina FITC coniugata (Sigma) alla concentrazione finale di 5μg/ml in 4x SSC+ 1% BSA+ 0, 1% Tween 20, pH 7. I vetrini sono stati incubati per 30 minuti con extravidina FITC in 200 μl a 37°C. Dopo tre lavaggi, di 10 minuti ciascuno, a 42°C in 4x SSC in 0.1% Tween 20, al buio, i vetrini sono stati contrastati con Propidio ioduro (Sigma) alla concentrazione finale di 200 ng/ml in 2x SSC a pH 7, per 2 min a temperatura ambiente. Infine, I vetrini sono stati montati con antifade (DABCO, Sigma) contenente 200 ng/ml di propidio ioduro. Il segnale di ibridazione è stato evidenziato e fotografato utilizzando un microscopio ad epifluorescenza (Axioscope Zeiss) equipaggiato con una fotocamera digitale CCD. Poiché il segnale d'ibridazione era mascherato dal legame aspecifico della FITC-ExtraAvidina ai residui di vitello sui preparati ottenuti dalle gonadi femminili, prima di effettuare l'ibridazione *in situ* i vetrini sono stati pretrattati come segue:

Pre-trattamento A

Digestione con RNasi A e postfissazione con formalina sui vetrini allestiti il giorno precedente:

- Incubare per 30-60 minuti a 37°C in RNasi 100 microgrammi/ml in tris HCl 10 mMol (RNasi stock solution 10 mg/ml)
- Lavare due volte in 2xSSC agitando i vetrini
- Incubare per 5 min in PBS (Tampone fosfato) con 50 mMol di MgCl₂
- Fissare per 10 min in 1% formaldeide in PBS con 50 mMol di MgCl₂
- Lavare in PBS per 5 minuti
- Disidratare i vetrini nella serie ascendente dell'etanolo, lasciare asciugare all'aria. I vetrini possono essere conservati a 4°C fino a un mese.

Pre-trattamento B

Trattamento con l'RNasi e successiva digestione con una proteasi (la Pepsina):

- Incubare per 30-60 min a 37°C in RNasi 100 microgrammi/ml in tris HCl 10 mMol (RNasi stock solution 10 mg/ml)
- Lavare due volte in 2xSSC agitando i vetrini
- Incubare per 5 minuti in HCl 10 mM
- Incubare per 10 min a 37°C con Pepsina alla concentrazione 500 µg/ml in HCl 10 mM
- Lavare due volte in 2xSSC agitando i vetrini
- Incubare i vetrini per 5 min in PBS con 50 mMol di MgCl₂
- Fissare per 10 min in 1% formaldeide in PBS con 50 mMol di MgCl₂
- Lavare in PBS per 5 minuti
- Disidratare i vetrini nella serie ascendente dell'etanolo, lasciare asciugare all'aria. I vetrini possono essere conservati a 4°C fino a un mese.

Pre-trattamento C

Trattamento dei vetrini con HCl 0,2 M e con 2xSSC a 50°C prima della digestione con la RNasi:

- Lavare in acqua e incubare per 10 min in 2xSSC a 50°C
- Lavare in acqua ed asciugare all'aria

- Incubare per 30-60 min a 37°C in RNasi 100 microgrammi/ml in tris HCl 10 mMol (RNasi stock solution 10 mg/ml).
- Lavare due volte in 2xSSC agitando i vetrini
- Incubare per 5 minuti in HCl 10 mM
- Incubare per 10 min a 37°C Pepsina a 500 µg/ml in HCl 10 mM
- Lavare due volte in 2xSSC agitando i vetrini
- Incubare i vetrini per 5 min in PBS con 50 mMol di MgCl₂
- Fissare per 10 min in 1% formaldeide in PBS con 50 mMol di MgCl₂
- Lavare in PBS per 5 minuti
- Disidratare i vetrini nella serie ascendente dell'etanolo, lasciare asciugare all'aria. I vetrini possono essere conservati a 4°C fino a un mese.

4.3. Analisi Molecolare

Le indagini molecolari sono state effettuate estraendo il DNA dal piede e/o dalla gonade degli individui provenienti dalle differenti popolazioni campionate delle quattro specie italiane.

Il DNA è stato estratto da pezzi di tessuto del piede e /o delle gonadi delle patelle, fissati in etanolo assoluto. Prima dell'estrazione i tessuti sono stati frammentati e sottoposti un lavaggio in PBS 1x e due lavaggi in TE 1x a pH 8 (Tris EDTA). L'estrazione è stata effettuata secondo il protocollo descritto in Sambrook e coautori (1989), modificando però il tempo di digestione; i tessuti venivano infatti lasciati a 37°C *over night*, in quanto il piede delle patelle è molto coriaceo, essendo costituito essenzialmente da tessuto muscolare. Inoltre, poiché si sono avute difficoltà ad ottenere DNA non frammentato, è stato omesso il primo passaggio in solo fenolo, evidentemente aggressivo per i tessuti analizzati. Il DNA estratto è stato letto allo spettrofotometro al fine di ottenerne la giusta diluizione.

Da 38 campioni, rappresentativi dei diversi siti presi in esame, i geni mitocondriali 12S e 16S rRNA sono stati amplificati tramite PCR, utilizzando per il 16S i primers disegnati da Palumbi (1996) (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'; 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') e per il 12S i primers utilizzati da Koufopanou *et al.* (1999) (12S_{ma} primer 5'-CTGGGATTAGATACCCTGTTAT-3'; 12S_{mb} primer 5'-CAGAGAGTGACGGGCGATTTGT-3'). L'amplificazione è stata effettuata alle temperature di 94°C, 50°C, 72°C, rispettivamente per un tempo di 30", 45", 45", per un totale di 36 cicli. Gli amplificati sono stati visualizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio. Per 38 prodotti dell'amplificazione del 16S rRNA e per 13 amplificati del 12S rRNA è stata effettuata la purificazione su colonnina, i DNA sono quindi stati sequenziati (sequenziatore ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) e visualizzati mediante il programma Chromas, procedendo, ove necessario, a piccoli aggiustamenti manuali. La variabilità molecolare è stata saggiata analizzando la composizione in base, il numero dei siti variabili ed il numero delle trasversioni e transizioni. Le sequenze sono state visualizzate ed allineate con i programmi Bio Edit e CLUSTAL, le analisi cladistiche sono state eseguite con il programma di filogenesi molecolare PAUP, gli alberi filogenetici del 12S e del 16S rRNA sono stati ottenuti tramite il metodo upgma, utilizzando come *out group* le sequenze 12S e 16S rRNA di *Cymbula safiana*, presenti in Gen-Bank, come suggerito in Sá-Pinto e coautori (2005), per le sequenze combinate del 12S più quelle del 16S rRNA gli alberi filogenetici sono stati ottenuti tramite l' upgma method e l' heuristic method con l' opzione bootstrap distance basata su 1000 *replicates*, sono state usate come *out groups* le sequenze 12S e 16S rRNA di *Cymbula safiana* e *Patella pellucida*, disponibili in Gen-Bank, come suggerito in Sá-Pinto e coautori (2005).

4.4. Istologia

Per le indagini istologiche sono stati esaminati individui campionati a Pozzuoli, Mergellina, Castellammare di Stabia, Castelvoturno, Gaeta, Ischia, Acciaroli.

Per tale studio sono stati analizzati in totale 61 individui di *P. caerulea*. Le indagini istologiche e istopatologiche sono state condotte su sezioni di branchie incluse in paraffina.

Le sezioni istologiche sono state sottoposte a colorazioni di *routine* istochimiche ed immunoistochimiche.

La presenza di fenomeni apoptotici è stata verificata mediante il test di TUNEL utilizzando sia marcatori fluorescenti (FITC) che enzimatici (DAB), in modo da avere una verifica della attendibilità dei risultati ottenuti con l'uno o l'altro marcatore.

Le sezioni sono state osservate mediante un sistema di analisi di immagine costituito da microscopio Leica DME, accessorato anche per l'osservazione in fluorescenza, videocamera digitale Leica DC 100 (1072x 774 di risoluzione) e PC. Le immagini sono state acquisite e analizzate attraverso il software DC Viewer, commercializzato dalla LEICA.

4.4.1. Prelievo delle branchie.

Immediatamente dopo il campionamento, gli animali sono stati fissati *in toto* in formalina 4% in acqua di mare (per 24 h).

Dopo la fissazione, da ognuno degli animali sono state isolate le corone branchiali che dopo un rapido lavaggio in acqua distillata di 30 minuti, sono state immerse in successione in etanolo a 35° (1 ora), etanolo a 50° (1 ora) e conservate in etanolo a 75°.

4.4.2. Protocollo di inclusione in paraffina.

L'inclusione in paraffina è stata condotta secondo il protocollo standard (Mazzi, 1977), opportunamente modificato in relazione alla dimensione e consistenza dei campioni nel modo seguente:

- disidratazione in etanolo: 95% (24 h), 3 passaggi in etanolo assoluto (2 ore ciascuno)
- chiarificazione con histolemon (Carlo Erba): 2 passaggi (30 min ciascuno)
- passaggio in Histolemon+paraffina (1 ora)

- infiltrazione della paraffina in stufa a 60°C e sotto vuoto (24 ore)
- formazione del blocchetto di paraffina

4.4.3. Colorazione delle sezioni.

Le sezioni, ottenute mediante microtomo rotativo e 5 µm di spessore, sono state sottoposte alle seguenti colorazioni istologiche:

- Emallume – Eosina
 - colorazione tricromica Azan Mallory, per la evidenziazione del connettivo
- Alcune sezioni campione sono state sottoposte ai seguenti metodi di colorazione istochimica:
- PAS (acid Period Schiff),
 - Alcian blu 8GX in acido acetico 1%, utilizzando come colorante nucleare il carmallume,
 - Alcian blu-PAS (acid periodic Schiff) (AB+PAS) secondo il metodo di Mowry

La reazione PAS colora le glicoproteine e gli omopolisaccaridi di rosso Magenta. L'Alcian blu colora in blu i proteoglicani acidi (noti in passato come mucopolisaccaridi acidi). Il metodo combinato (AB+PAS) secondo Mowry colora i mucociti in un intervallo di colori che vanno dal blu al rosso Magenta, a seconda che prevalgono mucopolisaccaridi acidi (alcian blu positivi) o quelli neutri (PAS positivi).

Tutte le metodiche di colorazione sono state condotte seguendo i protocolli riportati in Mazzi (1977) e Bonucci (1991).

4.4.4. Tecnica citochimica TUNEL.

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un meccanismo largamente utilizzato dagli organismi per il loro corretto sviluppo, per l'omeostasi tissutale e come risposta cellulare a stress o patogeni. Le cellule apoptotiche sono caratterizzate, tra l'altro, da peculiari cambiamenti morfologici a livello del nucleo, che appare frammentato in più parti (corpi apoptotici) derivanti dalla frammentazione della cromatina. I nuclei apoptotici possono essere evidenziati mediante la tecnica TUNEL.

Nel presente studio la tecnica TUNEL è stata eseguita su sezioni in paraffina al fine di poter evidenziare alterazioni istologiche a carico delle branchie in relazione ad ambienti acquatici inquinati.

Per il test TUNEL con fluoresceina è utilizzato il kit della Roche “in situ cell death. Detection kit, fluorescein” (cat. N. 11684795910), il cui protocollo è riportato di seguito:

- Sparaffinatura secondo routine
- Permeabilizzazione delle membrane, ponendo i vetrini in tampone citrato pH 6 e irradiando con microonde (350W per 5 minuti)
- 2 lavaggi in PBS 10×
- Allestimento dei vetrini con i campioni da studiare, ponendo sulle sezioni con 50 µl di TUNEL MIXTURE, costituita da 450 µl di oligonucleotidi fluoresciniti (indicato nel kit come VAL 2) e 50 µl di enzima transferasi (VAL 1)
- Allestimento di vetrini di controllo negativo, ricoprendo le sezioni con 50 µl oligonucleotidi marcati con fluoresceina (VAL 2) senza l'enzima
- Allestimento di vetrino di controllo positivo: in tale caso sono stati utilizzati vetrini di un campione biologico (testicolo di tritone) dove preventivamente erano state riscontrate apoptosi.

Tutti i vetrini (controlli e campioni) sono stati lasciati incubare in camera umida per 60 minuti a 37° al buio. Successivamente sono stati eseguiti 2 lavaggi con tampone fosfato PBS 10× e subito dopo si è osservato al microscopio a fluorescenza

Per il test TUNEL con DAB è stato utilizzato il kit oncogene Il protocollo prevede:

- Sparaffinatura secondo routine
- 2 lavaggi in PBS 1×
- Copertura delle sezioni con 20µg/ml di PK in 10mM Tris pH 8)
- Incubazione a RT per 20'
- 2 lavaggi in PBS 1× per 5' (due volte)
- Blocco perossidasi endogene in metanolo a RT per 5'

- 2 lavaggi in PBS 1× per 5'
- 1× TdT Equilibration buffer RT per 20'
- Allontanamento delicato del TdT Equilibration buffer
- Incubazione a 37°C per per 1,5h in TdT Labeling Reaction Mixture
- Blocco della reazione in Stop buffer
- 2 lavaggi in PBS 1× per 5'
- Blocking Buffer (BB) a RT per 10'
- Allontanamento delicato del BB
- Incubazione a RT per 30'anticorpo
- 2 lavaggi in PBS 1× per 5'
- Rivelazione con DAB
- Controcolorazione con Verde Metile a RT per 3'
- Disidratazione con serie crescente di etanoli
- Passaggio in Xilene
- Montaggio dei vetrini in Eukitt

4.4.5. Criteri per la valutazione delle alterazioni istopatologiche a carico delle branchie.

In accordo a studi condotti su organismi marini, vertebrati (Machado & Fanta, 2003) ed invertebrati (Bhavan & Geraldine, 2000; Bresler *et al.*, 2003a), nel presente studio il grado di alterazione istopatologica è stato valutato in base ai seguenti criteri:

- a) sollevamento in pliche e/o coartazione dell'epitelio branchiale
- b) assottigliamento dell'epitelio branchiale
- c) iperplasia dell'epitelio branchiale
- d) presenza di vacuoli
- e) fusione dei filamenti branchiali
- e) alterazioni nucleari (ipocolorazione, picnosi, frammentazione)
- f) disgregazione dei setti connettivali delimitanti gli spazi emocelici

Le valutazioni sono state effettuate su sezioni di campioni inclusi in paraffina e colorati con Emallume Eosina o con la tricromica di Azan Mallory.

In alcuni individui, per i quali l'analisi morfologica mostrava alterazioni nucleari, è stato condotto il test TUNEL per saggiare la presenza di fenomeni apoptotici.

5. Risultati

5.1. Alterazioni cito- ed istopatologiche e stress genomico nelle branchie di *Patella caerulea*

5.1.1. Struttura istologica delle branchie in esemplari di riferimento.

Le branchie sono costituite da una sorta di corona circolare, ben visibile ad occhio nudo in visione ventrale, particolarmente dopo rimozione del piede. All'osservazione allo stereomicroscopio si osserva la derivazione delle branchie da pliche del mantello sporgenti nel solco palleopedale, lungo i lati del corpo.

In seguito alle colorazioni delle sezioni istologiche con Emallume-Eosina e con la tricromica Azan Mallory le branchie sono risultate formate da numerosi filamenti (Figura 5.1), rivestiti da epitelio monostratificato che poggia su una lamina basale di natura connettivale. Nella maggior parte degli animali esaminati, gran parte dei filamenti si presentava dilatato a formare un'ampolla terminale (Figura 5.2). All'interno di ogni filamento sono stati osservati ampi spazi (emocele) a loro volta separati da setti connettivali (Figura 5.2).

A forte ingrandimento, l'epitelio è apparso costituito prevalentemente da cellule cubico-cilindriche (diametro medio 8 μm). Talvolta, anche negli animali di riferimento sono stati osservati nell'epitelio vacuoli otticamente trasparenti nelle colorazioni istologiche di routine. Detti vacuoli risultavano negativi anche alle colorazioni istochimiche con Alcian-blu e con Alcian-blu+PAS (figura 5.3).

La superficie libera dell'epitelio branchiale, inoltre, è risultata caratterizzata da un sottile strato fortemente PAS positivo. Una debole positività alla reazione PAS è stata riscontrata nelle cellule epiteliali pavimentose (figura 5.3).

Nella lamina connettivale e nei setti intrabbranchiali sono stati osservati cellule con nucleo allungato ed eterocromatico, e numerosi emociti, sia sporgenti negli spazi intrabbranchiali sia liberi nell'emocele (Figura 5.3). La figura 5.4 mostra una sezione di branchia in condizioni normali.

5.1.2. Analisi cito- isto-patologica delle branchie.

Dal confronto tra le popolazioni campionate è emerso che l'epitelio mostra evidenti segni disorganizzazione in animali campionati in ambienti fortemente inquinati. Tale disorganizzazione si traduce in disgregazione dei setti connettivali dell'emocele (Figura 5.5), fusione dei filamenti (Figura 5.6) e alterazioni nucleari (Figura 5.7). Sono, inoltre, state osservate in tutti i siti, sia pure con differenti percentuali, alcuni tipi di alterazioni istopatologiche, quali sollevamento in pliche dell'epitelio branchiale (Figura 5.8) iperplasia dell'epitelio (Figura 5.9) e presenza di vacuoli (Figura 5.10).

Di seguito vengono descritte le alterazioni per i singoli siti:

Pozzuoli - Negli individui prelevati nei pressi della discarica controllata in prossimità del porto è stata osservata una percentuale più alta, relativamente agli altri siti, di iperplasia dell'epitelio, di vacuoli e picnosi a carico delle cellule della lamina basale. Molto raramente sono emerse alterazioni a carico della morfologia nucleare delle cellule dei setti intrabbranchiali.

Mergellina - Nelle branchie degli esemplari di tale sito, campionati nei pressi di uno scarico, è stata osservata una forte iperplasia dell'epitelio.

Castellammare di Stabia - Negli individui campionati presso la foce del Sarno l'epitelio branchiale ha mostrato aspetto fortemente irregolare, iperplastico, e spesso sollevato in pliche, con numerosi vacuoli ed un'elevata percentuale di fusione di filamenti branchiali.

Castelvoturno - Nei campioni raccolti nei pressi della foce del fiume Volturno è stata rinvenuta una situazione simile a quella osservata per i campioni di Castellammare di Stabia.

Gaeta - Negli esemplari campionati sul lungomare Caboto, nei pressi della base americana, è stata osservata una forte iperplasia dell'epitelio, che è risultato fortemente sollevato in pliche; la presenza di numerosi vacuoli, e, relativamente agli altri siti, la maggiore percentuale di alterazione tra i setti dell'emocele.

Ischia - Questi esemplari presentavano una struttura delle branchie con percentuale di istopatologie poco elevata.

Acciaroli - Nelle branchie degli esemplari di tale sito le percentuali di alterazioni istopatologiche sono risultate di gran lunga minore rispetto agli altri

siti e per ciò che concerne la presenza di vacuoli, alterazione dei setti dell'emocele e fusione dei filamenti non sono state osservate.

Nella tabella 5.1 sono riportate le principali alterazioni istologiche osservate a carico delle branchie negli individui provenienti da tutti i siti di campionamento.

Tabella 5.1. Località, numero (n) e percentuale dei diversi tipi di alterazione istopatologica a livello delle branchie rinvenute negli individui di *Patella caerulea*, campionati da Dicembre 2006 a Febbraio 2007.

Località	n	coartazione e sollevamento in pliche dell'epitelio (swelling)	iperplasia dell'epitelio	vacuoli tra le cellule epiteliali	alterazione dei setti dell'emocele	fusione di filamenti	alterazioni nucleari (ipocolarazione, picnosi)
Pozzuoli	10	80%	100%	60%	0%	20%	40%
C.mare di Stabia	10	80%	80%	100%	0%	40%	40%
Gaeta	8	100%	100%	75%	25%	0%	25%
Mergellina	10	50%	100%	20%	0%	0%	20%
Castelvoturno	8	75%	100%	100%	0%	40%	40%
Ischia	6	33%	50%	0%	33%	0%	33%
Acciaroli	9	77%	77%	33%	0%	0%	0%

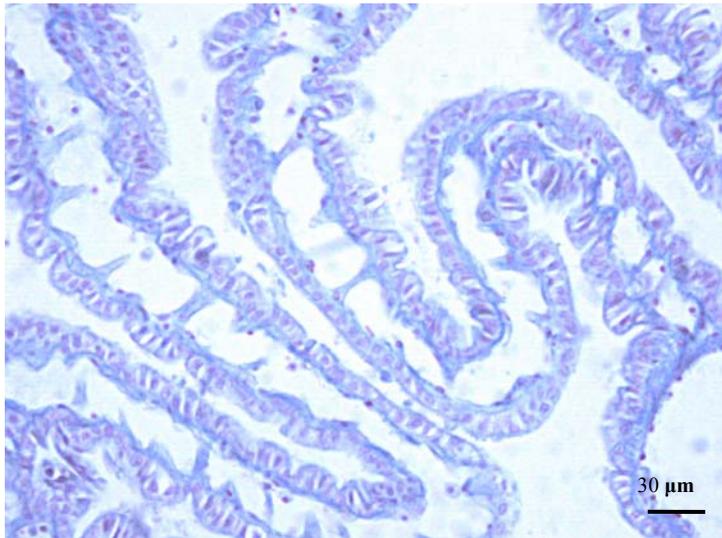


Fig. 5.1. Sezione istologica di branchia di individuo di Ischia. Colorazione tricromica Azan Mallory. La presenza e distribuzione del tessuto connettivo è evidenziata dal colore azzurro turchese.

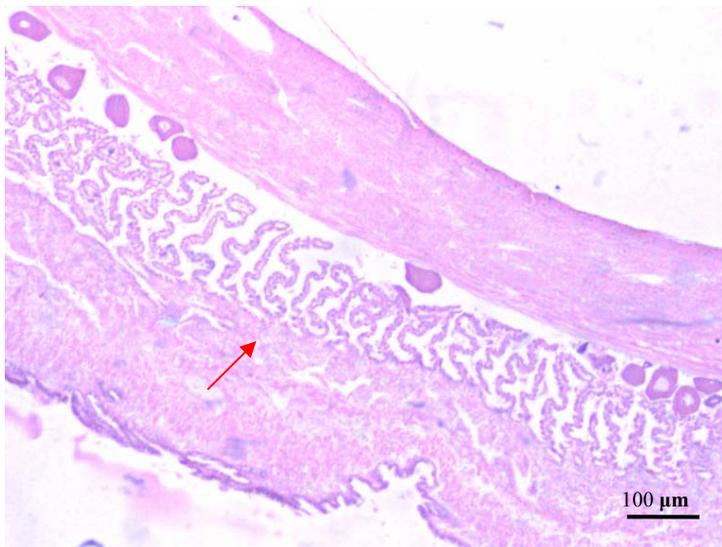


Fig.5.2. Sezione istologica di branchia dell'individuo di Acciaroli. Colorazione E. Eosina. Si notano i filamenti branchiali come estroflessione del mantello (indicati dalla freccia rossa).

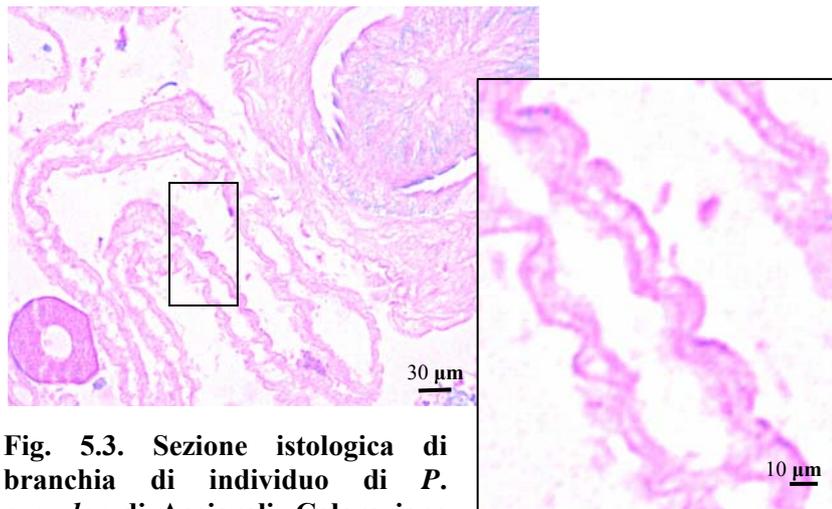


Fig. 5.3. Sezione istologica di branchia di individuo di *P. caerulea* di Acciaroli. Colorazione AB+PAS.

Si nota una forte PAS positività sul margine libero dell'epitelio branchiale e sulla membrana basale. Solo alcune aree del mantello sono AB positive. Nel riquadro a destra è riportato un ingrandimento dell'area riquadrata a sinistra.

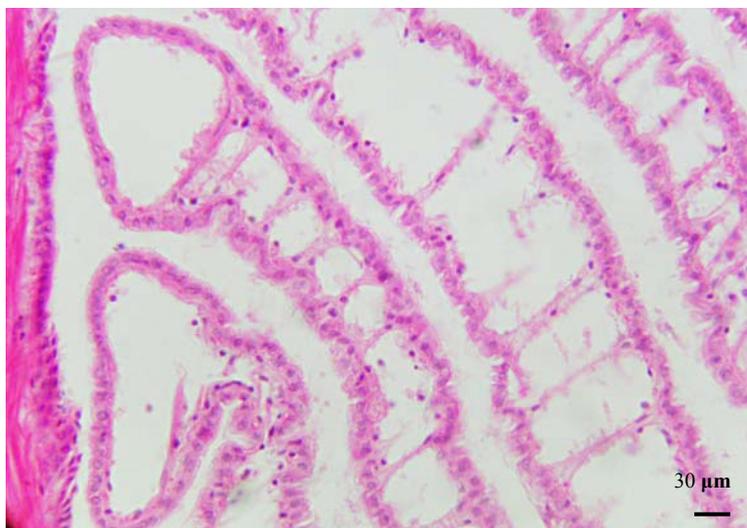


Figura 5.4. Sezione istologica di branchia di individuo di Acciaroli. Colorazione E. eosina. Epitelio normale.

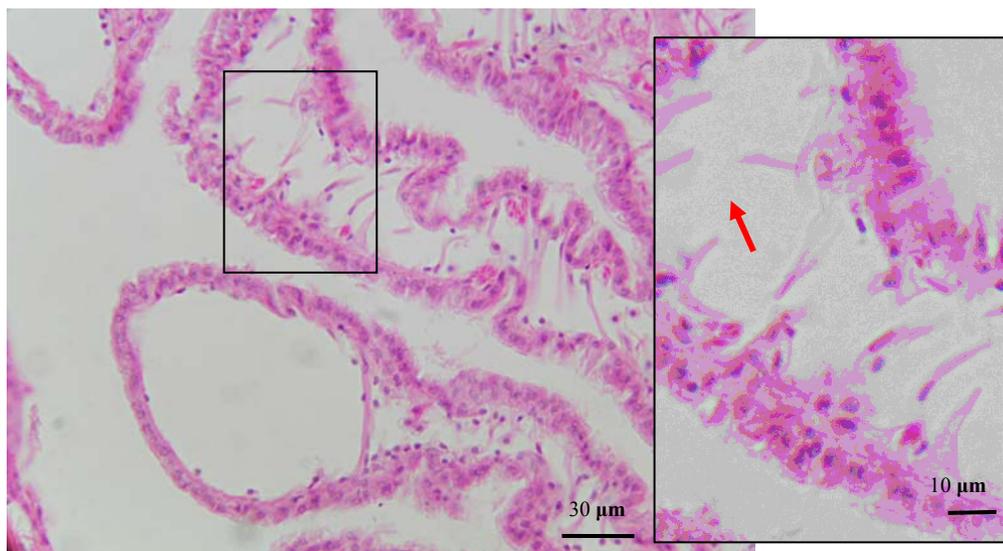


Figura 5.5. Sezione istologica di branchia dell'individuo di Gaeta. Colorazione E. eosina. Alterazione dei setti connettivali dell'emocele. L'area selezionata è riportata nell'ingrandimento a destra. La freccia indica un setto connettivale disgregato.

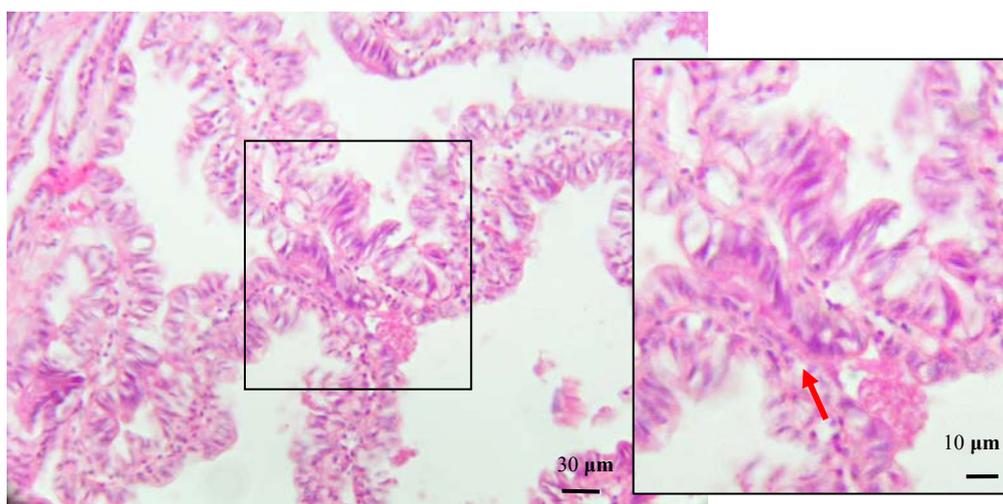


Figura 5.6. Sezione istologica di branchia dell'individuo di C. Mare di Stabia. Colorazione E. eosina. Fusione dei filamenti. L'area selezionata è riportata nell'ingrandimento a destra indica una fusione tra filamenti (freccia).

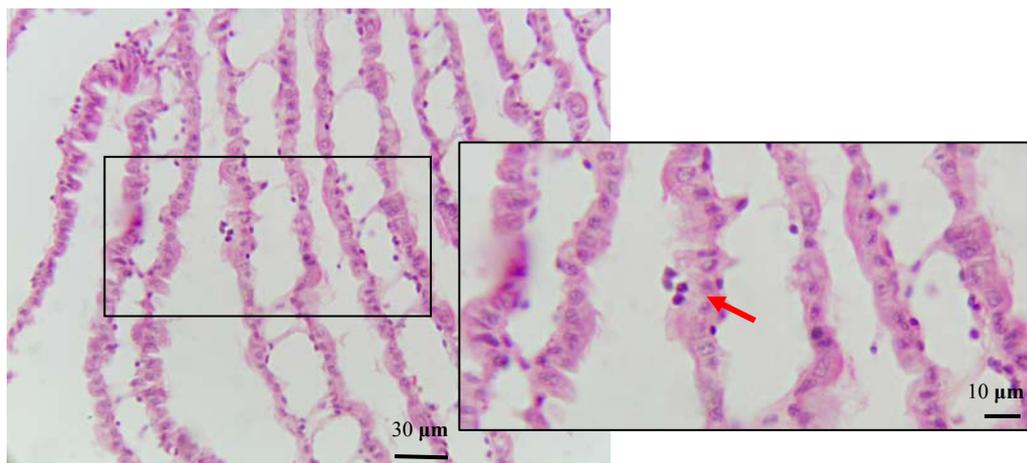


Figura 5.7. Sezione istologica di branchia dell'individuo di Pozzuoli. Colorazione E. eosina. Alterazioni nucleari. L'area selezionata è riportata nell'ingrandimento a destra, sono visibili nuclei picnotici (freccia).

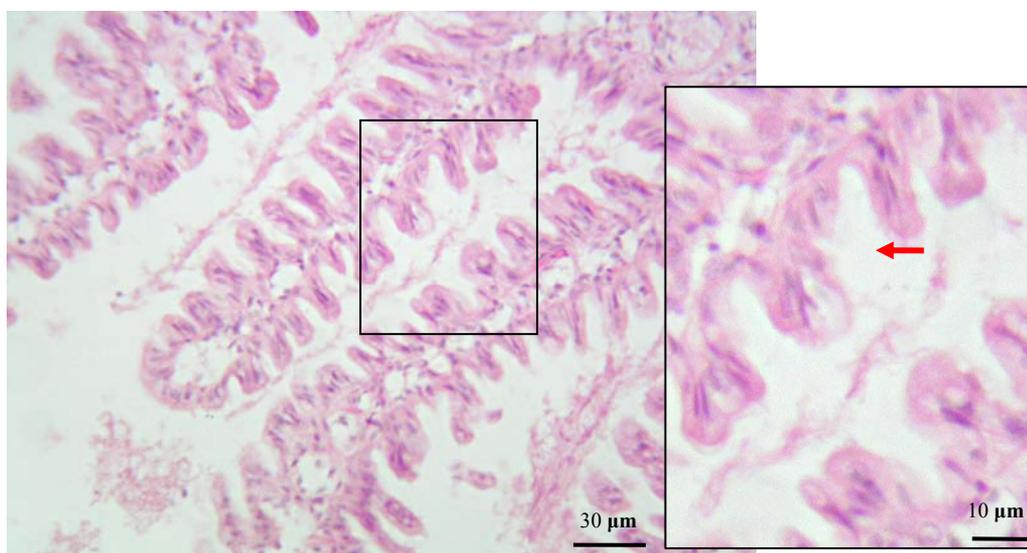


Figura 5.8. Sezione istologica di branchia dell'individuo di Pozzuoli. Colorazione E. eosina. Sollevamento in pliche (*swelling*) dell'epitelio branchiale. A destra nell'ingrandimento dell'area riquadrata è mostrato il sollevamento dell'epitelio (freccia).

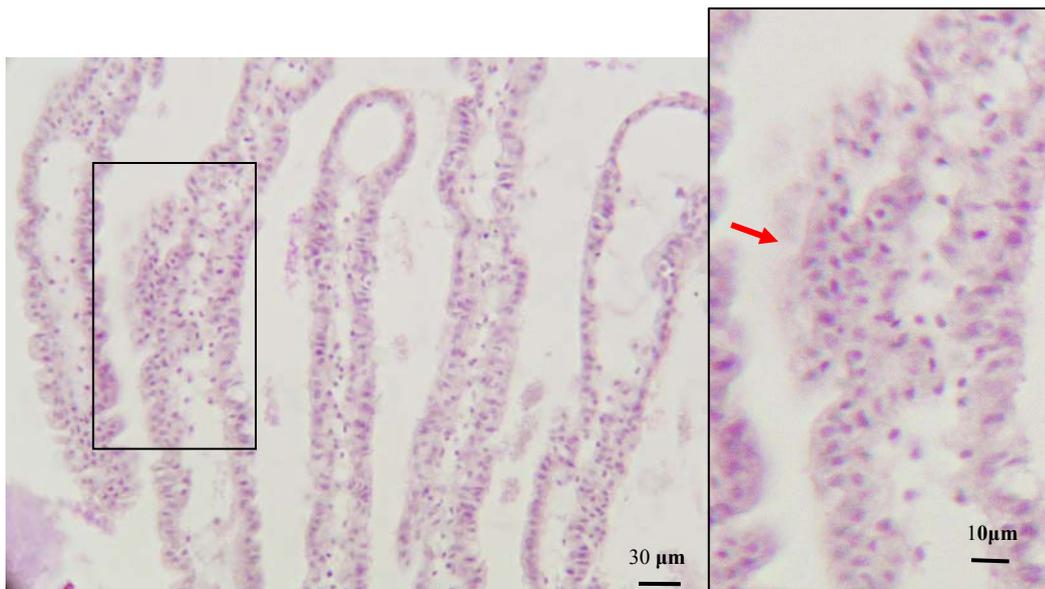


Figura 5.9. Sezione istologica di branchia dell'individuo di Acciaroli. Colorazione E. eosina. Iperplasia dell'epitelio. A destra, nell'ingrandimento dell'area riquadrata è mostrato l'ispessimento dell'epitelio (freccia).

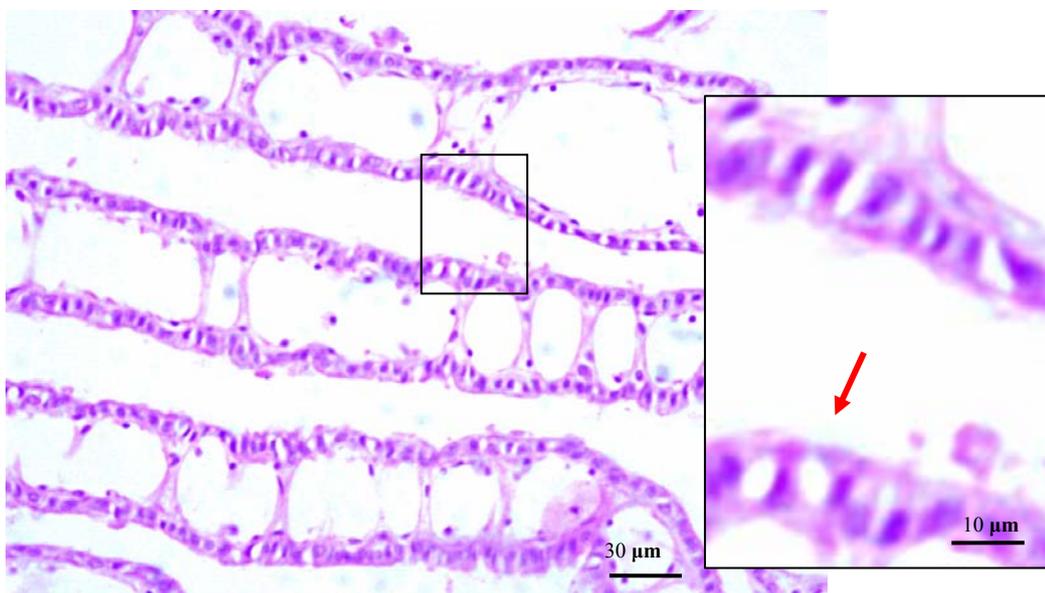


Figura 5.10. Sezione istologica di branchia dell'individuo di Pozzuoli. Colorazione E. eosina. Presenza di vacuoli. L'inserto a destra riporta un maggior ingrandimento dell'area selezionata in cui si possono notare vacuoli citoplasmatici (freccia).

5.1.3. Risultati del Test TUNEL.

I risultati ottenuti dal test TUNEL, eseguito sulle branchie degli esemplari di siti inquinati (Pozzuoli e Castellammare di Stabia), per i quali l'analisi morfologica mostrava alterazioni nucleari e in quelli del sito di riferimento di Acciaroli hanno confermato quanto riportato per le analisi istopatologiche. Negli esemplari dei siti inquinati nell'epitelio branchiale il numero di nuclei positivi è risultato superiore a quello del sito di riferimento, mentre non sono state osservate differenze nel numero di nuclei positivi al test tra gli individui dei due siti inquinati. Inoltre, sono risultate positive alcune cellule dei setti connettivali che delimitano gli spazi emocelici e diversi emociti (Figure 5.11, 5.12).

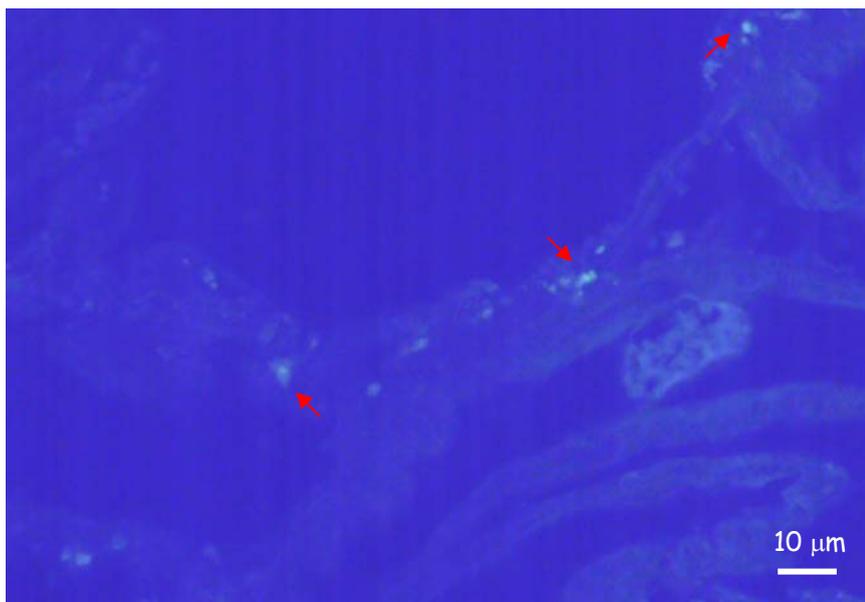


Figura 5.11 Sezione istologica di branchia di individuo di Pozzuoli. Reazione TUNEL con fluoresceina.

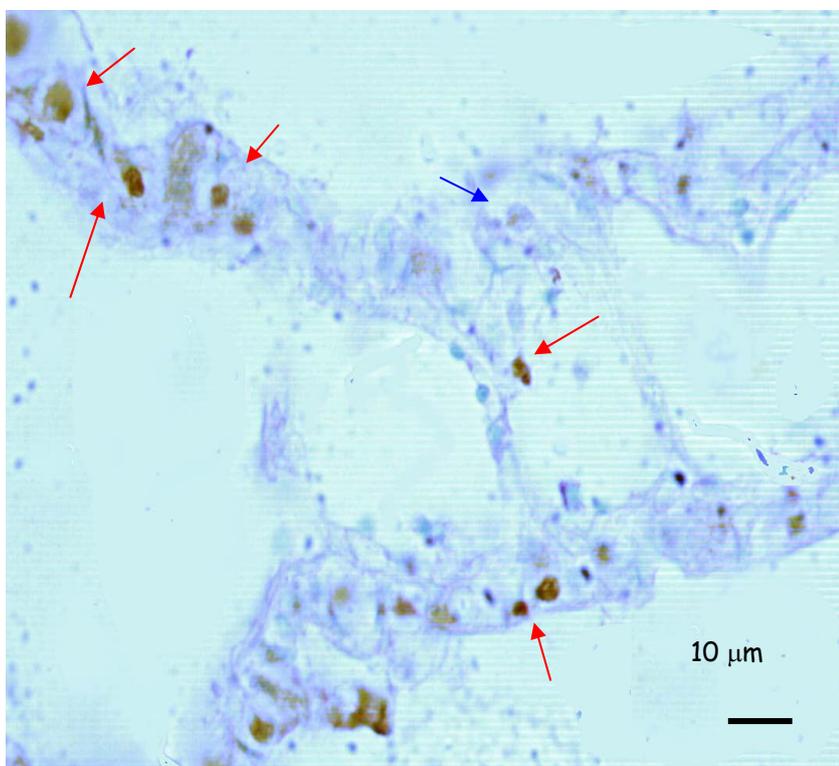


Figura 5.12 Sezione istologica di branchia di individuo di Castellammare di Stabia. Reazione TUNEL con DAB. Le frecce rosse indicano nuclei TUNEL positivi, quella blu indica un nucleo nella norma.

5.2. Analisi delle frequenza delle aberrazioni cromosomiche in gonadi di *Patella caerulea*

Tale indagine è stata effettuata durante il periodo riproduttivo da dicembre a fine febbraio, periodo in cui sono stati ottenuti i cromosomi dal materiale gonadico. Vari tipi di riarrangiamenti cromosomici sono stati osservati nelle piastre cromosomiche dei campioni dei siti presunti inquinati o disturbati. I riarrangiamenti osservati variavano da semplici lesioni (*gaps*) mono- o dicromatidiche su uno più cromosomi (Figura 5.14 A) a piastre con vari o tutti gli elementi frammentati (Figura 5.14 B). La frequenza delle aberrazioni è risultata di pari entità nei siti di Gaeta e di Castellammare di Stabia, dove erano rappresentati con uguale entità, e più alta rispetto a quella degli altri due siti, Pozzuoli e Mergellina. In tutti i siti inquinati sono state rinvenute anche piastre aneuploidi con diciassette elementi (15 a due braccia e due telocentrici) (Figura 5.15 A). La ricostruzione dei relativi cariotipi ha evidenziato che l'extra elemento metacentrico derivava dalla fusione centrica di due elementi telocentrici (Figura 5.15 B). Nelle piastre cromosomiche degli esemplari del sito di riferimento le aberrazioni cromosomiche erano di una frequenza molto più bassa rispetto a quella rinvenuta nei siti inquinati. Inoltre, le aberrazioni riguardavano essenzialmente lesioni monocromatidiche. Il tipo di riarrangiamento e la loro frequenza negli individui dei siti inquinati/disturbati e di quelli di riferimento sono riportati nelle tabelle 5.2 e 5.3. La frequenza per individuo e per tipo di aberrazione sono riportate nelle tabelle II.1-II.5 in appendice II.

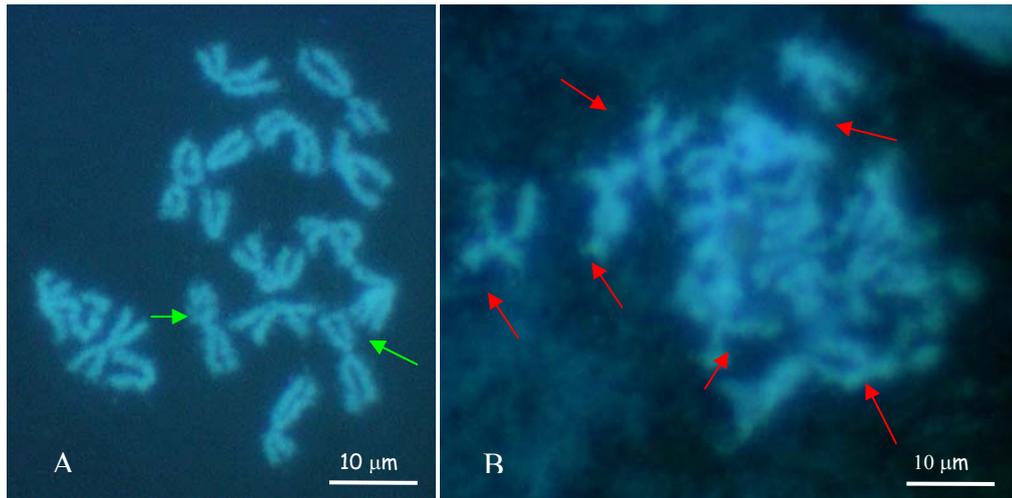


Figura 5.13. Lesioni cromosomiche (frece) in *P. caerulea*. Piastra metafasiche di esemplare di Mergellina(A) e di Gaeta (B) colorate con DAPI.

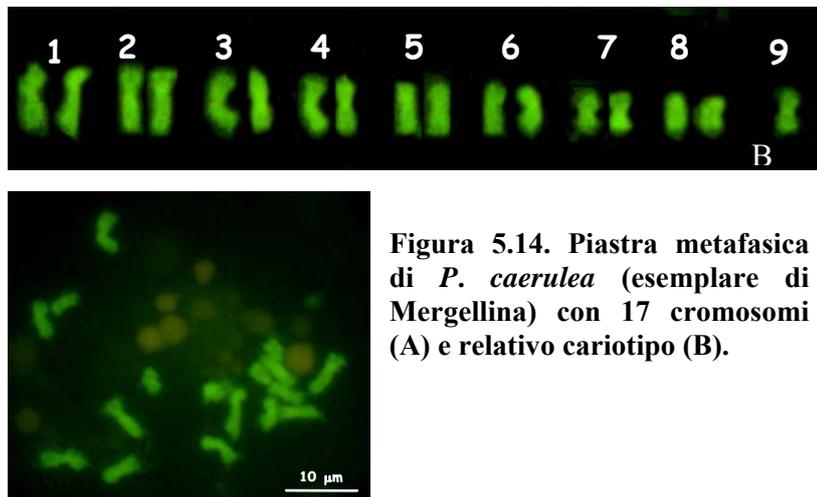


Figura 5.14. Piastra metafasica di *P. caerulea* (esemplare di Mergellina) con 17 cromosomi (A) e relativo cariotipo (B).

Tabella 5.2. Frequenza dei differenti tipi di aberrazioni cromosomiche rinvenute in Dicembre 2006, Gennaio e -Febbraio 2007 nelle piastre cromosomiche degli esemplari dei siti inquinati considerati (Gaeta, Pozzuoli, Mergellina e Castellammare di Stabia) e di quelli del sito di riferimento, Acciaroli. N_i= Numero individui; N_m = numero piastre metafasiche; monocrom= lesioni monocromatidiche; dicrom= lesioni dicromatidiche; P_{crfr}= piastre con cromosomi frammentati; P_{aneup}= Piastre aneuploidi

Località	Dicembre 2006						Gennaio 2007						Febbraio 2007					
	N _i	N _m	Aberrazioni cromosomiche				N _i	N _m	Aberrazioni cromosomiche				N _{ind}	N _{met}	Aberrazioni cromosomiche			
			Lesioni crom.		P _{cr.fram}	P _{aneup}			Lesioni crom.		P _{crfr}	P _{aneu}			Les. cromos		P _{crfr}	P _{aneu}
			monocro	dicromos					monocrom	dicromos					monocrom	dicromos		
Gaeta	12	180	38	18	16	5	14	200	48	26	14	8	12	158	31	15	9	4
			21%	10%	9%	3%			24%	13%	7%	4%			20%	10%	6%	3%
Pozzuoli	10	152	21	14	8	3	12	165	20	17	7	1	10	140	16	11	8	1
			14%	9%	5%	2%			12%	10%	4%	1%			11%	8%	6%	1%
Mergellina	9	140	18	12	5	3	10	150	15	7	7	4	10	150	16	13	6	2
			13%	8%	4%	2%			10%	5%	5%	3%			11%	9%	4%	1%
C.mare di Stabia	12	174	43	19	13	7	12	160	35	14	9	5	10	150	29	16	10	4
			25%	11%	8%	4%			22%	9%	6%	3%			19%	11%	7%	3%
Acciaroli	10	158	7	2	1	1	10	150	5	0	0	0	10	140	6	3	1	0
			4%	1%	0,5%	0%			3%	0%	0%	0%			4%	2%	1%	0%

Tabella 5.3. Frequenza dei differenti tipi di aberrazioni cromosomiche rinvenute da Dicembre 2006-Febbraio 2007 nelle piastre cromosomiche degli esemplari dei siti inquinati considerati singolarmente (Gaeta, Pozzuoli, Mergellina e Castellammare di Stabia) ed in totali in confronto alle aberrazioni rinvenute nello stesso periodo in esemplari del sito di riferimento, Acciaroli. N_i = Numero individui; N_m = numero piastre metafasiche; monocrom= lesioni monocromatidiche; dicrom= lesioni dicromatidiche; $P_{cr.fram}$ = piastre con cromosomi frammentati; P_{aneup} = Piastre aneuploidi

Località	Dicembre 2006 –Febbario 2007					
	N_i	N_m	Aberrazioni cromosomiche			
			Lesioni crom.		$P_{cr.fram}$	P_{aneup}
monocro	dicromos					
Gaeta	38	538	117 22%	59 11%	39 7%	17 3%
Pozzuoli	32	457	57 12%	42 9%	23 5%	5 1%
Mergellina	29	440	49 11%	32 7%	18 4%	9 2%
C.mare di Stabia	32	484	107 22%	49 10%	34 7%	16 3%
totale siti inquinati	131	1919	330 17%	182 9%	114 6%	47 2%
Acciaroli	30	448	18 4%	5 1%	3 0,6%	1 0,2%

6. Discussione

6.1. Indagini sulle alterazioni cromosomiche

Le nuove tecniche messe a punto per valutare le alterazioni a livello cromosomico sono di enorme interesse, in quanto gli adattamenti degli organismi al loro ambiente sono processi fisiologici che hanno base genetica. Pertanto, la comprensione dei cambiamenti che intervengono a livello genetico possono aiutare a definire i cambiamenti più complessi che avvengono a livello di ecosistema (Shugart & Theodorakis, 1996).

Quando l'organismo è esposto ad agenti genotossici, questi possono colpire direttamente il DNA alterandone la struttura e causando effetti mutagenetici che possono essere anche ereditari, a seconda che essi colpiscano cellule somatiche o germinali. Nel primo caso il danno è esclusivamente a carico dell'individuo colpito; nel secondo caso esso è trasmesso alla generazione successiva (Shugart & Theodorakis, 1996), a danno quindi dell'intera popolazione. Va tenuto conto che i due tipi di cellule, somatiche e germinali, possono avere un differente grado di sensibilità agli agenti genotossici.

Gli organismi, quando esposti a tali agenti, possono mettere in atto i meccanismi cellulari preposti alla riparazione del DNA o all'eliminazione dell'agente inquinante. Ad esempio, nei molluschi e nei pesci esposti ad inquinamento ambientale da metalli pesanti è stato dimostrato che ad un aumento di contaminanti, quali cadmio e mercurio, corrisponde sempre un aumento della sintesi di metallotionine, proteine caratterizzate da un'elevata capacità di legare metalli pesanti (Aydemir *et al.*, 2006). Quando la riparazione del DNA fallisce si instaurano mutazioni che possono dar luogo all'attivazione di oncogeni, a disfunzioni proteiche o ad aberrazioni cromosomiche (Shugart & Theodorakis, 1996).

Per convenzione i metodi usati per valutare danni al DNA possono essere suddivisi in due categorie: effetti visibili a livello cromosomico e quelli che

operano a livello di gene. Tale distinzione è artificiale in quanto le due categorie sono strettamente correlate tra loro; tuttavia la divisione ha una utilità pratica, in quanto i metodi per rilevare le aberrazioni cromosomiche sono generalmente differenti da quelli utilizzati per rilevare i cambiamenti a livello molecolare (Dixon & Wilson, 2000).

Le conseguenze dannose delle aberrazioni cromosomiche sono ormai universalmente provate ed includono anomalie congenite, ridotta fertilità e cancro (Dixon & Wilson, 2000).

Attualmente le tecniche disponibili per l'evidenziazione dei danni cromosomici sono numerose. Quelle più frequentemente utilizzate negli invertebrati sono le metodiche mirate a rilevare la frequenza dei micronuclei, la frequenza delle aberrazioni cromosomiche e del ritardo cromosomico in anafase (ponti intercromosomici in anafase).

Il test dei micronuclei si basa sul rilevamento della presenza nelle cellule di frammenti cromosomici, o di interi cromosomi, intracitoplasmatici. Tali corpi citoplasmatici si formano al termine di una divisione cellulare e derivano dalla condensazione di frammenti di cromosomi o di interi cromosomi che, rimanendo indietro nei movimenti anafasici ed essendo esclusi nei due nuclei, originano nelle cellule figlie corpuscoli intracitoplasmatici liberi, generalmente di forma tondeggiante (Dixon & Wilson, 2000). I micronuclei sono pertanto ritenuti indicatori indiretti di aberrazioni cromosomiche strutturali (Castello & Silvestri, 1999). Distinguere, però i micronuclei da altre eventuali inclusioni cellulari, come le placche virali, può essere difficile (Dixon & Wilson, 2000). Inoltre, sorge anche la difficoltà di distinguere tra micronuclei presenti nel citoplasma di cellule neoformate (quindi micronuclei prodotti in conseguenza di stress genomici in atto o recenti) da quelli presenti nel citoplasma di cellule di generazioni precedenti (quindi micronuclei prodotti in conseguenza di stress genomici non recenti).

Negli studi *in vitro*, in particolare sui mammiferi, tale difficoltà viene superata applicando la tecnica del blocco della citochinesi. Le cellule in coltura vengono trattate con la citocalasina B, un inibitore della polimerizzazione dell'actina, che

impedisce la formazione del solco della divisione cellulare con conseguente formazione di cellule binucleate (Castello & Silvestri, 1999).

Per gli invertebrati marini l'allestimento di colture cellulari *in vitro* è molto complesso. Pertanto senza la tecnica del test alla citocalasina B l'analisi dei micronuclei resta soggetta ad errori soprattutto, come frequentemente accade nei molluschi, quando il test dei micronuclei è condotto su preparati da organi che presentano cellule a differente *turnover*, dovuto all'eterogeneità tissutale (Dixon & Wilson, 2000). Infatti il test dei micronuclei, quando applicato a invertebrati marini come ad esempio a larve di echinodermi e cellule ematiche di bivalvi, ha evidenziato un'elevata variabilità inter-individuale (Dixon & Wilson, 2000). Attualmente in assenza di colture *in vitro*, le analisi delle aberrazioni cromosomiche vengono effettuate tramite metodi molecolari, ed in particolare tramite la tecnica della ibridazione *in situ* fluorescente (FISH). Dall'avvento di tale tecnica l'utilizzo dell'analisi dei micronuclei ha subito un forte decremento (Dixon & Wilson, 2000). La FISH prevede l'uso di opportune sonde di DNA che consentono la localizzazione cromosomica di una specifica sequenza di acidi nucleici su preparati sia di cromosomi metafasici, sia di nuclei interfasici, sia di sezioni istologiche. La FISH, ad esempio, è stata utilizzata per lo studio del polimorfismo robertsonian del gasteropode *Nucella lapillus*, rilevandone casi di inversioni centriche che le convenzionali tecniche di colorazione non avevano evidenziato (Dixon & Wilson, 2000).

La tecnica dell'analisi del ritardo cromosomico in piastre cromosomiche anafasiche è stata ampiamente utilizzata in passato negli invertebrati marini (Dixon & Wilson, 2000). Tale metodica consente di rilevare durante l'anafase eventuali ponti cromatinici tra cromosomi dei poli opposti o cromosomi o loro frammenti in "ritardo", ovvero esclusi dalla segregazione ai due poli mitotici. Tale metodica, però, non rileva vari altri tipi di riarrangiamenti cromosomici, quali delezioni, duplicazioni, inversioni, traslocazioni, fissioni, fusioni o *gaps* (Dixon & Wilson, 2000).

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche in piastre metafasiche costituisce il metodo più promettente per il rilevamento diretto delle aberrazioni cromosomiche ed è quello che si è scelto di utilizzare nella presente ricerca,

applicando anche metodi di bandeggio e di FISH con sonde a rRNA. L'analisi delle piastre metafasiche è comunemente impiegata in quanto permette di identificare una vasta gamma di alterazioni cromosomiche e i cromosomi coinvolti, quali ad esempio: cromosomi dicentrici, delezioni, duplicazioni, traslocazioni, inversioni, fusioni, frammentazioni cromosomiche e lesioni cromosomiche (*gaps*). Quest'ultime avvengono in particolari regioni cromosomiche, i cosiddetti "siti fragili", e l'analisi delle piastre metafasiche permette di distinguere tra lesioni mono- e di-cromatidiche. L'analisi delle aberrazioni cromosomiche può essere condotta mediante le classiche tecniche di colorazione topografica (ad esempio utilizzando il colorante Giemsa) o mediante la colorazione di bandeggio (ad esempio C-banding, Ag-NOR banding, fluorocromi specifici per le coppie di basi AT (DAPI, Quinacrine) o GC (CMA₃), le quali, conducendo al sicuro appaiamento degli omologhi, consentono di identificare i cromosomi oggetto di riarrangiamento. La metodica delle aberrazioni cromosomiche in piastre metafasiche richiede un'adeguata esperienza da parte dell'operatore. Il test della frequenza delle aberrazioni cromosomiche in piastre metafasiche è stato applicato anche in invertebrati marini, con un grado di successo differente a seconda degli organismi utilizzati. Per poter applicare tale metodica bisogna, infatti, conoscere il cariotipo dell'animale considerato. Per molti invertebrati marini le informazioni in merito sono assenti o scarse. Bisogna, inoltre, considerare che per tale analisi è necessario ottenerne piastre metafasiche in numero sufficiente e di soddisfacente qualità (è richiesta poca o nessuna sovrapposizione tra i cromosomi). Ciò si ottiene con grande difficoltà nei molluschi. In tali animali, infatti, il *turnover* cellulare è naturalmente basso, e dipende dalla temperatura, stagione, ecc. Per di più, i molluschi, e gli invertebrati in generale, non rispondono ai comuni mitogeni, quali la fitoemoagglutinina, concavalina o pokeweed che sono normalmente usati nei vertebrati per incrementare il numero di cellule in divisione (Dixon & Wilson, 2000). Ciononostante l'analisi delle aberrazioni cromosomiche in piastre metafasiche costituisce il metodo più promettente per il rilevamento diretto delle aberrazioni cromosomiche. L'analisi delle piastre metafasiche permette di identificare una vasta gamma di alterazioni

cromosomiche e i cromosomi coinvolti, quali ad esempio: cromosomi dicentrici, delezioni, duplicazioni, traslocazioni, inversioni, fusioni, frammentazioni cromosomiche e lesioni cromosomiche (*gaps*).

I risultati ottenuti nel corso della presente ricerca evidenziano che nei siti inquinati sono presenti agenti genotossici che agiscono, oltre che sulle cellule della linea somatica, anche sulle cellule della linea germinale di *P. caerulea* e sono pertanto potenzialmente nocivi per le popolazioni ivi residenti. I siti scelti per il prelievo dei campioni nella presente indagine sono aree notoriamente inquinate a causa di scarichi industriali, traffico marino, prodotti derivanti da varie attività umane. I principali inquinanti rilevati in tali siti sono metalli pesanti, quali arsenico, cadmio, cromo, mercurio, piombo, rame, elevate concentrazioni di PCB e IPA.

L'inquinamento derivante dall'attività industriale agricola e dal traffico marittimo può indurre danni citogenetici (Hartwig, 1995). I metalli pesanti possono causare danni genomici, interferendo con i processi di riparazione e replicazione del DNA (Hartwig, 1995), possono quindi intervenire formazione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) (H_2O_2 , O_2^{\cdot} , O_2^-), danni e rotture alla doppia elica del DNA, aberrazioni cromosomiche. Cadmio, nichel, piombo, cobalto ed arsenico possono interferire con i meccanismi di riparazione del DNA anche a basse concentrazioni, concentrazioni non citotossiche (Hartwig, 1995).

In molluschi provenienti da siti in cui sia presente inquinamento da metalli pesanti e PCB (Polychlorinated biphenyls) la frequenza dei micronuclei aumenta di tre volte rispetto a quella rilevata in individui provenienti da siti non inquinati (Dopp *et al.*, 1996).

Nei siti monitorati durante il presente studio le aberrazioni cromosomiche analizzate avvengono con una frequenza (fino al 40%) che è da 5 a 10 volte più alta rispetto al sito di riferimento (circa 4%). Le aberrazioni che avvengono con maggiore frequenza sono le lesioni cromosomiche (*gaps* o siti fragili) sia monocromatidiche (22%) sia dicromatidiche (10%). Studi di confronto sulla frequenza dei siti fragili sono disponibili soprattutto nei vertebrati, pesci (Savage, 2004) e principalmente mammiferi (Yunis & Soreng, 1984) dove in

particolare è risultato che sono filogeneticamente conservati (Shiraishi *et al.*, 2001). Nell'uomo i siti fragili sono stati mappati ed in condizioni di stress replicativi, rappresentano oltre l'80% delle aberrazioni cromosomiche (Glover *et al.*, 1984). Nei mammiferi, comunque, le analisi sono state condotte su cellule in coltura esposte ad agenti genotossici (vedi per esempio McAllister & Greenbaum, 1997; Casper *et al.*, 2002). In *P. caerulea* la frequenza delle lesioni cromosomiche (*gaps*) da noi osservata in natura nei siti inquinati è paragonabile a quella osservata in condizioni sperimentali nei roditori (McAllister & Greenbaum, 1997) e nell'uomo (Casper *et al.*, 2002).

I siti fragili sono una normale componente della struttura cromosomica e rappresentano regioni che mostrano *gaps* o rotture. Tale lesioni sono particolarmente evidenti sui cromosomi metafasici di cellule messe a crescere in condizioni di stress replicativi (e.g. trattamento con aphidicolin, carenza di folato) (Glover *et al.*, 1984). I siti fragili espressi (*gaps* su cromosomi metafasici) rappresentano regioni cromosomiche a singolo filamento non replicato per blocco o collasso della forcina di replicazione durante la fase S (Casper *et al.*, 2002). La presenza di *gaps* rinvenuti sui cromosomi metafasici di cellule cresciute in condizioni normali, indicando che un ristretto numero di queste lesioni cromosomiche in G2 può sfuggire ai “punti di controllo” cellulari. I siti fragili sono “hot spots” per riarrangiamenti cromosomici, quali scambi tra cromatidi fratelli (SCE), traslocazioni e delezioni. Sono siti di integrazione di virus e plasmidi (Rassool *et al.* 1991), e sono coinvolti nella tumorigenesi (Coquelle *et al.*, 1997).

In *Patella caerulea* le lesioni cromosomiche (*gaps*) sono state osservate soprattutto nelle regioni pericentromeriche e peritelomeriche dei cromosomi. Tuttavia non è stato possibile effettuare la loro mappatura, né rilevarne la frequenza per specifico cromosoma. In tale specie i cromosomi di diverse coppie presentano morfologia e lunghezza pressoché simile. Al riguardo non possono essere d'aiuto le colorazioni di G-banding. I cromosomi degli invertebrati, a differenza di quelli dei mammiferi, non sono compartimentalizzati in regioni ricche in AT (bande G scure) o in GC (bande G chiare) (Sumner, 1994a,b). Pertanto, in tali organismi, generalmente, le

colorazioni di G-banding sono inefficaci (Odierna *et al.*, 1993). In *Patella caerulea*, inoltre, per l'identificazione dei singoli cromosomi sono risultate inefficaci anche le colorazioni per evidenziare la dislocazione e composizione dell'eterocromatina. Tale materiale genomico è risultato contenere sequenze ricche in AT o GC e distribuito sui centromeri di tutti cromosomi. Solo le colorazioni per i loci NORs (Ag-NOR, CMA₃ e NOR-FISH) hanno consentito di discriminarne inequivocabilmente i cromosomi della prima coppia da quelli delle altre coppie, in quanto su di essi sono localizzati i cistroni ribosomiali. L'applicazione di altre sonde molecolari per definiti loci potrà essere d'aiuto nell'univoca identificazione di specifiche coppie di cromosomi di *P. caerulea*.

6.2. Indagini sulle alterazioni a carico delle branchie

Quando i danni indotti al genoma non possono essere riparati o in qualche modo bilanciati, le cellule eucariotiche possono innescare dei processi che conducono alla morte cellulare (morte cellulare programmata o apoptosi). Il fenomeno dell'apoptosi è fondamentale in tale contesto in quanto protegge l'organismo, esposto a differenti contaminanti, da effetti cancerogeni o teratogeni. In letteratura è noto che gli xenobioti inducono apoptosi in diversi tipi cellulari. I cambiamenti morfologici, biochimici e biomolecolari associati ai processi apoptotici sono noti e ben studiati (Wyllie, 1981; Wyllie *et al.*, 1973; Rotello *et al.*, 1989). Le cellule in apoptosi possono essere evidenziate attraverso numerose metodiche istologiche, biochimiche e biomolecolari, rilevando tramite la loro frequenza il grado di tossicità o i livelli di esposizione ai diversi inquinanti, quali ad esempio erbicidi e pesticidi.

Durante le fasi precoci del processo apoptotico a livello nucleare si osserva il taglio della cromatina in frammenti multipli di 180-200 bp, lunghezza che corrisponde ai tratti di DNA internucleosomale. Questi frammenti possono essere evidenziati attraverso tecniche molecolari, quali:

- l'estrazione di DNA dalle cellule oggetto di studio e successiva evidenziazione dei frammenti tramite elettroforesi su gel di agarosio;

- il COMET test, noto anche come SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis), in cui singole cellule, imbibite in gel di agarosio su di un vetrino per microscopia, in seguito a lisi cellulare, denaturazione alcalina del DNA e colorazione con ioduro di propidio, assumono l'aspetto di una "cometa" con la testa contenente DNA intatto e la coda costituita da DNA danneggiato (frammenti di DNA a singola e a doppia elica) e,

- il saggio TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP Nick End Labeling), che si basa sulla capacità di una terminal transferasi di aggiungere dUTP all'estremità del DNA frammentato. I dUTP aggiunti possono essere marcati, in genere con FITC (Fluoresceinaiso tio cianato), e quindi rilevati al microscopio a fluorescenza o evidenziati da anticorpi anti-dUTP marcati con perossidasi, la cui attività è evidenziata con DAB (Diaminobenzidino). Quanto maggiore sarà il grado di frammentazione tanto più evidente risulterà la marcatura.

La metodica dell'estrazione ed elettroforesi del DNA e quella del COMET assay si applicano su singole cellule di una data linea cellulare (eritrociti, linfociti, emociti) o da cellule in coltura mentre per i tessuti (in presenza quindi di una eterogeneità cellulare) si preferisce utilizzare il saggio TUNEL.

Nel presente studio su *P. caerulea*, in cui la quantità di fluidi ematici è scarsa oltre che di difficile prelievo, si è scelto di effettuare l'analisi dello stress genomico nella linea somatica eseguendo, su sezioni di branchie, le reazioni della TUNEL, per saggiare la presenza di fenomeni apoptotici in alcuni individui per il quali l'analisi cito- isto- patologica mostrava alterazioni nucleari.

L'epitelio branchiale di *Patella caerulea*, analogamente a tutte le superfici impegnate in scambi gassosi, è costituito da un epitelio semplice con una complessità strutturale minore rispetto a quello delle branchie dei bivalvi. Le branchie dei bivalvi, o ctenidi, sono costituite da filamenti (principali e secondari) rivestiti da epitelio monostratificato, in cui si rinvengono anche cellule ciliate e mucociti: tale organizzazione è correlata al fatto che, in tali molluschi, gli ctenidi sono implicati, oltre che negli scambi gassosi, anche nel movimento delle particelle alimentari (Beninger *et al.*, 1988; Dufour & Beninger, 2001). Le branchie di *Patella* derivano da estroflessioni secondarie

del pallio (per questo sono dette anche branchie secondarie o palliali) e sono deputate essenzialmente alla funzione respiratoria: in questi animali, infatti, l'assunzione di cibo avviene per mezzo della bocca che contiene la radula. Per la loro struttura di base, esistono analogie con il filamento secondario delle branchie dei pesci Teleostei (Hughes & Grimstone, 1965; Machado & Fanta, 2003) e con le branchie dei Crostacei (Pike, 1947; Bhavan & Geraldine., 2000). In *Patella*, i filamenti branchiali hanno epitelio tendenzialmente cubico e l'emocele è suddiviso in concamerazioni (spazi emocelici) da setti connettivali contenenti emociti. Anche i filamenti branchiali dei Teleostei presentano epitelio semplice, sebbene tendenzialmente squamoso, e setti connettivali che delimitano spazi vascolari contenenti i diversi elementi figurati del sangue. Per la loro preminente funzione respiratoria e una probabile funzione osmoregolativa (Nuwayhid *et al.*, 1978) esistono analogie tra le branchie di *Patella* e quelle dei pesci ossei anche dal punto di vista funzionale.

Una gran varietà di risposte infiammatorie a livello delle branchie, come sollevamento in pliche dell'epitelio branchiale, assottigliamento dell'epitelio branchiale, iperplasia dell'epitelio, fusione delle lamelle branchiali, sono stati documentati in numerose specie di pesci esposti ad inquinanti (ad esempio insetticidi) (Nowak, 1992), così come nei crostacei, nei quali è stato anche osservato l'incremento e l'accumulo di emociti negli spazi emocelici (Bhavan & Geraldine, 2000).

Nei pesci lo studio delle alterazioni cito- isto-patologiche a carico delle branchie, utilizzando la classificazione convenzionale dei fenomeni patologici generali, è stato condotto soprattutto in specie d'acqua dolce sia in condizioni sperimentali (esposizione a mirati agenti citotossici) sia in natura. Randi e coautori (1996) sul teleosteo d'acqua dolce, edibile, *Macropsorbycan uruguayanael*, in seguito ad esposizioni al cadmio osservarono a carico delle branchie numerose alterazioni istopatologiche, quali iperplasia dell'epitelio primario e secondario, la separazione dell'epitelio branchiale, necrosi e ipertrofia dell'epitelio respiratorio, telangiectasia delle lamelle, iperplasia delle cellule a cloro e infiltrazioni di cellule infiammatorie. Arellano e coautori (1999) evidenziarono che le branchie del teleosteo *Solea senegalensis*, in seguito ad

esposizione al rame mostravano frequenti alterazioni, quali fusione delle lamelle, iperplasia, rotture dei capillari e rilascio di eritrociti. Bhagwant & Elahee (2002) nelle branchie in varie popolazioni naturali di due teleostei edibili *Mulloidichthys flavolineatus* e *Mugil cephalus*, provenienti da siti inquinati (lagune delle isole Mauritius, in cui si riversano scarichi di industrie tessili), osservarono numerose alterazioni tessutali, quali la dilatazione ed l'iperemia delle lamelle, l'ipertrofia delle cellule sia dei filamenti e sia delle lamelle. Koca e coautori (2005) in popolazioni naturali di un percifome d'acqua dolce, *Lepomis gibbosus*, provenienti da un fiume della Turchia, in cui si riversano scarichi di industrie tessili, cementiere e di zucchero, osservarono varie alterazioni cito-istopatologiche a carico delle branchie, quali iperplasia e fusione delle lamelle secondarie, sollevamento in pliche dell'epitelio, presenza di necrosi e picnosi.

Lo studio delle alterazioni cito-isto-patologiche a carico delle branchie è stato di recente condotto anche su alcune specie di molluschi bivalvi e gasteropodi mediterranei, tra i quali *P. caerulea* (Bresler *et al.*, 1999, 2003a). In particolare, Bresler e coautori (2003a) hanno effettuato uno studio su esemplari israeliani di *P. caerulea*, provenienti da Shemen, sito inquinato per intenso trasporto marittimo, e da Rosh Haniqra e Cesarea, siti di riferimento. Gli esemplari del sito inquinato presentavano un'elevata percentuale (84%) di alterazioni cito-istopatologiche quali: sollevamento in pliche dell'epitelio (*swelling*), strutture granulari nel citoplasma, vacuoli citoplasmatici, alterazioni nucleari quali segni di morte cellulare, picnosi e perdita di nuclei. Nelle branchie degli esemplari provenienti dai siti di riferimento, invece, gli autori hanno osservato solo il ripiegamento dell'epitelio e la presenza di pochi vacuoli, peraltro in un ridotto numero di esemplari (30%).

Le percentuali, rilevate nel corso della presente ricerca, per tali istopatologie, nei siti inquinati sono confrontabili con quelle riportate per *P. caerulea* da Bresler e coautori (2003a) e per i teleostei (Bhagwant & Elahee, 2002; Koca *et al.*, 2005) (cfr. Tabella 3.3). Per il sito di riferimento, le percentuali di istopatologie riportate da Bresler e coautori (2003a) sono ancora più basse di quelle qui riscontrate.

In aggiunta a tali cito- isto-patologie nella presente ricerca sono stati osservati anche altri tipi di alterazione (iperplasia dell'epitelio, alterazione dei setti dell'emocele e fusione dei filamenti – vedi Tabella 3.3), alcune delle quali possono essere incluse nei parametri da valutare negli studi delle istopatologie da stress sulle branchie. E' da considerare che alcuni tipi di cito-istopatologie, quali *swelling*, presenza di vacuoli, iperplasia dell'epitelio, si ritrovano in esemplari sia di siti inquinati sia di riferimento, anche se con percentuali maggiori in esemplari provenienti da questi ultimi siti. Probabilmente, tali variazioni sono riconducibili a normali attività fisiologiche. Altri tipi di alterazioni istopatologiche, quali disgregazione dei setti connettivali dell'emocele, fusione dei filamenti e alterazioni nucleari sono state rinvenute solo in esemplari di siti inquinati e pertanto da utilizzare quali indicatori di stress ambientale. E' altresì da evidenziare che il grado ed il tipo di lesione rinvenuti nelle branchie degli esemplari provenienti da Castellammare di Stabia, in prossimità della foce del fiume Sarno sono paragonabili a quelle rinvenute nelle branchie dei teleostei in seguito ad esposizione a metalli, quali cadmio (Randi *et al.*, 1996) o rame (Arellano *et al.*, 1999).

Nel corso della presente indagine, è stato, inoltre, condotto, sulle cellule branchiali, il test TUNEL, per saggiare la presenza di fenomeni apoptotici in individui per i quali l'analisi morfologica mostrava alterazioni nucleari. Le reazioni TUNEL hanno evidenziato che nelle branchie gli agenti inquinanti hanno prodotto danni al DNA, oltre a modifiche morfologiche, sono avvenute, quindi, anche alterazioni genomiche. Come riferito nelle precedenti sezioni dalle branchie non sono state ottenute piastre cromosomiche in metafase, sono state rinvenute solo poche cellule (due –tre per vetrino) in prometafase. Ciò evidenzia un basso *turnover* cellulare, fenomeno che è inusuale in un normale epitelio branchiale. Nel nostro caso, ovvero di un epitelio sottoposto a condizioni ambientali di stress, un limitato *turn-over* cellulare potrebbe spiegare l'elevato numero di vacuoli osservati. Per tale ipotesi non è stato ritenuto proficuo effettuare verifiche mediante test di incorporazione della Bromodeossiuridina (BrdU). La tecnica BrdU non trova, infatti, applicazione nello studio di aberrazioni cromosomiche nelle popolazioni naturali. Tale analogo

della Timida viene incorporata al posto di quest'ultima, nel DNA durante la fase S. La BrdU incorporata viene poi rilevata mediante anticorpi anti- BrdU opportunamente marcati. La BrdU può essere incorporata in “*vivo*” se iniettata insieme alla flurodeossiuridina (FdU) (Almeida-Toledo, *et al.*, 1988) ma quest'ultima è un potente agente genotossico, capace di indurre un gran numero di aberrazioni cromosomiche (Yunis & Soreng, 1984).

Organi bersaglio, come fegato e branchie, sono tessuti metabolicamente attivi, essi sono capaci di accumulare elevate concentrazioni di metalli pesanti, come osservato in studi sperimentali *in vivo* (Allen, 1994). Negli organismi acquatici le branchie rappresentano un organo vitale. Esse giocano un ruolo importante nel trasporto dei gas respiratori e regolano il bilancio ionico e osmotico. Le sostanze tossiche possono causare danni ai tessuti branchiali, riducendo lo scambio di ossigeno e compromettendo l'osmoregolazione. La severità dei danni alle branchie dipende sia dalle concentrazioni degli agenti tossici che dal periodo di esposizione a tali agenti (Oliveira Ribeiro *et al.*, 1996). Condizioni di tossicità ambientale possono dare luogo, in tessuti ed organi, a due tipi di cambiamenti strutturali. Uno è rappresentato dagli effetti tossici diretti degli inquinanti, che conducono a degenerazione e necrosi. L'altro tipo è rappresentato dallo sviluppo di meccanismi compensatori, come l'iperplasia, che sono in relazione con l'inquinante ambientale (Hughes & Perry, 1976; Bhagwant & Elahee, 2002). Nei pesci la fusione delle lamelle secondarie, riducendo la superficie totale, può causare un decremento nello scambio libero dei gas, minacciando la salute dell'animale (Skidmore & Tovell, 1972). La presenza di rigonfiamenti, osservati nei filamenti branchiali dei pesci, può essere considerata una trappola ionica per metalli-traccia e favorisce l'adesione tra le lamelle secondarie vicine. Ciò potrebbe proteggere l'epitelio dai meccanismi di abrasione ed infezioni (Olson & Fromm, 1973). La presenza di leucociti indica una reazione infiammatoria ed infiltrazione cellulare, quindi riflette una risposta immunologica dell'animale ai contaminanti ambientali (Tao *et al.*, 2000). Nelle branchie la distensione ed il ripiegamento dell'epitelio potrebbero essere correlati al decremento dell'attività della pompa Na-K e/o al decremento nel sangue delle concentrazioni di Na e Cl (Neiboer & Richardson, 1980). La

distensione, il ripiegamento, l'iperplasia dei setti dell'epitelio, possono servire, quindi, come meccanismi di difesa per incrementare la distanza tra gli irritanti trasportati dall'acqua e la circolazione sanguigna (Mallat, 1985; Evans, 1987).

7. Conclusioni

I cambiamenti strutturali che si osservano nei tessuti e negli organi in condizioni di tossicità ambientale sono di due tipi: uno è rappresentato dagli effetti tossici diretti degli inquinanti, che conducono a degenerazione e necrosi; l'altro tipo è rappresentato dallo sviluppo di meccanismi compensatori, che sono in relazione con l'inquinante ambientale (Hughes & Perry, 1976; Bhagwant & Elahee, 2002).

Entrambi i tipi di cambiamenti strutturali sono stati osservati nelle branchie di *Patella caerulea* sia nel corso della presente indagine che in quella condotta da Bresler e coautori (2003a) in esemplari dei siti inquinati. Nelle branchie di tali individui sono state, infatti, osservate alterazioni cito-istopatologiche, quali il sollevamento in pliche (*swelling*) dell'epitelio, l'iperplasia e la fusione dei setti, che possono essere inquadrati nell'ambito dei cambiamenti strutturali legati ai meccanismi compensatori in relazione con gli inquinanti ambientali. Tali cambiamenti strutturali, infatti, incrementano lo spessore delle lamine branchiali e conseguentemente la distanza tra l'agente inquinante ed il sottostante emocele. I restanti tipi di alterazioni osservati (la presenza di vacuoli, la disgregazione dei setti dell'emocele, le alterazioni nucleari) possono essere inquadrati nell'ambito dei cambiamenti strutturali legati agli effetti tossici diretti degli inquinanti che conducono a degenerazione e necrosi.

Entrambi i tipi di alterazioni patologiche rinvenute nelle branchie di *P. caerulea* sono già state documentate, sia in studi sperimentali sia in studi di campo, nelle branchie di numerose specie di pesci (Randi *et al.*, 1996; Arellano *et al.*, 1999; Bhagwant & Elahee, 2002; Koca *et al.*, 2005) esposti a diversi contaminanti, quali ad esempio rame e cadmio.

Gli esemplari di *P. caerulea* qui esaminati provenienti dai siti inquinati presentavano nelle cellule gonadiche lesioni cromosomiche ad una frequenza

comparativamente più elevata rispetto agli esemplari di riferimento. Analogamente, in esemplari di popolazioni naturali dei gasteropodi *Viviparus ater*, *V. mamillatus*, *V. contectus*, *V. acerosus*, *V. viviparus* e nel bivalve *Anodonta cygnea* viventi in ambienti inquinati d'acqua dolce, Baršienė (2003) e Baršienė & Bučinskienė (2001) hanno osservato una più alta incidenza di danni cromosomici. I ricercatori hanno correlato le aberrazioni osservate all'azione di composti genotossici, in particolare ai metalli pesanti ed ai bifenilipoliclorinati (PCB). È noto, infatti, che i metalli pesanti come Cr, Ni, Co, Cd e Fe sono agenti genotossici e conducono alla formazione di forme reattive dell'ossigeno (ROS), i quali provocano danni ossidativi al DNA, ed interferiscono con gli enzimi della riparazione e replicazione (Hartwig, 1995), inoltre As e Hg sono veleni che agiscono sul fuso mitotico producendo effetti aneugenici e portando come risultato ad aberrazioni cromosomiche (Kirsch-Volders, 1986). Alte concentrazioni di PCB ed altri inquinanti organici inducono la formazione di micronuclei (Dopp *et al.*, 1996).

Nei siti inquinati esaminati nel presente studio è riportata la presenza di metalli pesanti e di inquinanti organici. È noto che gli organismi esposti a tali inquinanti attuano una serie di complesse risposte morfologiche, fisiologiche e molecolari, collettivamente denominate “fan-shaped response” (Sanità di Toppi & Gabrielli, 1999). Le alterazioni cito-istopatologiche e genomiche rivenute a livello sia delle branchie che delle gonadi di *P. caerulea* qui studiate possono essere considerate quali “fan-shaped response” agli inquinanti.

Va tenuto conto che i due tipi di cellule, somatiche e germinali, possono avere un differente grado di sensibilità agli agenti genotossici e possono essere sensibili a diversi tipi di inquinanti. Ciò può giustificare la differenza nelle frequenze nei vari siti delle lesioni rinvenute, tra le gonadi e le branchie. Inoltre ciò può anche giustificare le differenti percentuali di istopatologie osservate nelle branchie di *P. caerulea* tra gli esemplari qui esaminati e quelli studiati da Bresler e coautori (2003a) per i siti inquinati e di riferimento.

Allo scopo di verificare una possibile correlazione tra i diversi danni osservati negli individui oggetto di questo campionamento e i siti di raccolta è stata

calcolato, per ciascun danno osservato la proporzione del numero di individui per ogni sito (espressa sul numero di individui campionati in quella località; Tabella 7.1). Tali valori sono stati trattati con un'analisi delle componenti principali (PCA) allo scopo di ridurre il numero di variabili da considerare e tentare di correlarle tra di loro, evidenziando un eventuale trend.

La PCA ha rilevato tre componenti che nel loro complesso spiegano il 93% della varianza dei dati. In particolare, la componente 1 raggruppa tutti i danni cromosomici e le alterazioni nucleari alle branchie; la componente 2 raggruppa alterazioni dei setti branchiali e swelling dell'epitelio branchiale, mentre la terza raggruppa altri danni a carico delle branchie (fusione dei setti, iperplasia dell'epitelio, presenza di vacuoli tra le cellule epiteliali delle branchie; (Tabella 7.2).

I risultati ottenuti dalla PCA sono stati trattati con una successiva analisi dei clusters per evidenziare eventuali correlazioni tra i danno osservati e i siti.

Effettivamente, come mostrato in Figura 7.1, è risultato evidente una forte correlazione (raggruppamento) tra i danni rilevati nei siti di Mergellina e Pozzuoli. Ad essi risultano associati quelli osservati negli animali raccolti a Castellammare di Stabia.. I siti di Gaeta ed Acciaroli risultano, invece, disallocati da questo gruppo e sono da considerarsi come outliers.

Sulla base dei dati disponibili (ARPAC Si.Di.Mar. per il 2001-2004 e Legambiente 2004) per la Campania, i siti di Sarno, Mergellina, Volturno risultano essere caratterizzati da una maggiore criticità ambientale. Ciò sembrerebbe essere in accordo con i raggruppamenti evidenziati in figura 7.1. La zona della foce Sarno presenta i valori peggiori per l'indice TRIX (indice di trofia) e l'indice CAM (Classificazione acque marine), presenta anche le più elevate concentrazioni di alcuni metalli riscontrate nei sedimenti, risultato di scarichi industriali e attività agricole. I valori dell'indice CAM risultano, inoltre, mediocri per Napoli, dove si ritrovano nei sedimenti anche elevate concentrazioni di piombo e IPA attribuibili all'intenso traffico automobilistico della zona del lungomare, e tra le più alte concentrazioni di mercurio. L'indice CAM risulta mediocre anche per la zona della foce del fiume Volturno. I siti

campionati durante il presente studio risultano, in base ai dati del Ministero della Salute e ARPAC 2007, tutti non balneabili, fatta eccezione per il sito di S. Angelo di Ischia ed il sito di riferimento, Acciaroli. Mergellina risulta zona permanentemente non balneabile per cause differenti dall'inquinamento.

Le evidenze riportate nella presente indagine collegano i danni osservati nelle branchie e nel genoma di *P. caerulea* alla presenza di agenti genotossici nei siti di prelievo, non è però possibile qui discutere di una diretta correlazione tra il tipo di alterazione e lo specifico inquinante.

Al riguardo interessanti informazioni sono attese da indagini di laboratorio, in progresso, mirate a studiare le alterazioni tissutali e genomiche in esemplari adulti e larvali di *P. caerulea* esposti a diverse concentrazioni di selezionati inquinanti.

I risultati ottenuti nella presente indagine confermano ed estendono i risultati cito- isto-patologici ottenuti da Bresler e coautori (2003a) in *P. caerulea* per i siti inquinati. Anche negli esemplari da noi studiati sono state, infatti, riscontrate le stesse istopatologie riportate da tali autori: *swelling*, presenza di vacuoli, alterazioni nucleari. Tuttavia negli esemplari esaminati durante questa tesi, sono stati osservati altri tipi di istopatologie quali l'iperplasia delle cellule epiteliali, la fusione dei filamenti, le alterazioni dei setti dell'emocele. Queste ultime potranno essere in futuro utilizzate, in aggiunta alle precedenti, come ulteriori parametri da monitorare nello studio delle istopatologie delle branchie di *Patella caerulea* e di altre specie congeneriche.

I risultati ottenuti dalla presente ricerca evidenziano, inoltre, che gli agenti inquinanti, presenti nei siti esaminati, agiscono oltre che sulla linea somatica (conseguenze solo sull'individuo colpito) anche a livello delle cellule germinali di *Patella caerulea*, ciò rappresenta una potenziale minaccia per l'intera popolazione.

L'elevata presenza di lesioni dicromatiche nei siti inquinati (sia pure in minor percentuale rispetto alle lesioni monocromatiche) costituisce un segnale di pericolo, le lesioni dicromatiche infatti non possono più essere riparate durante la divisione cellulare.

Tutto ciò porta alla graduale rarefazione delle popolazioni, come probabilmente sta già avvenendo per alcune specie come *P. ferruginea*, diminuzione non imputabile, quindi, esclusivamente al prelievo umano ed al consumo alimentare.

Altre interessanti informazioni ottenute durante la presente indagine riguardano gli aspetti citotassonomici, sistematici ed evolutivi del genere *Patella*. È stato qui definito il *pattern* dell'eterocromatina e degli organizzatori nucleolari (NORs) per *P. caerulea* e *P. rustica*. Le due specie possono essere discriminate a livello della distribuzione e costituzione dell'eterocromatina, inoltre la definizione di tale *pattern* può fornire un ulteriore parametro da utilizzare per future comparazioni citotassonomiche in *Patella*. Le analisi cariologiche hanno, inoltre, evidenziato che durante la diversificazione specifica non sono stati osservati riarrangiamenti nella localizzazione dei NORs che restano sulla prima coppia cromosomica per entrambe le specie. La diversificazione specifica è accompagnata da riarrangiamenti riguardanti la distribuzione dell'eterocromatina. Ulteriori informazioni riguardano le variazioni nel numero degli elementi osservati in tale genere, con specie a 16 o a 18 elementi. I dati ottenuti dal presente studio fanno avanzare l'ipotesi che l'evoluzione dei cromosomi sarebbe verso la riduzione del numero, tramite fusioni centriche (fusioni robertsoniane), infatti la fusione tra elementi telocentrici è stata osservata in esemplari di *P. caerulea* da noi esaminati.

L'analisi tassonomica molecolare delle regioni del 16S e del 12S del mtDNA, ha evidenziato uniformità tra gli esemplari dei vari siti campionati, osservando uno scarsissimo grado di diversificazione tra le differenti popolazioni italiane, gli esemplari delle regioni extraitaliane campionate e quelle presenti in GeneBank (Koufopanou *et al.*, 1999; Sá-Pinto *et al.*, 2005). Anche la forma "subplana" di *P. caerulea* raggruppa con gli altri esemplari a forma con caratteri tipici di *P. caerulea*. Tali osservazioni indicano, quindi, che le diverse forme di tale specie rappresentano semplici polimorfismi evidenziando che le popolazioni di *Patella* rappresentano un gruppo monofiletico. Le analisi molecolari qui condotte hanno anche confermato le relazioni sistematiche tra le quattro specie di *Patella* italiane, risultando da una parte *P. caerulea* affine a *P. ulyssiponensis*

e dall'altra *P. rustica* affine a *P. ferruginea*. I dati cromosomici aggiunti a tali evidenze molecolari indicano, all'interno del gruppo di *P. caerulea* e *P. ulyssiponensis*, come specie primitiva *P. caerulea* e derivata *P. ulyssiponensis*. Tali dati qui ottenuti potranno essere utilizzati per ulteriori analisi cromosomiche e molecolari su studi comparativi in *Patella* e nei patellidi in generale.

Tabella 7.1. Proporzione di individui (per sito di raccolta) in cui è stato riscontrato un danno cito- istopatologico nelle branchie o nelle gonadi.

Siti	Lesioni branchiali							Danni cromosomici				
	N. tot. Individui	Swelling dell' epitelio	Vacuoli	Alterazioni nucleari	Iperplasia dell' epitelio	Alterazione dei setti	Fusione dei filamenti	N. tot. Individui	Lesioni mono-cromatidiche	Lesioni di-cromatidiche	Piastre frammentate	Piastre aneuploidi
Mergellina	10	0.50	0.20	0.20	1.00	0.00	0.00	29	0.96	0.96	0.58	0.31
Gaeta-Lungomare Caboto	8	1.00	0.80	0.30	1.00	0.25	0.00	38	0.97	0.95	0.92	0.44
Castellammare di Stabia	10	0.80	1.00	0.40	0.80	0.00	0.40	32	1.00	0.97	0.97	0.50
Pozzuoli	10	0.80	0.60	0.40	1.00	0.00	0.20	32	0.90	0.90	0.65	0.15
Castelvoturno	8	0.80	1.00	0.40	1.00	0.00	0.37					
Ischia	6	0.30	0.00	0.30	0.50	0.33	0.00					
Acciaroli	9	0.80	0.30	0.00	0.77	0.00	0.00	30	0.60	0.16	0.10	0.03

Tabella 7.2. Valori di correlazione delle tre componenti estratte dopo l'analisi delle componenti principali e distribuzione dei valori significativi (in grassetto) per ciascun danno osservato.

	Componenti		
	1	2	3
Swelling	0.009	0.938	0.205
Vacuoli	0.494	0.558	0.666
Alterazioni nucleari	0.856	0.007	0.377
Iperplasia	0.585	-0.006	-0.729
Alterazione dei setti	0.218	0.871	-0.431
Fusione dei filamenti	0.454	-0.099	0.879
Lesioni monocromatidiche	0.991	0.058	-0.022
Lesioni dicromatidiche	0.996	0.004	-0.086
Piastre frammentate	0.908	0.365	0.184
Piastre aneuploidi	0.793	0.338	0.161

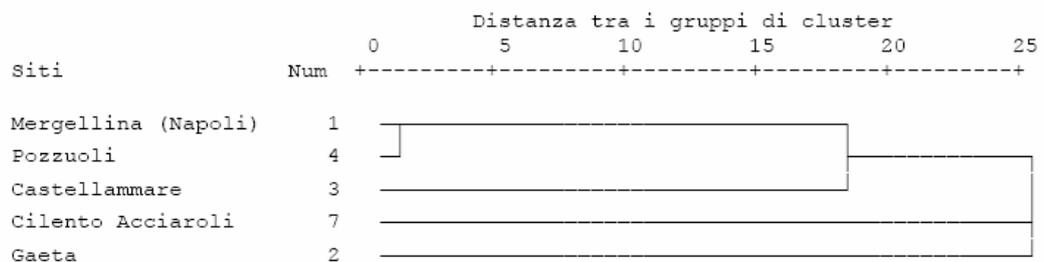


Figura 7.1. Analisi dei clusters effettuata sui valori ottenuti dalla PCA. Si individuano alcuni raggruppamenti basati sulla combinazione dei danni osservati.

Appendice I. Sistematica, distribuzione, caratteri morfologici, aspetti biologici ed ecologici di *Patella*

I.1. Sistematica

Le patelle sono molluschi gasteropodi appartenenti alla famiglia Patellidae. Oggi esistono diverse proposte di revisione della sistematica dei gasteropodi, e di conseguenza dei patellidi.

Secondo il filone di Bodon e coautori (1995) la classe Gastropoda è suddivisa in due sottoclassi: Prosobranchia ed Heterobranchia. Alla prima sottoclasse appartiene l'ordine Docoglossa (superordine Archaeogastropoda), di cui fanno parte i Patellidae.

Secondo la sistematica tradizionale, che vede la classe Gastropoda suddivisa nelle sottoclassi Prosobranchia, Opisthobranchia e Pulmonata, i Docoglossa costituiscono un sottordine dell'Ordine Archaeogastropoda appartenente alla sottoclasse Prosobranchia.

In ultimo Ponder & Lindberg (1996) hanno dimostrato in seguito ad uno studio cladistico che la ripartizione classica non è più supportata da un principio monofiletico in quanto i Docoglossi (Acmeidi e Patellidi), precedentemente inclusi nei Prosobranchi, presentano delle differenze di gran lunga maggiori con tutti gli altri Gasteropodi che non questi ultimi fra loro. Di conseguenza essi hanno allocato l'ordine dei Docoglossi ed i gruppi affini alla sottoclasse Eogastropoda ed il resto dei Gasteropodi alla sottoclasse Orthogastropoda.

I.2. Cenni di anatomia

Patella rappresenta uno dei generi più primitivi all'interno della classe dei gasteropodi. Questo mollusco possiede una conchiglia formata da un unico pezzo, a forma di scudo conico, depresso, dal cui vertice, spostato in avanti rispetto al centro, si dipartono delle linee radiali. Il bordo è sottile e si adatta alla

superficie alla quale l'animale aderisce. Il colore della conchiglia, la sua forma e la sua altezza sono caratteri molto variabili ma in genere la superficie esterna varia dal grigio giallastro al rossastro; l'interno della conchiglia è chiaro, madreperlaceo, a volte di colore bluastrò o arancio dove si attaccano i muscoli del piede. Il piede è un organo muscoloso e la contrazione di particolari muscoli della sua suola determina lo spostamento dell'animale, creando delle onde retrograde che si sviluppano con verso contrario a quello dello spostamento dell'animale: le onde, a partire dalla parte anteriore del piede, si propagano verso la parte posteriore.

Il corpo è formato da un voluminoso sacco che contiene la massa viscerale, il cui centro è occupato dall'epatopancreas (Davis & Fleure, 1903). La cavità palleale, propria dei molluschi, è notevolmente ridotta e le branchie sono sostituite da pseudobranchie (Figura I.1). Quest'ultime sono filogeneticamente secondarie e consistono in una corona di lamine branchiali poste sulla superficie inferiore del mantello (Giusti, 1991). L'acqua circola sui fianchi del corpo, irrorando le pseudobranchie e permettendo la respirazione. La struttura delle branchie di *Patella* è stata descritta da Nuwayhid e coautori (1978) per *Patella vulgata* dove tale organo è costituito da filamenti con parete monostratificata di cellule cubico-cilindriche. La superficie di ogni branchia è ripiegata in una serie di solchi trasversi. All'interno di ogni filamento vi è l'emocele, suddiviso in concamerazioni da setti connettivali e contenente emociti, liberi o adesi sulle lamine connettivali.

L'occhio della patella è una semplice fossetta pigmentata aperta, innervata da gangli cerebrali.

Il sistema nervoso dei Patellidae è di tipo gangliare, nella sua organizzazione tipica (ancestrale) è costituito da gangli simmetrici uniti da commissure trasversali. Sono presenti una coppia di gangli cerebrali alla base dei tentacoli cefalici; gangli pedali e pleurali sotto la parte finale posteriore della massa buccale; gangli labiali contenuti nella regione orale; gangli buccali connessi ai gangli labiali attraverso connettivi labiobuccali; gangli sopraesofagei, sottoesofagei e viscerali fusi come anelli sottili sul lato destro; le parti sopra- e

sotto-esofagee dell'anello viscerale inviano nervi ai gangli osfradiali. (Sasaki, 1998).

La bocca è munita di radula, organo caratteristico dei gasteropodi atto a raschiare le sostanze alimentari dal substrato e nella patella in particolare esso presenta un piccolo dente centrale.

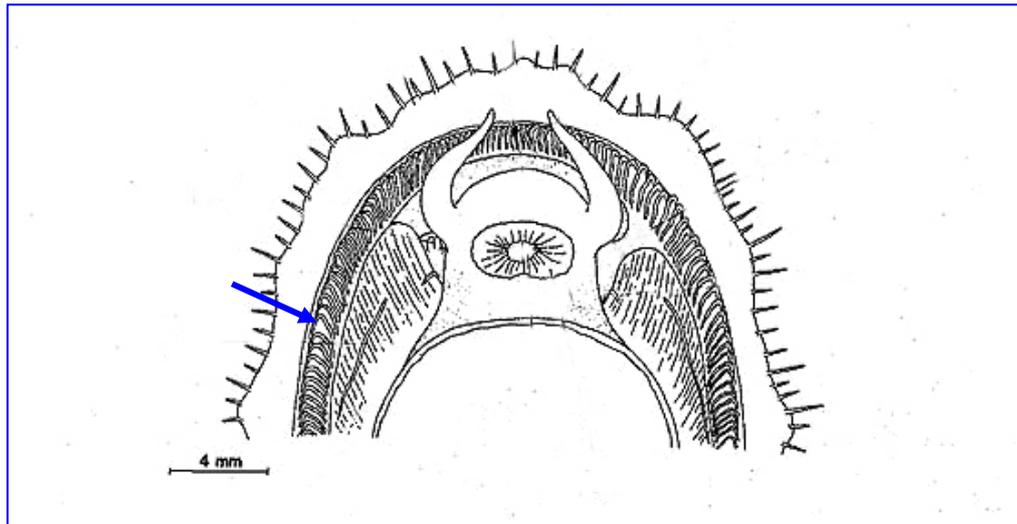


Figura I.1. Schema di *Patella*, la freccia blu indica la corona branchiale. Modificato da Sasaki, 1998.

I.3. Distribuzione

Il genere *Patella* è distribuito lungo le coste del Nord-Est Atlantico e del Mediterraneo (Figura I.2 A) (Sà-Pinto *et al.*, 2005) con nove specie (Ridgway *et al.*, 1998) e con numerose sottospecie la cui validità tassonomica è molto discussa. In Italia sono presenti (Figura I.2 B) le quattro specie *Patella caerulea* Linnaeus, 1758, *Patella ferruginea* Gmelin, 1791, *Patella rustica* Linnaeus, 1758, e *Patella ulyssiponensis* Gmelin, 1791 (Bodon *et al.*, 1995). *Patella caerulea*, *P. rustica* e *P. ulyssiponensis* sono comuni e largamente distribuite lungo le coste italiane mentre *P. ferruginea* è attualmente segnalata per alcune delle isole del Mediterraneo occidentale, la Corsica, forse la Croazia mentre in

Italia è presente nella Sardegna del Nord, in alcune piccole isole della Toscana e forse nelle isole Egadi.

Per il Golfo di Napoli sono segnalate:

Patella caerulea riportata da Praus Franceschini (1906) anche come *P. subplana* Pot. e Mich. (= *scutellaris* Blainv.) che riporta anche la var. *lugubris* Russo di *P. caerulea*. Bellini (1929) la segnala sia come *P. caerulea* L. sia come *P. scutellaris* Blainv.

Patella rustica è riportata da Praus Franceschini (1906) e Gamulin-Brida (1965) come *P. lusitanica*. Bellini (1929) la riporta come *P. (Patellastra) lusitanica* Gmelin.

Patella ulyssiponensis è riportata da Praus Franceschini (1906) anche come *P. aspera* (Lk.) Ph. e come *P. tarentina* v. Salis. Bellini (1929) la segnala come *P. aspera* Lam. e come *P. tarentina* Lam. Gamulin-Brida (1965) la riporta come *P. aspera*.

P. ferruginea è riportata da Bellini (1929) per il Golfo di Napoli ma considerata già “Rara forma in via di scomparsa”.

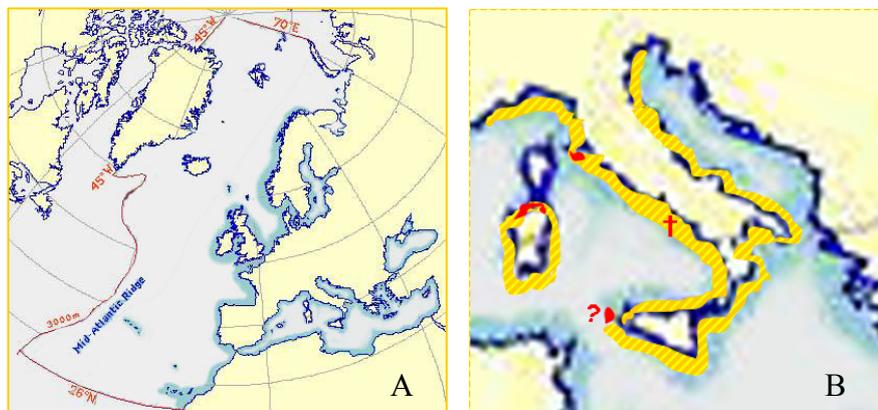


Figura I.2. Distribuzione di *Patella* (A) distribuzione delle specie di *Patella* italiane (B).

I.4. Biologia ed ecologia

Le patelle vivono fra il limite superiore dell'alta marea e pochi metri sotto il livello dell'acqua (5-10 m), restando quindi in emersione nelle fasi di bassa

marea per poi venir sommerse nuovamente quando il livello del mare sale. Vivono su substrati duri, dove si ancorano tramite un ampio piede muscoloso grazie al quale l'animale può sopportare lunghi periodi di emersione. Il piede è infatti strutturato in modo da aderire fortemente ai substrati duri, consentendo la formazione di una camera d'acqua all'interno della conchiglia che impedisce il disseccamento nei periodi di bassa marea. Inoltre, all'approssimarsi della bassa marea ciascun individuo tende a ritornare in un punto preciso del territorio, corrispondente ad una nicchia personale, ovvero ad una piccola depressione scavata nella roccia con il bordo che aderisce perfettamente all'orlo della sua conchiglia (Mojetta & Ghisotti, 2002). L'adesione è favorita anche dalla secrezione di un muco viscoso. La conchiglia di forma conica, non spiralata, più o meno elevata offre poca resistenza all'azione delle onde. Le patelle sono erbivore e si nutrono, raschiando con la radula dello strato organico (alghe diatomee e batteri) che ricopre le rocce alle quali aderiscono. Il periodo di maturazione delle gonadi varia a seconda della specie, la fecondazione avviene in acqua, lo sviluppo è indiretto con larva planctonica di tipo trocofora (Torelli, 1982; Mojetta & Ghisotti, 2002).

I.5. Le specie italiane

La specie più comune sulle nostre coste è *Patella caerulea* (Figura I.3 A; B; C; D), abbondante nella zona di marea delle coste rocciose e sulle opere portuali (Riedl, 1991). Essa presenta elevata variabilità morfologica: in genere presenta una superficie esterna ornata da leggere coste radiali, con peristoma arrotondato. La colorazione esterna della conchiglia varia dal fulvo al grigio ed, a volte, al bruno chiaro. Spesso è ricoperta ed incrostata da alghe che la mimetizzano con il substrato. L'interno della conchiglia è madreperlaceo con riflessi grigio-azzurri, a volte è bianco porcellanaceo, con macchia centrale giallo-arancio e bande raggiate scure. Il piede è ovale, di colore grigio scuro o blu con centro e margine crema (Cretella *et al.*, 1991). Il diametro prevalente è inferiore a 50 mm (40-45 mm) ed il suo rapporto con l'altezza è in genere inferiore a 0,30. (Ghisotti & Melone, 1970; Torelli 1982). A causa della grande variabilità della conchiglia in

passato alcune forme oggi riunite nell'unica specie *P. caerulea*, sono state considerate sottospecie o specie valide. Ghisotti & Melone (1970) ne riportano alcune: *P. caerulea* “*subplana* Potiez & Michaud” = *trentina* Lam. = *scutellaris* Blainville, con forma appiattita ed apice spostato in avanti, grosse coste radiali arrotondate, peristoma pentagonale, di cui venivano considerate anche alcune variazioni, “*stellata*”, “*cognata*”. Ghisotti & Melone (1970) riportano inoltre *P. caerulea* “*tarentina*” che presenta apice acuto e contorno ovale con superficie esterna quasi liscia di cui veniva considerata anche la variazione “*spinulosa*” e *P. caerulea* “*pontica*” sottospecie del Mar Nero. Inoltre gli stessi autori riportano che di *P. caerulea* “*typica*” di cui veniva considerata anche le variazioni “*fragilis* Ph.”, “*intermedia*”, “*adspersa*”.

Patella rustica (Figura I.3 E), è localmente comune e vive nella zona di marea o poco al di sopra di essa (Riedl, 1991). La sua conchiglia ha un profilo elevato, presenta coste radiali regolari e granulose, con punteggiature nerastre. La colorazione interna è costituita da raggi alternativamente grigio violacei e bruno ferrugini. Il piede è di forma circolare dello stesso colore presentato da *P. caerulea* (Cretella *et al.*, 1991). Il diametro prevalente è inferiore a 50 mm (in media 25mm) ed il suo rapporto con l'altezza è superiore a 0,35 (Ghisotti & Melone, 1970; Torelli, 1982).

Patella ulyssiponensis (Figura I.3 F), di cui Christiaens (1973) riporta cinque sottospecie tra le quali *P. ulyssiponensis aspera*, vive nel medio litorale roccioso (Riedl, 1991). La conchiglia presenta coste radiali irregolari, rugose, aspere, e strie circolari; ha forma ovale, ristretta anteriormente ed il peristoma è irregolare. Esternamente la conchiglia è bruno chiaro a volte con fasce rossastre, internamente è bianca o arancio con raggi bruni poco evidenti con impronta muscolare rosata. Il diametro prevalente è inferiore a 50 mm (in media 35mm) ed il suo rapporto con l'altezza è in genere tra 0,30 e 0,35. (Ghisotti & Melone, 1970; Torelli, 1982).

Patella ferruginea (Figura I.3 G), vive nel medio litorale roccioso (Riedl, 1991), nella stessa zona di *P. ulyssiponensis*, si ferma più in alto rispetto a *P. caerulea* e *P. rustica* (Laborel-Deguen & Laborel, 1991a). Presenta una conchiglia massiccia ed il suo peso è superiore a 10 g con coste raggiate rilevate,

arrotondate e vicine. Il piede ha forma ovale o piriforme, può essere di colore albicocca, crema o giallo (Cretella *et al.*, 1991). Il diametro prevalente è superiore a 50 mm (in media) ed il suo rapporto con l'altezza è maggiore di 0,35 (Ghisotti & Melone, 1970). Tale specie è attualmente in forte rarefazione. Tra le cause principali della rarefazione di *P. ferruginea* è annoverato il prelievo umano, ai fini principalmente alimentari, di individui di grosse dimensioni (Laborel-Deguen & Laborel, 1991a,b). Tali individui risulterebbero nella maggior parte dei casi femmine, poiché in letteratura le patelle sono descritte come specie proterandriche, (inversione sessuale da maschi a femmine) con rare eccezioni di individui gonocorici o di ermafroditismi regionali (Bacci, 1948; Dodd, 1956, Choquet, 1966; Bacci, 1975; Laborel-Deguen & Laborel, 1991a,b).

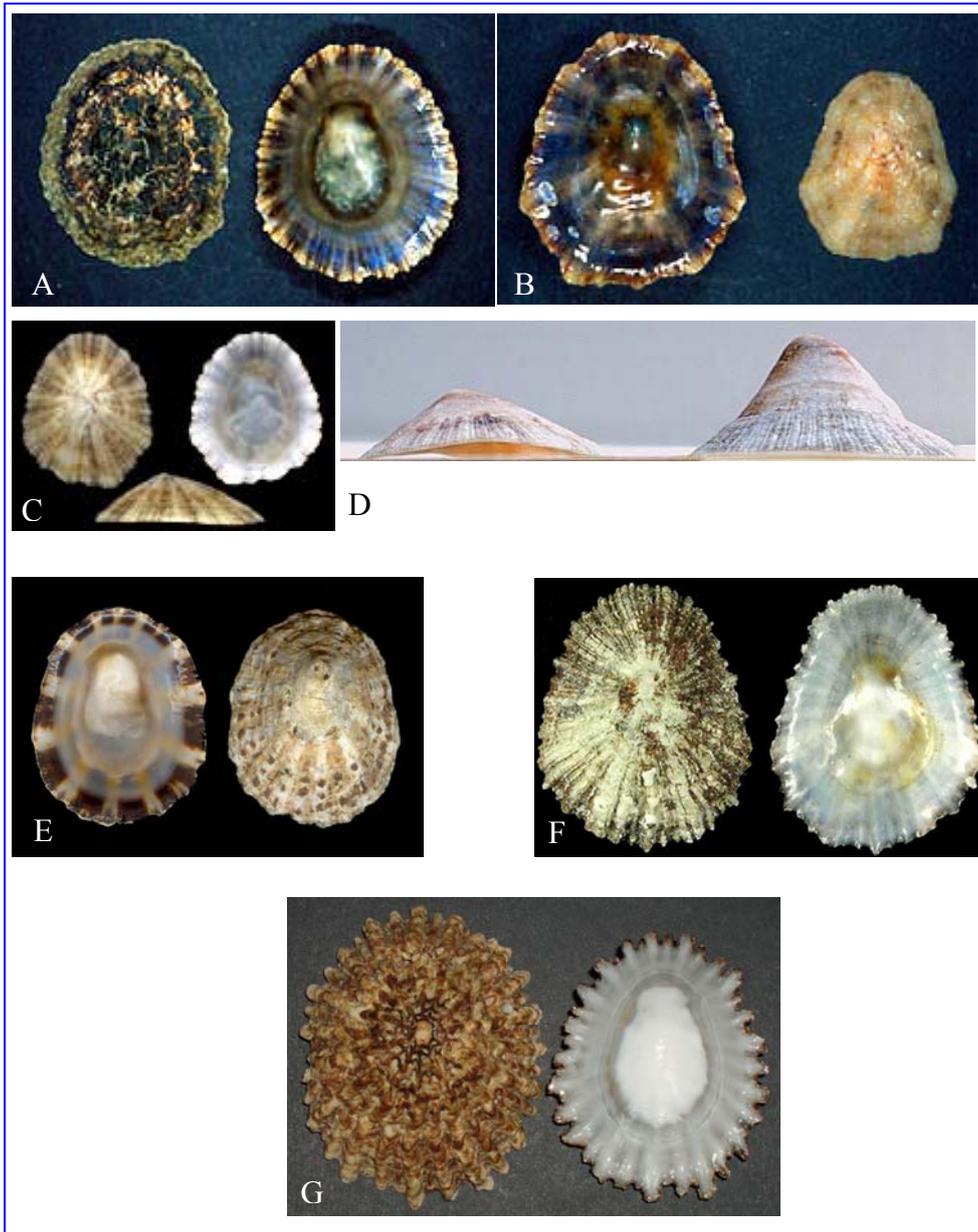


Figura I.3. Specie del genere *Patella* presenti in Italia; *Patella caerulea* e sua variabilità morfologica (A, B, C, D), *Patella rustica* (E), *Patella ulyssiponensis* (F), *Patella ferruginea* (G).

Appendice II. Frequenza per individuo di aberrazioni cromosomiche per sito.

Sono qui riportate (Tabelle II.1-II.5) la frequenza per ciascun individuo e per tipo di aberrazione cromosomica per ogni sito di campionamento del presente studio.

Tabella II.1. Numero di piastre per i diversi tipi di lesioni cromosomiche rinvenute in ciascuno degli individui esaminati di Gaeta, con relative frequenze e deviazioni standard (DS).

Esemplari	Numero piastre	Piastre monocrotidiche	Piastre dicromatidiche	Piastre frammentate	Piastre aneuploidi
1	14	2	1	1	0
2	14	5	2	1	1
3	13	6	3	2	1
4	15	1	1	1	0
5	14	4	2	1	1
6	14	3	2	1	0
7	16	2	1	1	1
8	15	2	1	0	0
9	13	3	2	1	0
10	15	2	1	1	1
11	15	2	1	1	0
12	14	0	0	0	0
13	15	6	3	1	1
14	14	3	2	1	1
15	14	3	1	1	0
16	13	2	0	0	0
17	15	3	1	1	0
18	14	3	2	1	1
19	15	4	1	1	0
20	13	3	1	1	1
21	15	3	1	1	0
22	14	2	1	1	0
23	15	4	2	1	1
24	15	3	2	1	0
25	14	3	2	1	0
26	14	4	2	2	0
27	13	3	1	1	0
28	14	3	2	1	0
29	13	4	2	2	1
30	15	5	3	1	1
31	14	4	2	1	0
32	14	3	2	2	1
33	14	3	1	1	1
34	13	2	1	1	0
35	14	3	2	1	1
36	15	4	2	1	1
37	13	2	1	1	0
38	14	3	2	1	1
Totali 38	538	117	59	39	17
Frequenza					
		21,20%	10,70%	7,30%	3,20%
D S					
		8,1	4,9	3,2	3,6

Tabella II.2. Numero di piastre per i diversi tipi di lesioni cromosomiche rinvenute in ciascuno degli individui esaminati di Pozzuoli, con relative frequenze e deviazioni standard (DS).

Esemplari	Numero piastre	Piastre monocrotidiche	Piastre dicromatidiche	Piastre frammentate	Piastre aneuploidi
1	15	4	2	1	0
2	14	2	1	1	0
3	14	3	2	0	0
4	15	1	1	1	0
5	14	3	1	0	0
6	15	2	1	1	0
7	13	2	2	0	0
8	14	1	1	1	1
9	14	3	2	1	0
10	15	2	1	0	0
11	15	2	2	2	1
12	15	2	2	1	0
13	14	2	1	1	0
14	14	0	0	0	0
15	14	2	2	1	0
16	15	2	2	1	1
17	15	2	1	0	0
18	13	2	2	1	0
19	15	1	1	1	0
20	15	2	1	1	0
21	14	0	0	0	0
22	14	1	1	1	1
23	14	2	1	1	0
24	14	2	2	2	0
25	14	2	1	1	0
26	14	2	2	1	0
27	14	2	1	0	0
28	13	0	0	0	0
29	15	2	2	1	1
30	15	1	1	0	0
31	14	2	2	1	0
32	14	1	1	0	0
Totali 32	457	57	42	23	5
Frequenza		12,50%	9,20%	5,00%	1,10%
D S		6,1	4,5	4	2,5

Tabella II.3. Numero di piastre per i diversi tipi di lesioni cromosomiche rinvenute in ciascuno degli individui esaminati di Mergellina, con relative frequenze e deviazioni standard (DS).

Esemplari	Numero piastre	Piastre monocrotidiche	Piastre dicromatidiche	Piastre frammentate	Piastre aneuploidi
1	16	1	1	1	0
2	14	2	1	0	0
3	16	1	1	1	0
4	16	3	2	1	1
5	17	1	1	1	0
6	13	2	1	1	0
7	14	3	2	1	1
8	15	1	1	0	0
9	15	1	1	1	0
10	14	1	1	0	0
11	14	2	1	1	1
12	16	3	1	1	1
13	17	0	0	0	0
14	16	3	1	1	1
15	15	1	1	1	0
16	14	2	1	0	0
17	14	1	1	1	1
18	15	2	1	0	0
19	16	3	2	2	1
20	14	1	1	0	0
21	16	2	1	0	0
22	16	1	1	1	0
23	15	2	1	0	0
24	16	1	1	1	1
25	14	2	1	0	0
26	15	3	2	1	1
27	16	1	1	0	0
28	16	2	1	0	0
29	15	1	1	1	0
Totali 29	440	49	32	18	9
	Frequenza	11,20%	7,10%	4,10%	2,10%
	D S	5,6	2,6	3,6	3,2

Tabella II.4. Numero di piastre per i diversi tipi lesioni cromosomiche rinvenute in ciascuno degli individui esaminati di Castellammare di Stabia, con relative frequenze e deviazioni standard (DS).

Esemplari	Numero piastre	Piastre monocrotidiche	Piastre dicromatidiche	Piastre frammentate	Piastre aneuploidi
1	15	4	2	1	0
2	15	3	1	1	1
3	16	4	3	2	1
4	15	3	1	1	0
5	15	4	1	1	0
6	15	4	2	1	1
7	15	4	1	1	0
8	16	3	2	2	1
9	15	3	1	1	0
10	14	3	1	1	1
11	15	4	2	1	0
12	15	3	1	1	1
13	15	3	3	1	1
14	16	4	2	1	0
15	15	3	0	0	0
16	15	3	1	1	0
17	15	2	1	1	1
18	15	4	2	1	1
19	15	4	1	1	0
20	14	3	2	1	1
21	16	3	2	1	1
22	16	3	1	1	0
23	15	4	2	2	0
24	15	4	1	1	1
25	14	4	1	1	0
26	16	3	2	1	1
27	15	3	1	1	1
28	15	4	1	1	0
29	15	3	2	1	0
30	16	4	3	1	1
31	15	4	1	1	1
32	15	4	2	1	0
Totali 32	484	107	49	34	16
	Frequenza	23,00%	10,10%	7,00%	3,30%
	D S	3,8	4,6	1,8	3,4

Tabella II.5. Numero di piastre per i diversi tipi di lesioni cromosomiche rinvenute in ciascuno degli individui esaminati di Acciaroli, con relative frequenze e deviazioni standard (DS).

Esemplari	Numero piastre	Piastre monocrotidiche	Piastre dicromatidiche	Piastre frammentate	Piastre aneuploidi
1	14	1	0	0	0
2	14	1	0	0	0
3	16	1	0	0	0
4	15	1	0	0	0
5	16	1	0	0	0
6	14	0	0	0	0
7	14	1	0	0	0
8	14	1	1	1	0
9	15	0	0	0	0
10	16	1	0	0	0
11	14	0	0	0	0
12	15	1	1	0	0
13	15	0	0	0	0
14	16	1	1	1	0
15	15	1	0	0	0
16	14	0	0	0	0
17	16	1	1	0	0
18	14	0	0	0	0
19	15	0	0	0	0
20	16	1	0	0	0
21	15	0	0	0	0
22	13	0	0	0	0
23	12	1	0	0	0
24	17	1	0	0	0
25	17	1	0	0	0
26	14	0	0	0	0
27	15	1	0	0	0
28	16	1	1	1	1
29	15	0	0	0	0
30	16	0	0	0	0
Totali 30	448	18	5	3	1
Frequenza		3,90%	1,10%	0,60%	0,20%
DS		3,3	2,5	2	1,1

Bibliografia.

- Abdel-Moati A. R., Atta M. M., 1991. *Patella vulgata*, *Mytilus minimum* and *Hyale prevosti* as Bioindicators for Pb and Se Enrichment in Alexandria Coastal Waters. *Marine Pollution Bulletin*, 22 (3): 148-150.
- Allen, 1994. Accumulation profiles of lead and the influence of cadmium and mercuri in *Oreochromis aureus* (*staindachner*) during chronic exposure. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 44: 101-112.
- Almeida-Toledo L. F., Viegas-Péquignot G., Foresti F., Toledo Filho S. A., Dutrillaux B., 1988. BrdU replication patterns demonstrating chromosome homoeologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. *Cytogenetic and Cell Genetics*, 48: 117-120.
- Arellano J. M., Storch V., Sarasquete C., 1999. Histological Changes and Copper Accumulation in Liver and Gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44: 62-72.
- Aydemir T. B., Blanchard R.K., Cousins R.J., 2006. Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. *PNAS*, 103 (6): 1699-1704
- Bacci G., 1948. L'inversione del sesso ed il ciclo stagionale della gonade in *Patella coerulea* L. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 21: 183-216.
- Bacci G., 1975. Sex reversal in the genus *Patella* (Gastropoda Prosobranchiata). *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 39: 341-344.
- Baršienė J., 2003. Cytogenetic damage in viviparid snails inhabiting different lakes in Switzerland. *Ekologija*, 3:23-28.
- Baršienė J., Bučinskienė R., 2001. Cytogenetic Damage in the Tissues of Indigenous and Transferred Molluscs. *Acta Zoologica Lituonica*, 11 (1): 102-109.
- Baršienė J., Lehtonen K. K., Koehler A., Broeg K., Vuorinen P. J., Lang T., Pempkowiak J., Šyvokienė J., Dedonyte V., Rybakovas A., Repečka R., Vuontisjärvi H., Kopecka J., 2006. Biomarker responses in flounder

- (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Butinge area (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin*, 53:422-436.
- Bellini, R., 1929. I Molluschi del Golfo di Napoli (studi precedenti, l'ambiente, enumerazione e sinonimie). *Annuario del Museo Zoologico della Reggia Università di Napoli*, (n. s.), 6: 1-87.
- Beninger P. G., Le Pennec M., Salaun M., 1988. New observations of the gills of *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia) and implications for nutrition. I. General anatomy and surface microanatomy. *Marine Biology*, 98: 61-70.
- Bhagwant S., Elahee K. B., 2002. Pathologic Gill Lesions in Two Edible Lagoon Fish Species, *Mulloidichthys flavolineatus* and *Mugil cephalus*, from the Bay of Poudre d'Or, Mauritius. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, 1 (1): 35-42.
- Bhavan P. S., Geraldine P., 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicology*, 50: 331-339.
- Bodon M., Favilli L., Giannuzzi Savelli R., Giovine F., Giusti F., Manganeli G., Melone G., Oliverio M., Sabelli B. & Spada G., 1995. *Gastropoda; Prosobranchia, Heterobranchia Heterostropha*. In: Minelli A., Ruffo S. & La Posta S. (Eds), Checklist delle specie della fauna italiana. Calderini, Bologna, 14. 60 pp.
- Bolognesi C., Rabboni R., Roggieri P., 1996. Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113C (2) : 319-323.
- Bolognesi C., Frenzilli G., Lasagna C., Perrone E., R., Roggieri P., 2004. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wilde versus csged mussels. *Mutation Research*, 552:153-162.
- Bonucci E., 1990. Manuale di istochimica. Lombardo Editore Roma.
- Bresler V., Bissinger V., Abelson A., Dizer H., Sturm A., Kratke R., Fishelson L., Hansen P. D., 1999. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgoland Marine Research*, 53: 219-243.

- Bresler V., Abelson A., Fishelson L., Feldestein T., Rosenfeld M. & Mokady O., 2003a. Marine molluscs in environmental monitoring. I. Cellular and molecular responses. *Helgoland Marine Research*, 57: 157-165.
- Bresler V., Mokady O., Abelson A., Fishelson L., Feldestein T., Rosenfeld M., 2003b. Marine molluscs in environmental monitoring. II. Experimental exposure to selected pollutants. *Helgoland Marine Research*, 57: 206-211.
- Casper A. M., Nghiem P., Arlt F. M., Glover T. W., 2002. ATR Regulates Fragile Site Stability. *Cell*, 111: 779-789.
- Castello G., Silvestri I., 1999. Il linfocito quale dosimetro biologico. *Caleidoscopio*, 130: 1-55.
- Cervella P., Ramella L., Robotti C. A., Sella G., 1988. Chromosome analysis of three species of *Patella* (Archaeogastropoda). *Genetica*, 77: 97-103.
- Choquet M., 1996. Biologie de *Patella vulgata* dans le Boulonnais. *Cahiers de Biologie Marine*, 7: 1-122.
- Christiaens J., 1974. Revision du genre *Patella* (Mollusca, Gastropoda). *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle 3° serie*, 182: 1305-1392.
- Chung K. W., Fulton M. H., Scott G. I., 2007. Use of the juvenile clam, *Mercenaria mercenaria*, as a sensitive indicator of aqueous and sediment toxicity, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 333-340.
- Coquelle A., Pipiras E., Toledo F., Buttin G., Debatisse M., 1997. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell*, 89, 215-225.
- Cretella M., Scillitani G., Toscano F., Turella P., Picariello O., 1991. Comparative morphology of soft parts of *Patella* L., 1758 from the Bay of Naples (Gastropoda: Patellidae). *Bollettino Malacologico*, 26: 204-210.
- Cretella M., Scillitani G., Toscano F., Turella P., Picariello O., Cataudo A., 1994. Relationships between *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 and the other Tyrrhenian species of *Patella* (Gastropoda: Patellidae). *Journal of Molluscan Studies*, 60: 9-17.
- Dailianis S., Domouhtsidou G. P., Raftopoulou E., Kaloyianni M., Dimitriadis V. K., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal trasduction molecule (cAMP) in

- tissue of *Mytilus galloprovincialis* (L. I in pollution monitoring). *Marine Environmental Research*, 56: 443-470.
- Dalla Venezia L., Stradella S., Menetto A., Campesan G., 1994. Fine struttura delle branchie di *Mytilus* sp. e danni causati dagli inquinanti LAS e Cadmio. *Biologia Marina Mediterranea*, 1 (1): 387-388.
- Davis J. R. A., Fleure H. J., 1903. *Patella* (The common limpet). *Liverpool Marine Biology Committee Memoirs*, 10: William & Norgate, London. 84 pp.
- Dixon D. R., Wilson J. T., 2000. Genetics and marine pollution. *Hydrobiologia*, 420: 29-43.
- Dodd J. M., 1956. Studies on the biology of limpets III. Hermafroditism in the three British species of *Patella*. *Journal of the Marine Biological Association*, 35: 227-240.
- Dopp E., Barker C. M., Schiffamann D., Reinisch C. L., 1996. Detection of micronuclei in hemocytes of *Mya arenaria* – association with leukaemia and induction with an alkylating agent. *Aquatic Toxicology*, 34: 31-45.
- Dufour S., Beninger P. G., 2001. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the frontal surface of bivalve gills. *Marine Biology*, 138: 295-309.
- Evans D. H., 1987. The "fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 71: 47-58.
- Feldestein T., Kashman Y., Abelson A., Fishelson L., Mokady O., Bresler V., Erel Y., 2003. Marine molluscs in environmental monitoring. III. Trace metals and organic pollutants in animal tissue and sediments. *Helgoland Marine Research*, 57: 212-219.
- Gamulin-Brida H., 1965. Contribution aux recherches sur la bionomie benthique de la Baie de Porto Paone (Naples, Italie). Repartition des biocoenoses benthiques. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 34: 476-500.
- Ghisotti F., Melone G. C., 1970. Catalogo illustrato delle Conchiglie Marine del Mediterraneo. Parte II. Conchiglie, 6 (3-4, suppl.): 29-46.

- Giusti F., 1991. I Molluschi. In: 1991 Zoologia. Trattato italiano, Baccetti B. *et al.* (Eds.), pp. 265-430. Editoriale Grasso, Bologna.
- Glegg G. A., Hickman L., Rowland S. J., 1999. Contamination of Limpets (*Patella vulgata*) Following the *Sea Empress* Oil Spill. *Marine Pollution Bulletin*, 38, (2): 119-125.
- Glover T. W., Berger C., Coyle J., Echo B., 1984. DNA polymerase α inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Human Genetics*, 67, 136-142.
- Hartwig A., 1995. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*, 8 (1): 3-11.
- Herut B., Kress N., Shefer E., Hornung H., 1999. Trace element levels in mollusks from clean and polluted coastal marine sites in the Mediterranean, Red and North Seas. *Helgoland Marine Research*, 53:154-162.
- Howell W. M., Black D. A., 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36:1014-1015.
- Hughes G. M., Grimstone A. V., 1965. The fine structure of the secondary lamellae of the gills of *Gadus pollachius*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 106: 343-353.
- Hughes G. M., Perry S. F., 1976. Morphometric study of trout gills: A light microscopic method for the evaluation of pollutant action. *Journal of Experimental Biology*, 63: 447-460.
- Kirsch-Volders M., 1986. Differential staining of chromosomes and spindle cannot be used as an assay to determine the effects of cancer promoters on primary cultures of human fibroblasts. *Mutation Research*, 171: 177-183.
- Koca Y. B., Koca S., Yıldız Ş., Gürcü B., Osañç E., Tunçbaşı O., Aksoy G., 2005. Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (Pisces: Perciformes) in the Çine stream (Aydın/Turkey) with determination of water pollution. *Environmental toxicology*, 20 (6): 560-571.
- Koufopanou V., Reid D. G., Ridgway S. A., Thomas R., 1999. A molecular Phylogeny of Patellid Limpets (Gastropoda: Patellidae) and its implications

- for the Origins of Their Antitropical Distribution. *Phylogenetics and Evolution*, 11 (1): 138-156.
- Laborel-Deguen, F., Laborel J., 1991a. Statut de *Patella ferruginea* Gmelin en Méditerranée. In: “Les Espèces Marines à Protéger en Méditerranée”. Boudouresque C. F., Avon M., Gravez V. (Eds.). Posidonie pubbl. pp. 91-103.
- Laborel-Deguen, F., Laborel J., 1991b. Nouvelles observations sur la population de *Patella ferruginea* Gmel. De Corse. In: “Les Espèces Marines à Protéger en Méditerranée”. Boudouresque C. F., Avon M., Gravez V. (Eds.). Posidonie pubbl. pp. 105-117.
- Lauenstein G. G., 1995. Comparison of organic contaminants found in mussels and oysters from a current mussel watch project with those from archived mollusc samples of the 1970s. *Marine Pollution Bulletin*, 30 (12):826-833.
- Levan, A., Fredga K., Sandberg A. A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Machado M. R., Fanta E., 2003. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46: 361-379.
- Mallat J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicans and other irritants: A statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42: 630-648.
- Mauro A., Parrinello N., Arculeo M., 2001. Artificial environmental conditions can affect allozyme genetic structure of the marine gastropod *Patella caerulea*. *Journal of Shellfish Research*, 20 (3): 1059-1063.
- Mauro A., Arculeo M., Parrinello N., 2003. Morphological and molecular tools in identifying the Mediterranean limpets *Patella caerulea*, *Patella aspera* and *Patella rustica*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 295: 131-143.
- Mazzi V., 1977. Tecniche istologiche ed istochimiche. Piccin (Ed.) Padova.
- McAllister B. F., Greenbaum I. F., 1997. How common are common fragile sites: variation of aphidicolin-induced chromosomal fragile sites in a

- population of the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Human Genetics*, 100: 182-188.
- Mojetta A., Ghisotti A., 2002. Flora e Fauna del Mediterraneo. Mondadori, Milano, 318 pp.
- Morescalchi A., 1983. I cromosomi nell'evoluzione e nella speciazione. Il caso degli anfibi. IX Seminario sulla evoluzione biologica e i grandi problemi della biologia. *Atti dell'Accademia Nazionale dei Lincei*, 64: 63-109.
- Nakhlé K. F., Cossa D., Khalaf G., Beliaeff B., 2006. *Brachidontes variabilis* and *Patella* sp. as quantitative biological indicators for cadmium, lead and mercury in the Lebanese coastal waters. *Environmental Pollution*, 142: 73-82.
- Neiboer E., Richardson D. H. S., 1980. The replacement of the non descript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution, (Ser. B)*, 1: 3-6.
- Nowak B., 1992. Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. *Aquatic Toxicology*, 23: 65-83.
- Nuwayhid M. A., Spencer Davies P., Elder H. Y., 1978. Gill Structure in the Common Limpet *Patella vulgata*. *Journal of the Marine Biological Association of the U. K.*, 58: 817-823.
- Odierna G., Baldanza F., Aprea G., Olmo E., 1993. Occurrence of G-banding in metaphase chromosomes of *Encarsia berlesei* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Genome*, 36: 662-667.
- Odierna G., Aprea G., Barucca M., Canapa A., Capriglione T., Olmo E., 2006. Karyology of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*, with some comments on the karyological evolution of pectinids. *Genetica*, 127: 341-349.
- Oliveira Ribeiro C.A., Fanta E., Turcaratti N. M., Cardoso R. J., Carvalho, C. S., 1996. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). *Biocell*, 20: 171-178.

- Olson K. R., Fromm P. O., 1973. A scanning electron microscopic study of secondary lamellae and chloride cells of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Zeitschrift für Zellforschung Mikroskopische Anatomie*, 143: 439-449.
- Palumbi S. R., 1996. What can molecular genetics contribute to marine biogeography? An Urchin's tale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 203:75-92.
- Peña-Méndez E. M., García-Montelongo F., 1998. Hydrocarbon Contamination in the Canary Islands. II. Intertidal Limpet *Patella ulyssiponensis aspera*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61:72-79.
- Pfenninger M., Cordellier M., B. Streit, 2006. Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata). *BMC Evolutionary Biology*, 6:100-114.
- Pike R. B., 1947. *Galathea. L. M. B. C. Memoirs on Typical British Marine Plants and Animals*, 34: 179 pp.
- Ponder W. F., Lindberg D. R., 1996. Gastropod phylogeny: Challenges for the 90s. In: Taylor J. (Ed.) Origin and evolutionary radiation of the Mollusca, pp. 135-154. Oxford University Press, Oxford.
- Praus Franceschini C., 1906. Elenco delle conchiglie del Golfo di Napoli e del Mediterraneo esistenti nel Museo Zoologico di Napoli. *Annuario del Museo Zoologico della Reggia Università di Napoli*, (n. s.), 2: 1-68.
- Ragghianti M., Guerrini F., Bucci S., Mancino G., Hotz H., Uzzel T., Guex G.D., 1995. Molecular characterization of a centromeric satellite DNA in the hemiclinal hybrid frog *Rana esculenta* and its parental species. *Chromosome Research*, 3: 497-506.
- Ragghianti M., Bucci S., Casola C., Marracci S., Mancino G., 2004. Molecular investigations in western Palearctic water frogs. *Italian Journal of Zoology*, 71 (Suppl. 2), 17-23.
- Randi A. S., Monserrat J. M., Rodriguez E. M., Romano L. A., 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish,

- Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). *Journal of Fish Diseases*, 19 (4): 311-322.
- Rassool F. V., McKeithan T. W., Neilly M. E., van Melle E., Espinosa R. III, Le Beau M. M., 1991. Preferential integration of marker DNA into the chromosomal fragile site at 3p14: an approach to cloning fragile sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 88, 6657-6661.
- Razzetti E., Bonini L., Andreone F., 2001. Lista ragionata di nomi comuni degli anfibi e dei rettili italiani. *Italian Journal of Zoology*, 68(3): 243-259.
- Ridgway S. A., Reid D. G., Taylor J. D., Branch G. M., Hodgson A. N., 1998. A cladistic phylogeny of the family Patellidae: (Mollusca: Gastropoda). *Philosophical Transactions Royal Society London. Series B*, 353: 1645-1671.
- Riedl R., 1991. Fauna e Flora del Mediterraneo. Dalle alghe ai mammiferi: una guida sistematica alle specie che vivono nel mar Mediterraneo. *Scienze Naturali*. Muzzio F. (Ed.) 777 pp.
- Rotello R. J., Hocker M. B., Gerschenson L. E., 1989. Biochemical evidence for programmed cell death in rabbit uterine epithelium. *American Journal of Pathology*, 134: 491-495.
- Sahar E., Latt S. A., 1980. Energy transfer and binding competition between dyes used to enhance staining differentiation in metaphase chromosomes. *Chromosoma*, 79: 1-28.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edition). Cold Spring Harbor Lab. Press, New York. Pp 1626.
- Sanità di Toppi L., Gabrielli R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41 (2): 105-130.
- Sà-Pinto A., Branco M., Harris D. J., Alexandrino P., 2005. Phylogeny and Phylogeography of the genus *Patella* based on mitochondrial DNA sequence data. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 325: 95-10.
- Sasaki T., 1998. Comparative Anatomy and Phylogeny of the Recent Archaeogastropoda (Mollusca: Gastropoda). *The University of Tokyo Bulletin*, 38: 1-208.

- Savage J. R. K., 2004. On the nature of visible chromosomal gaps and breaks. *Cytogenetic and Genome Research*, 104: 46-55
- Savolainen V., Cowan R. S., Vogler A. P., Roderick G. K., Lane R. (Eds.), 2005. DNA Barcoding of Life. The Royal Society press., London.
- Schmid M., 1978. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma*, 77: 83-103.
- Schwarzacher T., Heslop-Harrison J. S., 2000. Practical in situ hybridisation. 1st ed. Oxford: Bios Scientific Publishers. 203 pp.
- Sella G., Robotti C. A., Biglione V., 1993. Genetic divergence among three sympatric species of Mediterranean *Patella* (Archaeogastropoda). *Marine Biology*, 115: 401-405.
- Shiraishi T., Druck T., Mimori K., Flomenberg J., Berk L., Alder H., Miller W., Huebner K., Croce, C. M., 2001. Sequence conservation at human and mouse orthologous common fragile regions, *FRA3B/FHIT* and *Fra14A2/Fhit*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 98, 5722-5727.
- Shugart L. R., Theodorakis C., 1996. Genetic Ecotoxicology: The Genotypic Diversity Approach. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113C (2): 273-276.
- Skidmore J. F., Tovell P. W A., 1972. Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout. *Water Research*, 6: 271-230.
- Storelli M., Marcotrigiano M., G., 2005. Bioindicator organisms: Heavy metal pollution evaluation in the Ionian Sea (Mediterranean Sea-Italy). *Environmental Monitoring and Assessment*, 102 (1-3): 159-166.
- Sumner A. T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75 (1): 304-306.
- Sumner A. T., 1994a. Chromosome banding and identification absorption staining. *Methods in Molecular Biology*, 29: 59-81.
- Sumner A. T., 1994ab. Chromosome banding and identification. Fluorescence. *Methods in Molecular Biology*, 29: 83-96.

- Tao S., Li H., Liu C. S., Lam K. C., 2000. Fish uptake of inorganic and mucus complexes of lead. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46: 174–180.
- Thiriot-Quièvreux C., 2002. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. *Cahiers de Biologie Marine*, 43: 17-26.
- Thiriot-Quièvreux C., 2003. Advances in chromosomal studies of gastropod molluscs. *Journal of Molluscan Studies*, 69:187-201.
- Timpanaro A, Orecchio S., Culotta L., Mannino M. R., Gianguzza A., Sarà ., 2006. Variazione dei livelli di concentrazione di IPA in *Patella caerulea* nelle acque costiere siciliane. *Biologia Marina Mediterranea*, 13: 356-357.
- Torelli A., 1982. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane AQ/1/96. 8. Gasteropodi Conchigliati. *Consiglio Nazionale delle Ricerche*, pp. 43-45.
- White M. J. D., 1973. *Animal Cytology and Evolution*. Cambridge University Press. 960 pp.
- Wyllie A. H., 1981. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: I. D. Bowen & R. A. Lockshin, Editors. *Cell Death in Biology and Pathology*. Chapman & Hall. London, 934 pp.
- Wyllie A. H., Kerr J. F. R., Macaskill I. A. M., Currie A. R., 1973. Adrenocortical cell deletion: The role of ACTH. *The Journal of Pathology*, 111: 85-94.
- Yunis J. J., Soreng A. L., 1984. Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 226: 1199-1204.