



Università degli Studi di Padova

Facoltà di Facoltà di Agraria, di Medicina e Chirurgia e di Medicina
Veterinaria

Corso di Laurea magistrale interfacoltà in

Biotecnologie per l'Alimentazione

Tesi di Laurea

Identificazione di biomarcatori di inquinamento nella vongola (*Ruditapes philippinarum*) mediante l'uso di DNA microarray

Relatore: Prof.ssa Cardazzo Barbara

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria

Correlatore: Dott. Milan Massimo

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria

Laureando: Maria Antonella Sammartino

Matricola: 623145/BAL

ANNO ACCADEMICO 2010/11

Indice

Riassunto	4
Introduzione.....	5
<i>Ruditapes philippinarum</i>	16
Anatomia e fisiologia.....	17
Presenza di <i>Ruditapes philippinarum</i> in Italia	19
Disegno del microarray di <i>R. philippinarum</i>	20
La metodica di Real Time PCR.....	21
Obiettivi.....	24
Materiali e metodi.....	25
Campionamento.....	25
Procedimento di estrazione dell'RNA mediante QIAGEN <i>RNeasy KIT</i>	26
Analisi mediante tecnologia DNA MicroArray Agilent Technologies	30
Protocollo di marcatura dell'RNA Agilent Quick Amp Labeling Kit, Agilent Technologies.....	30
Preparazione della mix di <i>spike</i>	31
Preparazione dei campioni	31
Sintesi del cDNA a doppio filamento.....	32
Sintesi del cRNA marcato	32
Purificazione del cRNA marcato.....	33
Quantificazione dell'incorporazione di Cy3 tramite il NanoDrop.....	33
Ibridazione dei campioni di cRNA marcato su DNA MicroArray	33
Lavaggi della <i>slide</i>	34
Acquisizione dei dati ed analisi statistica.....	35
Analisi funzionale di geni differenzialmente espressi.....	36
Validazione della piattaforma microarray mediante RT-Real-Time PCR.....	36
Risultati e discussione	42
Estrazione dell'RNA, composizione dei pool e analisi della qualità mediante Bioanalyzer 2100 <i>Agilent Technologies</i>	42
Ibridazione e processazione dei campioni.....	42
Analisi dei valori di espressione genica mediante TmeV.....	43

Analisi dei valori di espressione genica tramite l'utilizzo di SAM.....	45
Analisi mediante l'utilizzo di DAVID(<i>Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis</i>)	47
Analisi mediante PAM	50
Validazione mediante qRT PCR	56
Test statistico di Mann-Whitney	56
Correlazione statistica <i>Spearman rho</i>	58
Conclusione	59
Bibliografia	60
Risorse informatiche:.....	74

Riassunto

La laguna di Venezia è un ecosistema costiero minacciato dagli effetti dell'impatto antropico. Le sue acque contengono infatti alte concentrazioni di inquinanti di derivazione industriale, principalmente a causa della stretta vicinanza con il polo industriale di Marghera; a questo si aggiungono i centri urbani di Venezia e Chioggia, gli scarichi agricoli e il traffico marittimo per fini commerciali e turistici. Per le cause sopraelencate i livelli di inquinanti nei sedimenti superficiali della Laguna di Venezia hanno spesso superato i limiti imposti dalla SQG ("Sediment Quality Guideline"). Gli inquinanti rilevati in questo ecosistema lagunare sono: policlorobifenili (PCB), diossine e furani (PCDD/F), idrocarburi policiclici aromatici (IPA), DDT e metalli pesanti (Magistrato delle Acque di Venezia, 2008). In questo scenario, il monitoraggio dei livelli di inquinamento chimico e degli effetti biologici in specie sentinella, rappresenta un ruolo chiave al fine di garantire la sicurezza dei consumatori e per valutare gli effetti dell'impatto antropico. L'utilizzo di moderne metodiche biomolecolari può consentire infatti l'identificazione di biomarcatori di inquinamento e valutare la risposta fisiologica di organismi all'esposizione di inquinanti. L'obiettivo generale del progetto è stato quello di sviluppare un approccio integrato volto allo studio degli effetti degli inquinanti chimici e dell'impatto in popolazioni naturali di vongola *Ruditapes philippinarum*, attraverso l'analisi del trascrittoma. Lo studio ha permesso di comparare l'espressione genica di popolazioni di *R. philippinarum* provenienti da aree della Laguna caratterizzate da diversi livelli di inquinamento chimico. Considerato il divieto di raccolta di vongole nell'area del Petrolchimico di Marghera, si è inoltre identificato un set di trascritti in grado di predire, sulla base dei valori di espressione genica rilevati, la provenienza di *R. philippinarum* da quell'area. L'utilizzo della piattaforma *microarray*, ha dimostrato, in base ai risultati ottenuti, la sua validità come strumento d'indagine in ambito tossicogenomico e nell'identificazione di possibili biomarcatori di inquinamento. Nonostante le limitazioni nell'annotazione dei trascritti, nuove informazioni sono state ottenute identificando un ampio set di geni potenzialmente coinvolti nella risposta cellulare a stress ambientali.

Introduzione

Tra i molluschi eduli lamellibranchi presenti nelle acque mediterranee, il genere *Ruditapes* occupa da sempre un posto di notevole importanza commerciale. Ad oggi in Italia il suddetto genere è rappresentato prevalentemente da due specie: *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum*. Mentre la prima è una specie autoctona, diffusa nel mar Mediterraneo, *Ruditapes philippinarum* è una specie endemica in Giappone, Corea e Filippine, introdotta accidentalmente nel 1930 in Nord America ed in seguito importata volontariamente in Francia ed in Italia (FAO Fisheries and Aquaculture Department FAO). Nelle acque italiane la specie si è del tutto acclimatata ed ha iniziato a riprodursi naturalmente, dapprima nelle aree della laguna veneziana, dove era stata introdotta, ed in seguito nel Delta del Po, grazie allo spostamento del seme per effetto delle correnti marine. Ad oggi, *Ruditapes philippinarum* ha quasi completamente soppiantato la vongola autoctona e costituisce in Italia e nella Laguna di Venezia la specie maggiormente diffusa; insediandosi anche in zone non adibite alla pesca. *Ruditapes philippinarum* è un organismo filtratore e un efficace bioindicatore in grado di accumulare una vasta gamma di contaminanti, risultando tollerante alla loro presenza nell'ambiente, ma non insensibile. In essa è quindi possibile osservare le modifiche dell'espressione genica indotte dalla presenza di contaminanti nelle acque prescritte alla pesca. Queste sue caratteristiche l'hanno resa un modello molto utilizzato nelle indagini eco tossicologiche, nelle quali questa specie viene utilizzata come indicatore della qualità ambientale (Moraga et al, 2002; Li et al, 2006; Ramos-Gomez et al, 2011; Moschino et al, 2010; Martin-Diaz et al, 2007; Matozzo et al., 2010; Blasco e Puppo, 1999).

L'utilizzo di una metodica di *DNA microarray*, da affiancare alle metodiche classiche, quali i test enzimatici e biochimici, permetterebbe una visione più ampia degli effetti degli xenobiotici ambientali. Mediante questa tecnologia è possibile infatti osservare eventuali differenze nel trascrittoma di individui sottoposti a stimoli diversi e, se applicato ad individui sottoposti ad inquinanti ambientali, è in grado di consentire l'identificazione di particolari geni, denominati biomarcatori, in grado non solo di individuare la presenza di contaminanti, ma anche di permettere l'identificazione dell'origine dell'animale campionato, dimostrandosi in questo senso un utile strumento di prevenzione delle frodi alimentari. Lo

studio con DNA *microarray* si prefigge quindi l'obiettivo di poter essere un metodo d'indagine alternativo rispetto alle classiche analisi chimiche attualmente in uso.

Lo scopo del seguente progetto di tesi è stato quello di determinare l'impatto umano sull'ecosistema lagunare ed in particolare i possibili effetti dell'inquinamento sulla fisiologia di una specie sentinella – *R. philippinarum* –. Il progetto ha mirato inoltre all'identificazione di un set di biomarcatori di inquinamento, in grado di assegnare ciascun individuo campionato alla sua popolazione di origine sulla base dei valori di espressione genica. Questa parte del progetto ha quindi riguardato l'ambito della sicurezza alimentare ed il rispetto delle informazioni fornite al consumatore al termine della filiera produttiva: lo studio condotto rientra quindi nell'ambito del monitoraggio ambientale – in quanto fornisce un'analisi delle condizioni degli ecosistemi marini nel tempo e nello spazio ed una valutazione della presenza degli xenobiotici e dei loro effetti sugli organismi – ed, al contempo, rientra nel filone della sicurezza alimentare – validando uno strumento che mira a rintracciare il prodotto, in modo da scongiurare il rischio che alimenti provenienti da aree contaminate e prescritte alla pesca arrivino sulla tavola del consumatore finale – .

Ecotossicologia

L'ecotossicologia è una branca della tossicologia che si occupa dello studio degli effetti tossici, causati da inquinanti naturali o sintetici, sui costituenti degli ecosistemi, animali, vegetali e microbi, in un contesto integrale (*Butler, 1978; Truhaut, 1969*). Questa scienza, utilizzando metodi e concetti propri della tossicologia, applica i principi dell'ecologia e della chimica ambientale allo studio degli effetti delle sostanze tossiche sugli ecosistemi. Inoltre, si pone come obiettivo quello di studiare i meccanismi di distribuzione dei tossici a livello ambientale, correlandolo al grado di esposizione a cui sono sottoposti gli organismi che vivono in un dato habitat e monitorando le modifiche che possono rilevarsi in questi ultimi, in modo da fornire una stima del rischio ambientale (*Galli et al., 2008*).

Ad oggi l'ecotossicologia si preoccupa di definire test biologici necessari per un approccio predittivo, utilizzando le analisi come strumento previsionale per la valutazione del rischio ambientale (studi di biomonitoraggio). Un saggio ecotossicologico si basa quindi sull'utilizzo di una prova di laboratorio in grado –previa identificazione di un sistema biologico o organismo vivente come bersaglio – di mirare all'identificazione in quest'ultimo di variazioni dovute alla presenza di xenobiotici. Diversi studi in questi ultimi anni hanno

riguardato quest'ambito (Hahn, 2002; Ramos-Gomez et al., 2011; Banni et al., 2005; Moschino et al., 2010; Martin-Diaz et al., 2007; Li et al., 2006; Maffiotti et al. 1997).

Le sostanze tossiche immesse nell'ambiente a causa di attività antropiche, spesso vi permangono e, venendo a contatto con gli organismi viventi, sono causa di fenomeni di accumulo lungo la catena trofica. Il biomonitoraggio si inserisce in questo contesto con l'obiettivo di stimare, prevedere ed evitare particolari eventi dannosi a livello ecologico, attraverso l'utilizzo di "segnali precoci", quali i *biomarkers* d'esposizione o d'effetto (Manning e Fender, 1980; Epifani, 2009) – . Lo studio degli effetti sugli organismi esposti a diversi livelli di xenobiotici presenti nell'ambiente ed il confronto con i livelli di contaminanti riscontrati in questi ultimi e quelli definiti per legge, permette di quantificare, e quindi definire, i livelli di xenobiotici presenti, tramite studi di bioconcentrazione, biomagnificazione e bioaccumulo lungo la catena trofica (Lalli e Parson, 1993). In quanto organismo filtratore, trattando della vongola, bisogna prendere in esame questi tre concetti, che interessano questo tipo di organismo, rendendolo un ottimo soggetto per lo studio degli effetti degli inquinanti sugli organismi marini.

Il termine bioconcentrazione si riferisce all'assorbimento di una sostanza dal mezzo circostante (di solito acqua), in maniera tale che le concentrazioni della sostanza nei tessuti dell'organismo diventino più alte di quelle presenti nell'ambiente circostante, anche in relazione al contenuto di grassi presente nello stesso (ARPA Emilia Romagna, 2010; Lake J.L. et al., 1990; Borgå K et al., 2005). Esempi di studi di bioconcentrazione sono quelli in cui vengono misurate le concentrazioni di inquinanti (metalli pesanti, PCB, ecc) negli organismi bioindicatori. Nel caso in cui gli studi di bioconcentrazione prendano in esame più livelli trofici, è possibile parlare di biomagnificazione. Con questo termine si intende l'aumento della concentrazione di un composto, assorbito con la dieta, all'interno degli organismi, dal basso verso l'alto, della piramide alimentare. Per effetto della biomagnificazione diviene potenzialmente pericoloso mangiare quindi animali predatori e di grossa taglia (ad es. pesci come i tonni), in quanto, essendo al vertice della piramide alimentare, accumulano grandi quantità di sostanze da ritenersi tossiche (Oliver and Niimi, 1988; EPA, 2000; Bayarri et al., 2001). Per bioaccumulo si intende invece il processo che provoca un incremento della concentrazione chimica di un composto xenobiotico, in un organismo acquatico rispetto alla concentrazione presente in acqua, dipendente da tutte le

vie d'esposizione: attraverso le superfici respiratorie ed il derma e l'assunzione attraverso il cibo (ARPA Emilia Romagna, 2010).

Organismi sentinella o bioindicatori

Per "organismo sentinella" si intende un qualsiasi organismo che, mediante risposte identificabili a condizioni di stress (biochimiche, fisiologiche, morfologiche, ecc.), è in grado di fornire informazioni sulla qualità dell'ambiente e sui suoi cambiamenti (*Iserentant e De Sloover*, 1976). La presenza in ambiente di uno o più agenti inquinanti determina infatti variazioni misurabili sulla fisiologia, sulla morfologia o sulla distribuzione di un determinato organismo. I bioindicatori possono pertanto costituire un segnale di "allerta precoce" di inquinamento, evidenziabile prima che questo si manifesti sull'intero ecosistema. Affinché un organismo possa essere definito un buon bioindicatore deve possedere alcune caratteristiche fondamentali, quali: facile reperibilità stagionale e ampia distribuzione nell'area di studio, lungo ciclo vitale per poter confrontare fra loro diverse classi d'età, sessilità, scarsa mobilità, capacità di bioaccumulare notevoli concentrazioni di inquinanti e omogeneità genetica (*Zhou et al.*, 2008). In questi anni si è mirato all'utilizzo di un nuovo approccio metodologico, che si basa sull'utilizzo di questi bioindicatori, valutando le risposte che un organismo, una popolazione o una comunità naturale può generare, nei confronti di uno stress ambientale. Dopo che è stata dimostrata l'importanza di questi bioindicatori, ci si è orientati verso lo sviluppo e l'utilizzo di metodologie di biomonitoraggio tramite *biomarker*, con l'individuazione di un pool di organismi con specifiche caratteristiche che li rende idonei ad essere utilizzati efficacemente nelle campagne di biomonitoraggio.

Tra gli organismi sentinella più utilizzati con questo scopo nei programmi di biomonitoraggio dei sistemi acquatici, sono molluschi sessili filtratori, che possono accumulare xenobiotici, fornendo informazioni utili sulla presenza di inquinanti.

Contaminanti ambientali presenti nella laguna di Venezia

È ormai noto come, a partire dal XVII secolo, il forte sviluppo industriale avvenuto nell'area di Porto Marghera abbia determinato un rapido aumento dell'inquinamento delle acque della Laguna: ad oggi, infatti, contengono alte concentrazioni di inquinanti organici persistenti o POP (Persistent Organic Pollutants) (*Apitz et al.*, 2007, *Matozzo et al.*, 2010).

Numerosi studi condotti negli ultimi anni (*Orio e Donazzolo, 1987, Albani et al., 1995, Frignani et al., 1997, CNR-IGM 2000, Apitz et al., 2007*) hanno dimostrato la presenza, nella Laguna, di una vasta gamma di contaminanti, principalmente causata dall'idrodinamica lagunare che, attraverso onde e correnti, disperde le sostanze tossiche rilasciate dagli scarichi industriali. I livelli di inquinanti nei sedimenti di superficie della Laguna di Venezia hanno spesso superato i limiti imposti dalla SQG ("*Sediment Quality Guideline*"), soprattutto per metalli come il mercurio (Hg) (*Apitz et al., 2007*). Gli inquinanti principali presenti in questo ecosistema sono: policlorobifenili (PCB), diossine (PCDD, PCDF, TCDD), Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), DDT e altri composti clorurati, mercurio (Hg), cadmio (Cd), zinco (Zn), rame (Cu), piombo (Pb), arsenico (As) (*Magistrato delle Acque di Venezia, 2008*).

I Bifenili policlorurati sono normalmente identificati con l'acronimo PCB. La presenza dei PCB è ubiquitaria e tende ad accumularsi lungo le catene trofiche, depositandosi nelle campagne, nelle acque e nei sedimenti, causando problemi per la salute pubblica. Sono caratterizzati da elevata lipofilia, semivolatilità e resistenza alla degradazione. La loro persistenza è dovuta alla protezione fornita dall'acqua sovrastante, che scherma le molecole dall'azione degradativa dei raggi UV. A differenza delle diossine, prodotto indesiderato nei processi chimici e di combustione, i PCB sono sintetizzati per diversi utilizzi in modo intenzionale, in sistemi chiusi (fluidi dielettrici, olio isolante in apparecchiature elettriche, condensatori, conduttori di calore negli apparecchi per il riscaldamento ed il raffreddamento) o aperti (additivi per antiparassitari, ritardanti di fiamma e vernici). Benchè la commercializzazione e l'utilizzo di questi composti sia vietato per legge dal 1985, la contaminazione ambientale in seguito ad incidenti, scarichi illeciti e smaltimento inadeguato è stata tale per cui si è arrivati ad avere una profonda contaminazione della catena trofica. Oltre ad essere composti teratogeni e neurotossici sono considerati "*endocrine disruptors*", in quanto presentano somiglianze con gli estrogeni e determinano una riduzione della concentrazione plasmatica degli ormoni tiroidei. La loro ossidazione parziale, che può avvenire per combustione incompleta, può originare diossine clorate (TCDD).

Le diossine – nominate precedentemente – sono una classe di composti organici aromatici clorurati, la cui struttura consiste di due anelli benzenici, legati da due atomi di ossigeno e legati con uno o più atomi di cloro. Sono catalogati come cancerogeni di gruppo 1 dalla

IARC (*International Agency for Research on Cancer*). La tossicità di questi composti viene espressa, in risultanza di prove effettuate *in vitro* ed *in vivo*, secondo un fattore di Tossico Equivalenza, denominato TEF. Questo fattore di equivalenza si è reso necessario poiché sono quasi sempre trovate in miscele complesse ed è quindi stata sviluppata un'unità di misura per facilitare la valutazione del rischio ed il controllo regolamentare, in cui ad un più alto numero di congeneri tossici dei PCB vengono assegnati più alti valori TEF. Uno dei composti più tossici noti è il 2,3,7,8 – tetraclorodibenzo[p]diossina (2,3,7,8 – TCDD) a cui viene assegnato un TEF di 1.

Un'altra tipologia di xenobiotici presenti nelle acque della Laguna sono i residui dei pesticidi organoclorurati, derivati dall'agricoltura. L'esempio più tristemente famoso di questa classe di composti è il DDT. Questo composto costituisce un pericolo per le specie acquatiche e date le caratteristiche altamente idrofobiche tende ad accumularsi in organismi al vertice della catena alimentare. La IARC lo classifica all'interno del gruppo 2B di cancerogenicità, mentre il suo metabolita DDE è in grado di interagire con il recettore degli androgeni provocando disfunzioni endocrine ("*Endocrine Disrupting Compound*").

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono una famiglia di composti lipofili del carbonio che contengono due o più anelli aromatici; la loro produzione avviene principalmente nelle aree urbane a partire dai rifiuti. Il più noto tra gli IPA è il benzo[a]pirene, che è stato classificato nel gruppo 1 dei cancerogeni dalla IARC.

I metalli pesanti sono sostanze presenti nell'ambiente in qualità di elementi costitutivi dello stesso, nonché introdotti in seguito ad emissioni di tipo industriale. L'attività umana rappresentata dalle industrie, dagli insediamenti urbani (intesi in particolare come scarichi di reflui e di impianti di depurazione degli stessi), dalle attività di miniera e agricole; comportano un rilascio (nell'aria, nel terreno e nelle acque) di notevoli quantitativi di metalli (in particolare Cd, Zn, Pb, e Hg), che passano direttamente, per dilavamento dai terreni o legati ai sedimenti, nei bacini acquatici. Qui possono subire trasformazioni biologiche e chimiche, che ne comportano un accumulo nell'ambiente (sotto forma di sedimenti) e negli organismi, sia vegetali che animali, esplicando così la loro azione inquinante. Questi, in basse dosi sono in grado di provocare sintomi come: poliuria, amminoaciduria, glicosuria. Ad alte dosi invece causano: anuria, necrosi del tessuto renale, blocco renale fino al coma e successiva morte. Alcuni, come il Cadmio, svolgono azione cancerogena.

La vita a contatto con questo tipo di inquinanti, espone gli organismi acquatici presenti al manifestarsi di effetti nocivi per la loro salute ma anche per quella del consumatore finale, che di essi si ciba. Molti sono stati gli sforzi della comunità scientifica tesi a sviluppare dei test affidabili, riproducibili e al tempo stesso economici, allo scopo di studiare gli effetti biologici dei contaminanti negli organismi acquatici nella Laguna. Molti studi in questione si sono focalizzati su sperimentazioni basate su test biochimici o molecolari e istopatologici, in grado di rivelare l'esposizione a diverse classi di inquinanti chimici (Matozzo, 2005; Da Ros et al, 2002; Nasci et al, 2002; Galloway et al, 2004; Nigro et al, 2006; Matozzo et al, 2010). In uno studio condotto da Pascoli et al. (2011) sono stati esaminati i biomarker dello stress ossidativo, prelevando campioni di *Zosterisessor ophiocephalus* (ghiozzo) in tre siti diversi della laguna: Porto Marghera, Val di Brenta e Cà Roman. L'indagine ha permesso di osservare che gli animali provenienti dal sito di Porto Marghera sono quelli che esprimono in misura maggiore alcune proteine coinvolte nei processi di risposta allo stress ossidativo provocato dagli xenobiotici. In un'altro studio (Nesto et al., 2007) si è scelto di sviluppare un'approccio *multibiomarker* in *R. philippinarum*: i campioni sono stati raccolti in 8 siti della Laguna (Campalto, Marghera, Palude del Monte, Valle di Brenta, Cà Roman, San Servolo, Fusina e Canale Dese), diversamente influenzate dall'impatto antropico. Tra i test effettuati si è misurata: l'attività dell'acetilcolinesterasi e il contenuto di proteine "vitellogenina-like" per valutare i livelli d'esposizione a composti estrogenici. Inoltre, mediante analisi chimiche, sono stati misurati i livelli di: bifenili policlorurati (PCB), idrocarburi policiclici aromatici (IPA), 1,1,1-tricloro-2,2-bis (p-clorofenil) etano (p, p'-DDT) e dei suoi prodotti di degradazione (DDE, DDD), esaclorobenzene (HCB) e esaclorocicloesano (HCH). I risultati dello studio hanno dimostrato che l'approccio integrato tra *biomarker* e analisi chimiche è uno strumento utile nel biomonitoraggio della Laguna di Venezia. Le risposte relative ai *biomarker* hanno suggerito livelli di contaminazione molto simili in tutta la laguna, anche se l'impatto relativo delle diverse classi di inquinanti risultava essere diverso tra i siti, in base alle potenziali fonti di inquinamento, come avvalorato dalle analisi chimiche (Matozzo et al., 2010). Altri studi, che hanno preso in considerazione la specie *R. philippinarum* ma anche altre specie, come *Mytilus galloprovincialis* e *Zosterisessor ophiocephalus*, hanno ottenuti risultati simili (Matozzo et al, 2005; Nesto et al., 2007). L'utilizzo di un altro organismo sentinella – *Carcinus aestuarii* (granchio comune) – ha riguardato uno studio, sempre condotto nella Laguna, volto a valutare le concentrazioni chimiche di 42 inquinanti organici (HCH, IPA, PCB, DDT, PBDE), le

risposte biologiche connesse – quali la neurotossicità (inibizione dell'acetilcolinesterasi), i meccanismi di detossificazione (induzione del CYP450) e le alterazioni endocrine (induzione di proteine *vitellogenina-like*). Questo studio di biomonitoraggio ha rivelato negli organismi sentinella una predominanza di DDT e PCB, soprattutto nelle vicinanze dei siti industriali. Le alterazioni endocrine sono state rilevate in molte aree, non soltanto quelle vicine alle industrie, suggerendo la presenza omogenea di composti in grado di interferire con il sistema endocrino del granchio (*Ricciardi et al., 2010*). Sempre in *Carcinus aestuarii* è stato condotto un ulteriore studio (*Locatello et al., 2009*) per misurare tre biomarcatori: acetilcolinesterasi (AChE), proteine *vitellogenina-like* ed ethoxyresorufin O-deethylase (EROD). I risultati hanno rivelato differenze tra i siti in relazione a ciascun biomarker, suggerendo un possibile utilizzo di un set di biomarcatori per discriminare i diversi siti di campionamento, in base alla diversa tipologia di risposta.

Il meccanismo legato alla presenza di inquinanti e, in modo specifico allo stress ossidativo, è stato valutato anche in *Mytilus galloprovincialis*. Gli animali, provenienti da un allevamento posto nella zona di Alberoni – considerata sito pulito – sono state immesse in otto siti diversi della laguna: Palude della Rosa, Campalto, Tresse, Sacca Sessola, S. Pietro in Volta, Valle Millecampi, Cà Roman e Chioggia. Le risposte sono state misurate in termini di attività della catalasi (CAT) – un enzima chiave coinvolto nel sistema di difesa contro i radicali liberi – , della malondialdeide (MDA) – indicatore della perossidazione lipidica – e delle metallothioneine (MT). L'analisi ha rivelato una ridotta capacità nei meccanismi di difesa dell'organismo ed in particolare, l'inibizione dell'attività di CAT, osservata in tutti i siti monitorati, conferma la presenza di una pressione ossidativa nei mitili, dovuta alla presenza di contaminanti (*Pampanin et al., 2005*). I possibili effetti di xenobiotici ad attività estrogenica sono stati indagati ulteriormente in due specie di bivalvi della laguna di Venezia: *R. philippinarum* e *Cerastoderma glaucum*. La quantificazione di proteine *vitellogenina-like* – utilizzato come *biomarker* di esposizione a composti estrogenici – nei bivalvi raccolti ha evidenziato come i più alti livelli di espressione fossero associate a due zone : Campalto (nei pressi di un impianto di trattamento delle acque reflue) e Marghera. Questi dati sono un campanello d'allarme, in quanto l'esposizione a composti estrogenici può comportare riduzione della fertilità, alterazioni del rapporto tra i sessi ed una diminuzione del tasso di riproduzione (*Matozzo e Marin, 2007*).

Tuttavia, l'utilizzo di biomarcatori specifici non può fornire una stima globale degli effetti biologici causati dai diversi inquinanti; inoltre, le interazioni e le sinergie che si instaurano tra i diversi xenobiotici rendono impreciso il monitoraggio mediante lo studio di singoli biomarker. Grazie all'integrazione della tossicologia con la genomica, è possibile ad oggi l'utilizzo di diverse tecniche d'indagine moderne e più accurate rispetto al passato, come la piattaforma DNA *microarray*. Le analisi attuate con questo nuovo metodo d'indagine permettono infatti di ottenere simultaneamente il profilo di espressione di migliaia di geni, in modo da fornire i mezzi per valutare rapidamente l'impatto dei fattori di stress sulle vie biochimiche ed a livello della trascrizione dell'mRNA. Alcuni studi su diversi organismi modello hanno già messo in evidenza le potenzialità di questo nuovo approccio nella Laguna (*Milan et al., 2011; Venier et al., 2006*).

Biomarker

Negli ultimi decenni i *biomarker* sono stati ampiamente utilizzati in indagini ecotossicologiche poiché forniscono rapide e precise informazioni sugli effetti prodotti da composti inquinanti su popolazioni e/o comunità. A partire dagli anni '70, con i primi studi ecotossicologici nell'ambiente marino (*Bayne et al., 1976; Payne, 1977*), i biomarkers hanno trovato applicazione in moltissime branche della medicina e dell'ecologia, come dimostra il crescente numero di pubblicazioni scientifiche sull'argomento (*Shugart, 1990; Depledge M.H. e Fossi M.C., 1994; Au, 2004*).

Nel corso degli anni sono state proposte molte definizioni, ma un *biomarker* è in essenzialmente una sostanza utilizzata come indicatore di uno stato biologico. E' una caratteristica che è oggettivamente misurata e valutata come un indicatore di normali processi biologici, patogeni, stressanti o in risposte farmacologiche ad un intervento terapeutico. Tra le varie definizioni coniate può essere citata quella formulata dalla *National Academy of Science (NRC, 1989)* che descrive il *biomarker* come: "[...] quella variazione, indotta da un contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura o di una funzione, che può essere misurata in un sistema biologico". Questo termine individua quindi una serie di risposte biologiche innescate dalla presenza di stimoli stressanti, misurando parametri fisiologici, biochimici e morfologici, analizzati a livello cellulare, tissutale o dell'intero organismo.

Un *biomarker*, per essere definito tale, deve possedere alcune caratteristiche essenziali: deve essere innanzitutto sensibile alla presenza di uno o più contaminanti, al fine di fornire informazioni relative alla tossicità di una sostanza a concentrazioni inferiori a quelle pericolose per l'organismo. Anche la specificità biologica deve essere tenuta in considerazione: alcuni *biomarker* possono rispondere soltanto in certi gruppi animali e non in altri, mentre alcuni possono essere applicati universalmente. Inoltre occorre tenere in considerazione il grado di specificità chimica: alcuni *biomarker* sono sensibili a un singolo composto, altri invece indicano l'esposizione dell'organismo a una classe di composti (ad es. l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi, che viene inibita dagli esteri organofosforici), altri ancora vengono modificati da differenti inquinanti, in maniera non specifica.

In sintesi, l'utilizzo di biomarker permette lo studio delle risposte immediate degli organismi "bioindicatori" e la previsione di effetti negativi a lungo termine anche su scala ecologica. Dall'utilizzo dei *biomarker* non si hanno informazioni quantitative sull'esposizione ad un dato contaminante, ma sulle modifiche indotte sull'organismo sottoposto all'azione dell'inquinante. Questo approccio metodologico si fonda sull'intercorrelabilità degli effetti di un contaminante ai vari livelli di organizzazione strutturale; ovvero, parte dal presupposto che la tossicità di un dato composto si eserciti prima a livello biochimico e molecolare e solo successivamente a livello di organismo (Bayne et al., 1985).

Secondo la suddivisione proposta da McCarthy e Shugart (1990) i biomarcatori si distinguono in specifici e generici. I biomarcatori specifici sono le risposte identificate a seguito di un legame specifico tra il contaminante e un sito d'azione, come ad es. i recettori di membrana, gli acidi nucleici o specifiche regioni proteiche (Lam e Gray, 2003). I biomarcatori generici sono invece le risposte dell'organismo associabili ad uno stato generale di stress, dovuto alla presenza del contaminante nell'ambiente ed alle relative variazioni chimico-fisiche e fisiologiche dell'organismo. Sono quindi da considerarsi biomarcatori generici lo "Scope for growth", ovvero la differenza tra l'energia assimilata ed i costi del metabolismo, o le alterazioni istopatologiche (Losso e Volpi Ghirardini, 2010). Un'ulteriore classificazione divide i *biomarker* in due diverse categorie: d'esposizione e d'effetto. Per biomarcatori di esposizione vengono intese tutte le risposte di un organismo che indicano l'esposizione ad un composto chimico o ad una classe di composti chimici, ma che non forniscono nessuna indicazione sui reali effetti tossicologici sull'organismo. I biomarcatori di effetto sono invece tutte quelle risposte di un organismo, ai diversi livelli di

complessità strutturale, che indicano sia l'esposizione ad un composto tossico che il suo effetto tossicologico, ma le risposte associate non possono essere collegate alla presenza di specifici contaminanti (*Hahn M.E., 2002. Losso e Volpi Ghirardini, 2010*).

Lo studio delle risposte messe in atto dagli organismi esposti alla contaminazione dell'ecosistema in cui vivono, si basa ovviamente sulle conoscenze delle funzioni fisiologiche degli organismi stessi e sulle loro alterazioni conseguenti alla presenza del contaminante. I *biomarker* purtroppo, come già accennato precedentemente, non sono in grado di fornire informazioni di tipo quantitativo riguardo alla contaminazione ambientale, ossia non permettono di stabilire la concentrazione di un inquinante, o tanto meno di una miscela di inquinanti; ma le loro variazioni sono correlate alla gravità dell'insulto. I *biomarker* infatti possono fornire informazioni riguardo i livelli e la tipologia (acuto o cronico) dell'inquinamento. Possono inoltre verificare in tempo reale il buon esito di eventuali azioni di risanamento ambientale. Tuttavia, la variabilità biologica degli organismi viventi non consente di effettuare, ai fini del biomonitoraggio, un'analisi esaustiva servendosi di un singolo *biomarker*. Un singolo parametro relativo ad un singolo biomarcatore, infatti, può essere soggetto alla variabilità intrinseca di ciascun organismo e può fornire talvolta risultati ambigui, causando sovrastime o sottostime della situazione reale. Per una maggior efficacia dei saggi biologici volti alla valutazione della qualità ambientale è necessario, quindi, l'impiego di un set di *biomarker* al fine di produrre un risultato integrato, che da un lato minimizzi gli effetti della variabilità biologica e dall'altro sia confermato da più di una indagine. Proprio per questo l'analisi dei *biomarker* si associa spesso alle normali analisi previste per legge, in modo che l'integrazione dei risultati ottenuti dalle due tipologie di analisi, condotte in parallelo, possano fornire un quadro esaustivo e completo delle condizioni di ambienti complessi e dell'origine spazio-temporale di determinati inquinanti (*M. Vighi, E. Bacci, 1998 e M.C. Fossi, 2000*). I biomarcatori possono essere utilizzati sia in studi di biomonitoraggio passivo – confrontando le risposte evidenziate in organismi campionati in un'area contaminata e in un'area di riferimento – , sia in studi di tipo attivo – con il trasferimento di bioindicatori in un'area di studio per un tempo sufficiente da indurre l'insorgere di una variazione.

In sintesi, quindi, si può dire che l'utilizzo dei *biomarker* fornisce la possibilità di diagnosticare il tipo e/o i tipi di contaminanti ai quali l'organismo bioindicatore è sottoposto, attraverso lo studio delle risposte immediate (induzione sistemi detossificanti, inibizioni,

attività enzimatiche, formazione prodotti metabolici, alterazioni del DNA, ecc.) e che è quindi in grado, su larga scala, di prevedere il verificarsi di effetti negativi lungo la scala ecologica. Tuttavia, essi non sono in grado di fornire una quantificazione della presenza degli inquinanti. Nel valutare le risposte ottenute da questo approccio metodologico si deve però tenere presente che esistono, oltre ai contaminanti eventualmente presenti nell'ambiente, altri fattori di tipo fisiologico, comportamentale o ambientale che possono alterare il segnale fornito dalle analisi sui bioindicatori e portare ad interpretazioni errate. Alcune reazioni enzimatiche, ad esempio, subiscono modificazioni in funzione dello stato ormonale, dell'età, della dimensione e del sesso dell'organismo considerato, assunto come "sentinella". Questi limiti possono tuttavia essere superati con una buona conoscenza delle caratteristiche fisiologiche e del ciclo biologico di quest'ultimo.

Ruditapes philippinarum

Ruditapes philippinarum (nota anche come vongola filippina) è una specie subtropicale del Pacifico occidentale ed è distribuita nelle zone temperate d'Europa. Popolazioni selvatiche si trovano nelle Filippine, nei mari del sud e dell'est della Cina, nel Mar Giallo, nel Mar del Giappone. Di notevole valore commerciale, le vongole veraci filippine sono state introdotte in varie parti del mondo, dove, grazie alla loro notevole resistenza, si sono stabilite.

Questa specie è stata introdotta dapprima nel 1972 in Francia, attraverso la produzione in vivaio, ma, in seguito, vi sono state numerose importazioni dagli Stati Uniti verso Portogallo, Irlanda, Spagna e Italia. L'introduzione di *Ruditapes philippinarum* nel nostro Paese, è avvenuta nel

1983, presso la laguna di Venezia. La grande resistenza della vongola filippina ed il suo sviluppo esponenziale hanno causato una diminuzione della prevalenza di specie endemiche come *Ruditapes decussatus*. Di conseguenza,

Ruditapes philippinarum è diventata l'oggetto della pesca intensiva, in concorrenza con gli altri prodotti dell'acquacoltura. Dal 1991, la produzione mondiale di *R. philippinarum* ha mostrato una forte espansione, di un fattore di crescita pari a quasi sei volte. Essa rappresenta oggi una delle principali specie coltivate nel mondo (2.360.000 tonnellate nel solo 2002).

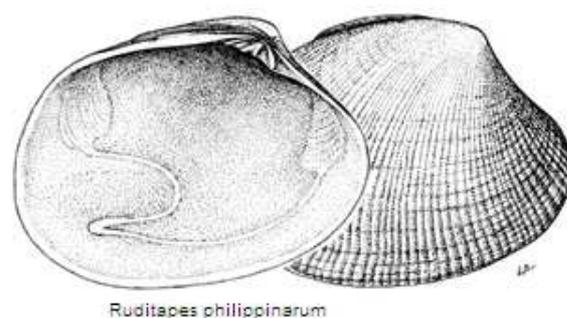


Figura 1: Esempio di *Ruditapes philippinarum* (FAO Fisheries and Aquaculture Department FAO)



Fig.2 Principali Paesi produttori di *Ruditapes philippinarum* (FAO Fishery Statistics, 2006)

La produzione della vongola verace filippina in Italia, dopo la sua introduzione, è la seconda più alta del mondo, con oltre 41 000 tonnellate nel 2002.

Anatomia e fisiologia

I bivalvi sono invertebrati il cui corpo è protetto da una conchiglia composta di due valve unite da una cerniera. Le due valve si articolano tra loro in questa zona, fiancheggiata da ciascun lato dall'umbone, area rilevata che costituisce la parte più vecchia di ciascuna valva.

Nei bivalvi le branchie sono molto sviluppate ed hanno struttura lamellare. Le branchie, oltre ad assolvere alla funzione di organo respiratorio, sono generalmente adibite alla raccolta del cibo mediante il filtraggio dell'acqua attraverso i sifoni; infatti l'alimentazione avviene mediante un processo di filtrazione: l'acqua, immessa all'interno della conchiglia attraverso il sifone inalante, è filtrata dalle branchie nella cavità del mantello. Le branchie sono formate da due serie di filamenti a forma di W e sono divise in una camera inalante – inferiore – ed in una esalante – superiore – . Le ciglia, disposte sui filamenti branchiali e sull'epitelio palleale, creano una corrente d'acqua che convoglia le particelle alimentari verso la bocca (Cesari e Pellizzato 1990).

Il meccanismo di filtrazione dei bivalvi è molto efficace e per questo concentrano ed accumulano nei tessuti sostanze disciolte nell'acqua e quindi anche contaminanti, eventualmente presenti: questa caratteristica rende i Bivalvi una classe di particolare interesse per lo studio della presenza e dell'effetto di inquinanti ambientali.

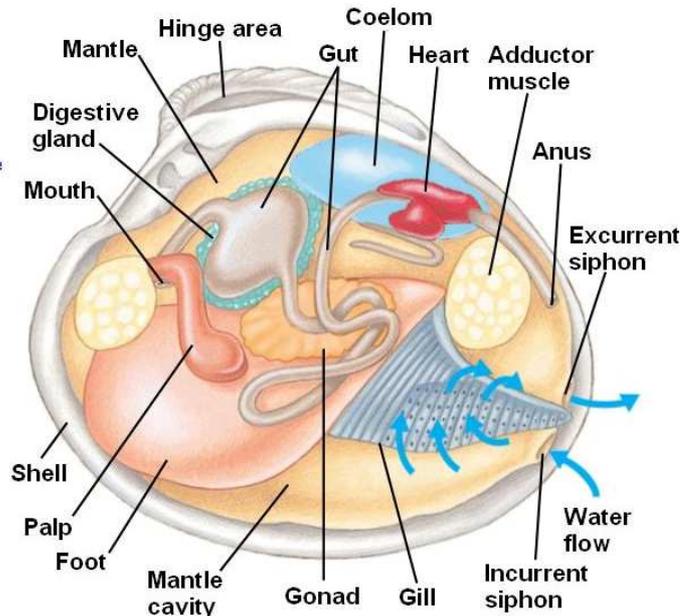


Figura 3: Anatomia interna di una vongola
(<http://www.servinghistory.com>)

Il filtrato è trasportato alla bocca ove le particelle sono raccolte dai palpi labiali e passano nello stomaco attraverso un breve esofago. Lo stomaco è un sacco circondato da una grossa ghiandola digestiva, le cui cellule inglobano il materiale minuto che arriva dallo stomaco e lo digeriscono mediante i loro enzimi endocellulari. L'intestino decorre nel piede e dopo una o più circonvoluzioni, attraversa il pericardio e termina nella cavità posteriore del mantello.

Per quanto riguarda i caratteri morfologici, la conchiglia risulta estremamente variabile nel colore mentre l'interno del guscio è bianco, lucido, con una tinta arancione, a volte color porpora, su una vasta area al di sotto dell'umbone. Questa specie raggiunge la maturità sessuale ad una taglia compresa tra i 15 e i 20 mm, all'età di un anno circa. Il periodo riproduttivo dura da maggio a ottobre con emissione dei gameti ad inizio e fine dell'estate; si ha quindi fecondazione esterna. Segue un periodo di recupero pre-invernale, in cui la vongola accumula riserve filtrando l'acqua ancora ricca di fitoplancton e materia organica disciolta. Il riposo dall'attività sessuale corrisponde alla fine dell'autunno e all'inizio dell'inverno, o in ogni caso a condizioni di acque fredde, povere in fitoplancton e con fotoperiodo in fase calante. Il miglior periodo per l'accrescimento corrisponde all'esplosione del fitoplancton (primavera e autunno), a temperature comprese tra i 10 e i 20°C. Non

esiste dimorfismo sessuale, quindi maschio e femmina sono indistinguibili esternamente ed il sesso può essere determinato solo attraverso l'esame delle gonadi.

R.philippinarum vive in acque salmastre, predilige substrati sabbiosi o limoso-sabbiosi, generalmente compresi tra il livello medio di marea e pochi metri di profondità, in acque tranquille. In quanto organismo filtratore, si nutre prevalentemente di fitoplancton e per questo risulta avvantaggiato in situazioni di eutrofizzazione, raggiungendo spesso dimensioni ragguardevoli, superando addirittura le dimensioni massime date per le zone d'origine (Cesari e Pellizzato, 1990).

Presenza di *Ruditapes philippinarum* in Italia

La molluschicoltura è la principale voce produttiva dell'acquacoltura nazionale, basata quasi esclusivamente sull'allevamento dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) e della vongola verace (*Tapes semidecussatus* o *Tapes philippinarum*).

Per quanto riguarda l'allevamento dei molluschi bivalvi, questo è praticato in aree della fascia marina costiera, a circa 1km di distanza dalla costa, e in aree lagunari. Da alcuni anni, vi è comunque la tendenza a posizionare gli allevamenti a maggiore distanza dalla costa, anche a 4 km, per evitare fenomeni di inquinamento microbiologico e chimico derivanti dalle attività agricole e dai centri urbani della fascia costiera.

Proprio per poter garantire la sicurezza di questo prodotto alimentare, sono state approvate una serie di norme su aspetti igienico-sanitari relativi alla produzione e messa in commercio; in particolare, le zone di produzione vengono delimitate e classificate in base a requisiti microbiologici indicati dalla normativa comunitaria sull'igiene e la sicurezza alimentare (reg. Ce n. 854/2004).

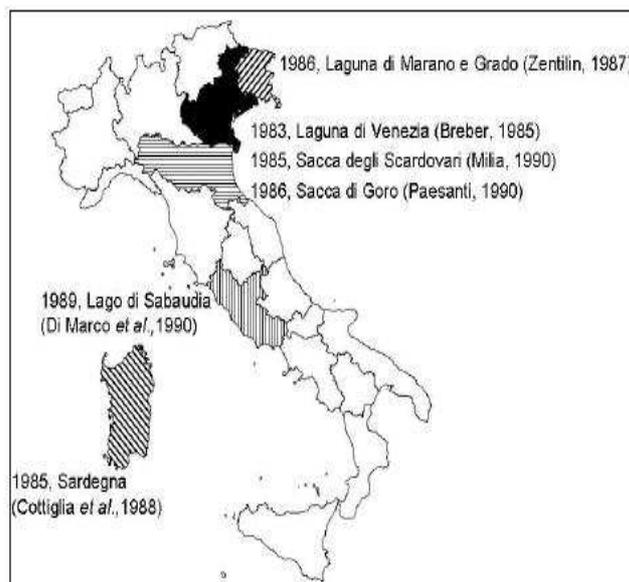


Figura 4: Introduzione della vongola verace (*Ruditapes philippinarum*) in Italia (Adams e Reeve, 1985)

Pertanto, si può distinguere tra:

- **zone di classe A:** da cui possono essere raccolti molluschi bivalvi vivi direttamente destinati al consumo umano; tali molluschi devono soddisfare i requisiti sanitari stabiliti dal reg. Ce n. 853/2004;
- **zone di classe B:** da cui possono essere raccolti molluschi bivalvi vivi, ma che per essere immessi sul mercato ai fini del consumo umano devono subire un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione (le zone di stabulazione sono parti di mare, laguna o estuario, delimitate e segnalate, destinate esclusivamente alla depurazione naturale), in modo da soddisfare i requisiti sanitari richiamati dal suddetto regolamento;
- **zone di classe C:** da cui possono essere raccolti molluschi bivalvi vivi, ma possono essere immessi sul mercato solo previa stabulazione di lunga durata, sino a raggiungere i già richiamati requisiti sanitari.

Tuttavia il problema che si pone è quello relativo alle frodi alimentari, in quanto è plausibile pensare che alcuni quantitativi di vongole provenienti da aree non considerate idonee alla pesca vengano ugualmente immessi illegalmente sul mercato. Questo determina un rischio per il consumatore, il quale deve essere tutelato dagli organi preposti, che si occupano del controllo di filiera e della tracciabilità dei lotti degli animali pescati. In quest'ottica di controllo si inserisce l'uso di biomarcatori specifici, in grado di individuare la salubrità delle acque da cui sono stati pescati gli esemplari, grazie all'analisi dei loro tessuti biologici, come vedremo in seguito.

Disegno del microarray di *R. philippinarum*

Per gli esperimenti effettuati è stata utilizzata una piattaforma DNA *microarray* con formato 8X15000; ciò significa che l'*array* può essere composto da un massimo di 15000 sonde e che in ciascuna slide è data la possibilità di ibridare fino a 8 campioni. La piattaforma disegnata per questo studio conteneva 14156 sonde ed è stata sviluppata a partire dai dati elaborati in uno studio precedente, in cui era stata utilizzata una piattaforma con formato 4X44000 (*Milan et al, 2011*).

Per il disegno del *microarray* sono stati considerati solo i trascritti annotati, di cui già si conosceva l'identità, ed i trascritti le cui differenze di espressione sono risultate

significative nello studio precedente. (Milan et al., in pubblicazione).

La costruzione del DNA *microarray* ha quindi seguito il seguente criterio: disegno di una sonda per ciascun trascritto annotato avente orientamento conosciuto e disegno di due sonde, con entrambi gli orientamenti (senso ed anti-senso), per i trascritti non annotati o con orientamento ignoto. Il disegno delle sonde è stato ottenuto utilizzando l'interfaccia *Agilent eArray* (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>), che è in grado di applicare algoritmi di progettazione relativi al disegno di 60mer *oligo-probes*. I *microarray* sono stati sintetizzati *in situ* usando la tecnologia Agilent "ink-jet".

La metodica di Real Time PCR

La *real-time* PCR (*real-time Polymerase Chain Reaction* ?) è un'evoluzione della PCR classica, messa a punto nella metà degli anni '80 da Mullis et al. (1986), che consente la moltiplicazione – amplificazione – di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere rapidamente, *in vitro*, la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni/analisi. La *real-time* PCR è presto diventata una tecnica d'elezione nel panorama molecolare e, nello specifico, viene ampiamente utilizzata negli studi di espressione genica.

Diversi fattori hanno contribuito alla trasformazione di questa tecnologia in uno degli strumenti analitici e diagnostici di maggior utilizzo: per prima cosa, la capacità di unire, oltre al potenziale qualitativo della PCR tradizionale, anche un'analisi quantitativa, potendo monitorare la reazione per tutta la sua durata; oltre a ciò, questa tecnica è caratterizzata da elevate sensibilità e specificità. La cinetica di una reazione di amplificazione può essere distinta in tre stadi differenti: una prima fase in cui c'è un minimo cambiamento nella quantità del prodotto amplificato; una seconda fase in cui la cinetica di reazione assume un andamento esponenziale, nel quale, idealmente, ad ogni ciclo di amplificazione, la quantità di amplificato raddoppia; ed un'ultima fase, corrispondente agli ultimi cicli di amplificazione, in cui invece, l'efficienza della reazione degenera per consumo dei reagenti, andando incontro ad una fase che viene definita "plateau". La *real time* PCR permette di seguire la reazione nel suo sviluppo, determinando ad ogni ciclo di amplificazione, il livello di prodotto amplificato ottenuto. Questo è possibile in quanto la tecnica è in grado di rilevare e quantificare le molecole fluorescenti, presenti nella miscela di amplificazione. Queste,

legandosi agli amplificati, emettono un segnale luminoso, che aumenta in modo proporzionale all'aumentare dei prodotti di reazione. Nella fase esponenziale dell'amplificazione, le differenze nelle quantità iniziale di template, sono quindi avvertibili mediante la separazione delle curve di amplificazione e sono quantificabili comparando il numero di cicli richiesti dalla curva del singolo campione per raggiungere una particolare soglia di fluorescenza, denominata "*threshold*". Il numero di cicli necessari per raggiungerla è chiamato "ciclo *threshold*".

Per la rilevazione dell'amplicone si utilizzano coloranti e sonde fluorescenti. Nel primo caso, si tratta di sostanze intercalanti il DNA ed il composto maggiormente utilizzato in questo senso è il *SYBR Green*. Questo colorante non possiede fluorescenza se è presente libero in soluzione, ma emette segnale nel momento in cui si intercala al DNA a doppio filamento, di conseguenza, il valore di fluorescenza aumenta in proporzione alle molecole di prodotto sintetizzate. Il *SYBR Green* è molto utilizzato in quanto è molto economico, ma ha il limite di non permettere la discriminazione tra il prodotto atteso ed eventuali dimeri di *primer* o prodotti aspecifici, entrambi costituiti da una doppia elica di DNA. Per ovviare a questo problema è però possibile analizzare la cosiddetta "curva di *melting*" del DNA, la quale rappresenta l'andamento della fluorescenza durante una reazione di dissociazione, successiva all'amplificazione. Durante la suddetta reazione, la temperatura viene aumentata gradualmente in modo da determinare il distacco del doppio filamento, al quale consegue una progressiva diminuzione della fluorescenza, opportunamente registrata. Nel momento in cui viene raggiunta la temperatura di denaturazione del frammento di DNA target, il doppio filamento si apre ed il colorante si separa da esso, con conseguente immediato calo della fluorescenza emessa. Nella curva di *melting* si registrerà quindi un picco in corrispondenza di tale temperatura. Poiché ogni sequenza di DNA ha una temperatura di *melting* (T_m) specifica, l'eventuale presenza di aspecifici verrà immediatamente segnalata dalla presenza di due o più picchi.

Mediante *real time* PCR è possibile effettuare una quantificazione assoluta o relativa. La prima determina in modo preciso il numero di copie di amplificato per cellula, concentrazione di RNA totale o unità di tessuto presente in un campione, di solito mettendo in relazione il segnale di fluorescenza di tale *target* a concentrazione non nota con la curva standard di un campione a concentrazione nota (Wong & Medrano, 2005). La quantificazione relativa, invece, determina la quantità di amplificato *target* presente in un

campione paragonandolo ad un altro campione, chiamato calibratore, che viene scelto arbitrariamente e al quale viene attribuito un livello di espressione unitario.

Si rende pertanto necessaria una normalizzazione, utile a compensare le differenze quantitative del materiale biologico presente nei campioni in analisi. Generalmente la strategia più utilizzata è quella di selezionare un *reference*, ossia un gene di riferimento predeterminato la cui stabilità dell'espressione nelle condizioni sperimentali in oggetto rappresenta il prerequisito fondamentale per la normalizzazione dei risultati ottenuti. Si tratta in genere di un gene *house-keeping* come ad esempio quello della β -actina o della gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi, due tra i trascritti maggiormente utilizzati come *standard* di riferimento interno.

Infine, i dati ottenuti dalla PCR possono essere rielaborati mediante diversi metodi matematici (*Wong & Medrano, 2005*), ma il più frequentemente adottato è quello del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, che calcola i cambiamenti di espressione genica analizzando le differenze tra un campione sperimentale ed un calibratore. Durante la *real time* RT-PCR, il Ct (ciclo soglia) del *target* è confrontato direttamente con quello del calibratore e la differenza dei due Ct (ΔCt) è l'esponente della base 2, che rappresenta la differenza dell'ammontare dei templati relativi ai due geni (*Bustin, 2000*). Il metodo del $\Delta\Delta Ct$ consiste quindi nel determinare il ΔCt del gene *target* rispetto al *reference* per ciascun campione ($\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{reference}$) e successivamente determinare il $\Delta\Delta Ct$ sottraendo il ΔCt del calibratore al ΔCt del campione testato ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{campione} - \Delta Ct_{calibratore}$). Infine, assumendo che l'efficienza della reazione di amplificazione sia del 100%, l'espressione del gene *target*, normalizzata col gene *reference* e relativa al calibratore, è data da $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*Livak e Schmittgen, 2001*).

Obiettivi

Questo studio ha previsto l'utilizzo di uno strumento diagnostico, precedentemente messo a punto, da affiancare alle metodiche già esistenti nel panorama del monitoraggio ambientale e della sicurezza alimentare, sempre più preciso, efficace e di facile applicazione: il *microarray*. Nello specifico, mediante la tecnologia di DNA *microarray*, sono stati analizzati esemplari di *R.philippinarum* provenienti da tre aree della Laguna di Venezia, caratterizzate da un diverso impatto antropico. I risultati ottenuti sono stati messi a confronto al fine di valutare dapprima l'impatto a livello molecolare degli inquinanti su un organismo acquatico come la vongola e, in secondo luogo, la possibilità di identificare uno specifico pattern di espressione in grado di discriminare l'origine del pescato.

Nel presente studio, quindi, la tecnologia del DNA *microarray* è stata utilizzata al fine di indagare una problematica, quale lo stato di salute di una specie di molluschi eduli nella Laguna di Venezia, che si inserisce in due filoni di interesse pubblico, diversi ma connessi l'un l'altro: il biomonitoraggio ambientale e la protezione e sicurezza del consumatore finale.

Materiali e metodi

Campionamento

I campionamenti di *R. philippinarum* sono stati effettuati nel mese di gennaio e di febbraio nelle aree di Colmata (area non classificata), Porto Marghera interno (interdetta alla pesca) e Chioggia (area di raccolta suddivisa in concessioni) (Tab.1). Nel mese di gennaio, per ogni area sono stati campionati circa 50 animali, a febbraio invece 10: sono stati annotati i dati relativi al peso ed è stata prelevata la ghiandola digestiva. La ghiandola digestiva di ciascun animale è stata conservata in 1mL di RNAlater, in provette siglate opportunamente e mantenute a 4°C per le prime 24 ore; successivamente sono state conservate a -80°C per limitare il più possibile la degradazione dell'RNA.

Luogo e coordinate	Data campionamento	Salinità	Temperatura acqua	Temperatura esterna
Porto Marghera Interno (N45°26'01" E12°15'17")	27-01-2011	31 %	6°C	5.5°C
Zone di Colmatta (N45°23'4" E12°15'11")	31-01-2011	33 %	3.8°C	5°C
Chioggia (N45°14'12" E12°16'49")	04-02-2011	39 %	6.6°C	5.6°C

Tab.1: Dati relativi ai campionamenti di gennaio nelle zone di Porto Marghera interno (MI_J), Colmatta (PE_J) e Chioggia (CH_J)

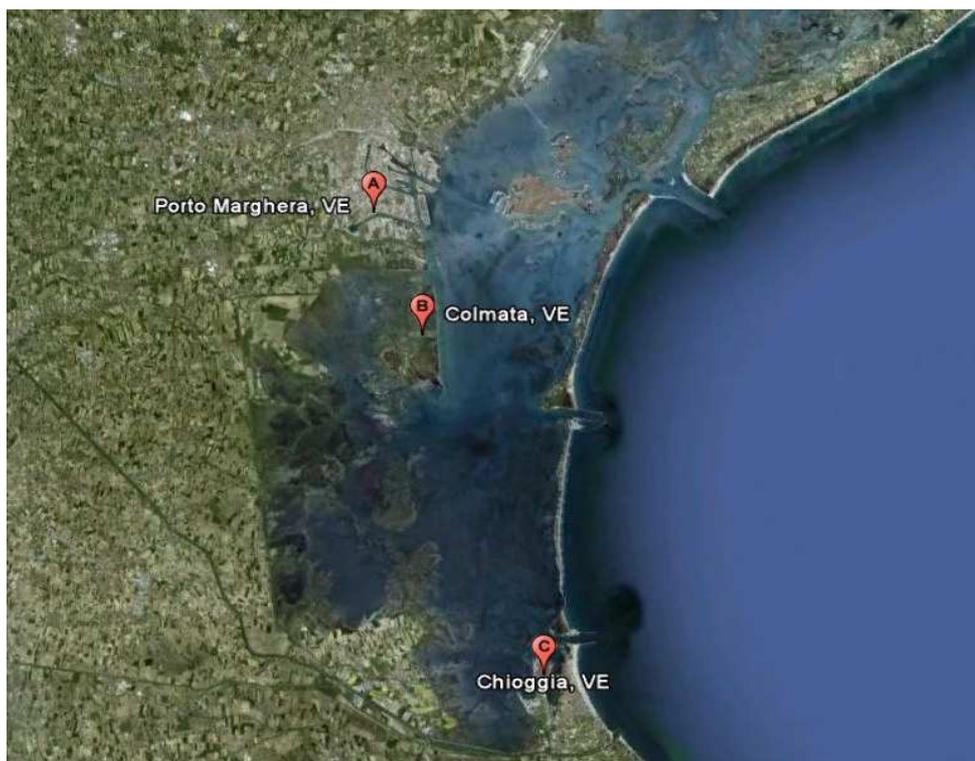


Figura 5 : immagine da satellite delle tre zone considerate (A: Porto Marghera, B: Chioggia, C: Colmata)

Procedimento di estrazione dell'RNA mediante QIAGEN RNeasy KIT

L'estrazione è stata effettuata utilizzando il kit di estrazione *RNeasyMini kit* (Qiagen, West Sussex, United Kingdom), a partire da circa 10 mg di tessuto, opportunamente asciugato dal liquido in cui era in sospensione, l'*RNAlater* (Ambion, Foster city, CA, USA).

Sono state poi utilizzate delle eppendorf, nelle quali sono stati aggiunti: microsfere in ceramica (*Zirconia/Silica Beads, Bio Spec Products, Inc*), per circa 1/5 della provetta, il tessuto, 600 μ l di buffer di lisi $-(RTL)$ e 6 μ l di $II \beta$ -mercaptoetanololo, agente riducente, utilizzato in numerose applicazioni per ridurre i legami disolfuro e come antiossidante biologico, grazie alla sua azione sui radicali idrossilici.

Le provette così costituite sono state poste in *Hybaid Ribolyzer* per 30", per favorire la disgregazione dei tessuti ed implementare l'azione del buffer di lisi RLT .

Dopo i 30", le provette sono state poste in centrifuga per 3' a 14000 rpm. Questo passaggio ha permesso di isolare e prelevare la fase acquosa, contenente gli acidi nucleici, dalle biglie e dal tessuto non disgregato. Il surnatante è stato trasferito in un

eppendorf pulita e sono stati aggiunti 600 µl di etanolo al 70%, necessario per la precipitazione dell'RNA. La soluzione così composta è stata trasferita nell'apposita colonnina fornita dal kit. Successivamente la colonnina è stata trasferita in centrifuga per 15" a 10000 rpm, per favorire il legame dell'RNA al filtro. Dopo aver rimosso l'eluato dal tubo collettore è stato effettuato un duplice lavaggio del filtro legante l'RNA.

Tra il primo e il secondo lavaggio, inoltre, il filtro della colonnina è stato messo a contatto con una soluzione contenente DNAsi, enzima deputato all'eliminazione dell'eventuale DNA co-estratto nel processo di isolamento dell'RNA.

In accordo con le specifiche tecniche fornite dal kit di estrazione, è stato effettuato un ulteriore lavaggio con una di soluzione composta da un buffer di lavaggio RPE ed etanolo 100%, in rapporto 1:4. Una volta eliminato l'eluato è stato effettuato un passaggio in centrifuga per 1' alla massima velocità consentita, in modo da eliminare il solvente residuo presente nel filtro.

Infine l'RNA è stato eluito in un nuovo tubo con 40 µl di acqua bidistillata, centrifugando per 1' a 10000 rpm. Al termine di questo passaggio, l'eluato è stato prelevato e ricaricato nella colonnina, che è stata poi sottoposta ad un ulteriore passaggio in centrifuga per 1' a 10000 rpm, per aumentare la resa finale.

Le concentrazioni degli estratti di RNA così ottenute sono state misurate allo spettrofotometro UV/VIS *NanoDrop ND-1000* (*NanoDrop Technologies, Wilmington, UK*), capace di lavorare con microvolumi di campione, fino a 1µl, eliminando l'utilizzo delle cuvette ed il ricorso a diluizioni.

L'utilizzo del *NanoDrop ND-1000* ha permesso inoltre di valutare la presenza di contaminazione proteica e di solventi residui (fenoli, alcoli, etc.) grazie alla lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda rispettivamente di 230 e 280 nm.

Procedimento di verifica della qualità dell'RNA estratto tramite corsa al Bioanalyzer Agilent 2100 Agilent Technologies

Dopo aver ottenuto gli estratti di RNA dalla ghiandola digestiva di ciascun esemplare, si è proceduto alla costituzione di pool equimolari per ciascuno dei 3 gruppi di campionamento effettuato nel mese di gennaio. In

totale quindi si sono costituiti 5 pool per ciascun sito di campionamento, ognuno costituito dall'RNA di 10 ghiandole digestive. La

denominazione di ciascun pool ha tenuto conto del luogo di pesca, del mese in cui è avvenuto il campionamento e del numero di serie

successivo (es. MI_J_pool 1, ovvero pool 1 costituito da 10 esemplari pescati nel sito di Porto Marghera

interno nel mese di gennaio). I campioni di febbraio, invece, sono stati analizzati individualmente. Di questi è stato infatti valutato solo il profilo di espressione (di alcuni geni), in real-time PCR, al fine di confermare il set di biomarcatori individuati mediante

analisi su individui campionati nel mese di gennaio. La qualità dell'RNA estratto è stata effettuata mediante *Bioanalyzer 2100* (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA):

questo strumento prevede l'utilizzo di un *NanoChip* contenente una serie di microcanali strettamente interconnessi, dove i frammenti di acidi nucleici possono essere separati in

base al loro peso molecolare, come in una normale elettroforesi in gel di agarosio. I microcanali di ogni chip vengono riempiti con un gel (contenente un fluoroforo) attraverso i

quali migra l'RNA, rivelato grazie alla fluorescenza emessa. La suddetta fluorescenza viene successivamente tradotta in un immagine simile ad un gel (con bande) e in un

elettroferogramma (con picchi).

Il protocollo di corsa di *Bioanalyzer 2100* prevede la preparazione di un gel di caricamento, ottenuto seguendo le specifiche fornite dalla ditta produttrice, sintetizzate qui di seguito.



Figura 6: Bioanalyzer 2100 Agilent

La preparazione del gel prevede il caricamento in apposita colonnina di 550 μL di RNA Nano gel e la centrifugata per 10' a 4000 rpm. A 65 μL del gel filtrato viene aggiunto 1 μL del fluoroforo fornito dal kit e il gel così ottenuto viene agitato vigorosamente al vortex e centrifugato per 10' a 13000 rpm. Nel pozzetto del chip dove è presente la lettera G circondata dal cerchio nero, sono stati aggiunti 9 μL di gel precedentemente preparato. Il gel viene fatto penetrare all'interno del chip grazie alla pressione esercitata da un apposita siringa. I rimanenti pozzetti contrassegnati dalla lettera G sono stati riempiti rispettivamente con 9 μL di gel ciascuno. In seguito, ad ogni pozzetto, incluso quello dedicato al marcatore di peso molecolare (*ladder*) sono stati aggiunti 5 μL di Marker.

Dai campioni in nostro possesso, sono state effettuate delle diluizioni, in modo da ottenere una quantità di RNA compresa fra i 100 ed i 400 ng (range ottimale per la massima sensibilità dello strumento).

A questo punto i campioni diluiti ed il *ladder* sono stati denaturati mediante incubazione a 70° C per 2', in modo da favorire la migrazione dell'RNA..

Successivamente 1 μL di ciascun campione e del *ladder* sono stati caricati nei pozzetti corrispondenti. Il chip così ottenuto è stato messo in un apposito vortex, dove è rimasto in agitazione per 1'. Successivamente il chip è stato inserito nell'opportuno alloggiamento presente nello strumento ed è stata fatta iniziare la corsa, grazie all'utilizzo del software dedicato (*2100 Expert Software, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*).

Bioanalyzer 2100, mediante il suo sistema ad elettroforesi capillare, ha reso possibile caratterizzare qualitativamente e quantitativamente il campione. Questo strumento è infatti in grado di restituire un valore, definito come R.I.N. (*RNA Integrity Number*), che permette di attribuire un indice qualitativo all'RNA esaminato. Tale parametro presenta una scala che va da 0, indice di completa degradazione e 10, RNA di ottima qualità.

Il R.I.N. viene calcolato sulla base dei picchi delle subunità ribosomiali 18S e 28S; tuttavia nel caso di alcune specie di invertebrati, la subunità 28S è talmente labile che, durante l'estrazione dell'RNA, va incontro ad una rapida degradazione; questo impedisce al software il calcolo di questo parametro. E' questo il caso di *Ruditapes philippinarum*. Quindi, per determinare la qualità dell'RNA, si è costretti a valutare l'eventuale degradazione dell'RNA osservando l'elettroferogramma.

Il report fornito dal software, oltre a riportare il valore di R.I.N., fornisce ulteriori dati relativi alla corsa elettroforetica, quali la concentrazione dell'RNA e l'elettroferogramma.

Analisi mediante tecnologia DNA MicroArray Agilent Technologies

I DNA *microarray* sono costituiti da un'insieme di microscopiche sonde, attaccate ad una superficie solida come vetro, plastica, o chip di silicio, a formare un array. Sono normalmente utilizzati per esaminare il profilo d'espressione di più geni. Gli RNA messaggeri oggetto di studio vengono estratti dalle cellule/tessuti e convertiti in cDNA, tramite l'uso della trascrittasi inversa. Successivamente il cDNA viene convertito in cRNA in una reazione di trascrizione che, al contempo, "marca" il trascritto mediante l'incorporazione di una base coniugata ad una molecola fluorescente. Nella fase di ibridazione, le sonde presenti sulla matrice e i filamenti complementari di cRNA marcato si appaiano; la registrazione della posizione in cui viene rivelata la fluorescenza permette successivamente di associare ciascun segnale ad un trascritto. Il segmento di DNA legato al supporto solido è noto come "*probe*": in un *array* sono usate contemporaneamente migliaia di *probe*.

Sostanzialmente il *microarray* ha la funzione di misurare la presenza di molecole presenti nel campione. Quindi è fondamentale che le molecole presenti nel campione ("*target*") vengano legate dalla *probe* nel modo più specifico possibile in modo che il segnale che ne deriva sia riproducibile ed effettivamente correlato alla reale quantità del trascritto. L'assoluta specificità di legame fra la *probe* ed una sola molecola fra quelle presenti nel campione è la condizione fondamentale per un'analisi confidente.

Protocollo di marcatura dell'RNA Agilent Quick Amp Labeling Kit, Agilent Technologies

Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) è in grado di generare cRNA (RNA complementare) fluorescente, a partire da un campione contenente RNA in un range di concentrazione compreso tra 200 ng ed 1mg di RNA totale o a partire da un minimo di 10 ng di poly A+ RNA, con un solo colore per l'elaborazione dei risultati. I due enzimi che caratterizzano le reazioni fondamentali sono la trascrittasi inversa, che, a partire da RNA, sintetizza cDNA a doppio filamento, e la T7 RNA polimerasi, che amplifica il cDNA, incorporando al contempo cianina 3- CTP.

L'utilizzo di questo kit permette generalmente un'amplificazione dell'RNA di almeno 100 volte.

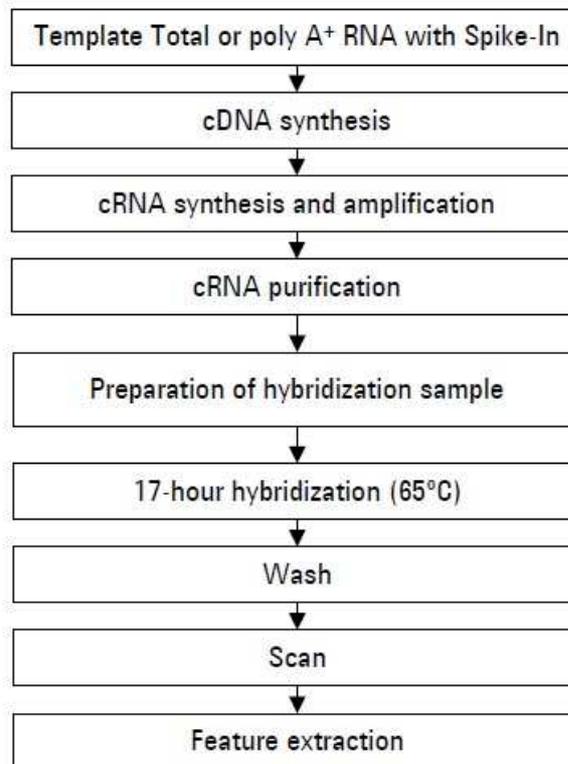


Figura 7 : Protocollo schematicizzato del kit *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* (*Quick Amp Labeling, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*)

Preparazione della mix di *spike*

La soluzione degli *spike-in*, controlli positivi di processo, è stata ottenuta attraverso diluizioni seriali, utilizzando il *Dilution Buffer* fornito dal kit. La concentrazione finale viene indicata nelle specifiche fornite dal kit.

Preparazione dei campioni

I campioni precedentemente valutati al *Bioanalyzer 2100* (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*), sono stati diluiti in modo da ottenere delle soluzioni di partenza diluite contenenti ciascuna 200 ng di RNA. A ciascun campione sono stati aggiunti 1.2 μ l di *T7 promoter primer* e 2 μ l della soluzione di *spike-in*, per un volume finale di 11.5 μ l.

Sintesi del cDNA a doppio filamento

A partire dai campioni così ottenuti, si è proceduto alla loro denaturazione, eseguita a 65°C per 10' nel blocco riscaldante ed al successivo passaggio in ghiaccio per 5'. A questo punto è stato necessario preparare la *Master Mix*, composta dai reattivi elencati in tab.2 (quantità relative ad un campione).

COMPONENTE	VOLUME (μ L) PER REAZIONE
5X First Strand Buffer	4 μ l
DTT 0.1 M	2 μ l
dNTPs (10mM)	1 μ l
MMLV RT	1 μ l
RNase OUT	0.5 μ l

Tab. 2: Reagenti necessari per la Master mix e relativi volumi di utilizzo

Il mix così formato è stata aggiunto nel volume di 8.5 μ l a ciascuna provetta. I campioni così addizionati, sono stati incubati per 2 h a 40°C a bagnomaria in bagnetto termostato e poi sono stati denaturati in blocco riscaldante per 15' a 65°C.

Sintesi del cRNA marcato

Dopo aver scongelato la soluzione al 50% di PEG a 40°C per 1', per una migliore risospensione, si è proceduto alla composizione del mix (vedi tab 3). Prima di aliquotare il mix in ciascun campione sono stati aggiunti 2.4 μ l di Cy3.

COMPONENTE	VOLUME (μ L) PER REAZIONE
Nuclease free H2O	15.3
4X Transcription Buffer	20
dDTT 0.1	6
NTP mix	8
50% PEG	6.4
RNase OUT	0.5
Inorganic Pyrophosphatase	0.6
T7 RNA Polymerase	0.8

Tab. 3: Componenti per la costituzione del mix di reazione

Il volume finale della mix di reazione, relativamente ad un campione, è pari a 57.6 µl.

Dopo aver aggiunto la soluzione di mix a ciascun campione, è stata eseguita un'incubazione degli stessi a 40°C per 2 h a bagnomaria.

Purificazione del cRNA marcato

Per la purificazione dei campioni è stato utilizzato nuovamente *Rneasy Mini Kit* (*Qiagen, West Sussex, United Kingdom*).

Dopo aver aggiunto 20 µl di acqua *RNasi free*, in modo da ottenere un volume di 100 µl, a ciascun campione sono stati aggiunti 350 µl di buffer RLT. Successivamente sono stati aggiunti 250 µl di etanolo 96-100%.

La soluzione così composta è stata traferita in colonnina e centrifugata per 30' a 13000 rpm, in modo da trattenere su filtro il cRNA marcato. Da questo punto in poi il protocollo corrisponde alla procedura di estrazione dell'RNA: prevede quindi le fasi di lavaggio del filtro ed eluizione, effettuata con 30 µl di acqua *RNasi free*.

Quantificazione dell'incorporazione di Cy3 tramite il NanoDrop

NanoDrop D-1000 consente di quantificare la Cy-3 incorporata nel cRNA mediante la funzione "MICROARRAY". La quantità di Cy-3 incorporata viene espressa con un unità di misura definita "attività specifica", così calcolata:

$$[Cy3] (pmol/\mu l) / [cRNA] (ng/\mu l) * 1000 = pmol Cy3 per \mu g di cRNA$$

Per garantire la buona riuscita dell'ibridazione è stato deciso di accettare solo i campioni con un attività specifica superiore a 7,5.

Ibridazione dei campioni di cRNA marcato su DNA MicroArray

Per l'ibridazione dei campioni è stato utilizzato *Gene Expression Hybridization Kit* (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*).

Una volta risospeso il *Blocking Agent* secondo le specifiche indicate nel kit, è possibile allestire il materiale necessario per l'ibridazione: forno alla temperatura di 65 °C, blocco riscaldante per eppendorf (60°C).

COMPONENTE	VOLUME (μ L) PER REAZIONE
cRNA marcato	600 μ g
Blocking agent	5 μ l
H2O	Fino ad un volume tot di 24 μ l
Fragmentation buffer	1 μ l

Tab. 4: Reagenti necessari per la reazione di ibridizzazione e relativi volumi di utilizzo

Per la reazione di frammentazione, la soluzione così costituita è stata posta per 30' a 60°C.

Al termine dei 30", la soluzione è stata posta in centrifuga e poi successivamente sono stati addizionati 25 μ l di *GEx Hybridization buffer 2X*, miscelando bene con la pipetta. A questo punto, si procede immediatamente all'ibridizzazione, depositando 100 μ l della soluzione di ibridizzazione sulla *Backing slide* e coprendo con la *slide* su cui sono deposte le sonde. Successivamente, la cameretta di ibridazione così composta, viene incubata a 65°C per 17 h in rotazione.

Lavaggi della *slide*

Dopo aver estratto le camerette dal forno ed aver controllato il livello della soluzione di ibridazione, la cameretta è stata appoggiata su di un panno assorbente ed è stata aperta delicatamente. La *slide* è stata quindi estratta delicatamente dalla cameretta, afferrandola dalle estremità laterali.

La *slide* "attiva", quella che ospita l'RNA ibridato alle sonde, è stata poi lavata, seguendo il protocollo riportato in tab x ed evitando accuratamente la formazione di bolle.

Vasca	Buffer utilizzato	Agitazione	T°	Tempo	Processo
Vasca 1	GE Wash buffer 1	-	RT	/	Disassemblaggio
Vasca 2	GE Wash buffer 1	Si	RT	1'	1° lavaggio
Vasca 3	GE Wash buffer 2	Si	37°C	1'	2° lavaggio

Tab.5: Lavaggi effettuati

Lo scanner *Agilent G2565BA DNA microarray* (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*) è stato utilizzato per la scansione degli array ad una risoluzione di 5 μm . Ciascun array è stato sottoposto a una duplice scansione utilizzando due diversi livelli di sensibilità del laser (“*High*” 100% e “*Low*” 10%). Per la visualizzazione e interpretazione dei risultati è stato utilizzato il software *Feature Extraction 9.5.1*.

Questo software è in grado di analizzare le immagini ottenute sottraendo la fluorescenza di *background*. *Feature Extraction 9.5.1* restituisce inoltre una serie di indicatori della qualità di ciascuno spot, allo scopo di valutare la bontà e l'affidabilità delle stime di intensità degli stessi; per ciascun campione infatti, il software fornisce un “*Quality Report*” – che ne indica l'affidabilità – ed un file di testo, che riporta i valori di fluorescenza di ciascuna sonda. Dopo aver ottenuto questi primi dati, le intensità degli *spike-in* di controllo sono state utilizzate per identificare la procedura di normalizzazione migliore per ogni set di dati. La procedura di normalizzazione è stata eseguita mediante il software statistico *R 2.9.2* (<http://www.rproject.org>).

Dopo la normalizzazione, le intensità degli *spike* dovrebbero essere uniformi su tutta la sperimentazione di un dato set di dati, imputati al software.

Acquisizione dei dati ed analisi statistica

Il programma *R 2.9.2* è un software deputato all'analisi statistica dei dati, che utilizza uno specifico linguaggio di programmazione (<http://www.rproject.org>). Mediante esso è possibile effettuare una normalizzazione quantile dei dati, che, una volta ottenuti possono essere immessi in altri programmi, necessari per un'ulteriore analisi dei dati in nostro possesso. Per analizzare i valori di espressione sono stati utilizzati i seguenti programmi: *TmeV* (*Saeed et al., 2003*) e *SAM* (“*Significance Analysis of Microarray*”) (*Tusher et al., 2001*); con questi è stato possibile identificare i geni differenzialmente espressi tra i campioni.

L'applicazione Java *TmeV* – ovvero “*Multiexperiment Viewer*” (*MeV*) – , fa parte del software *TM4*, disponibile presso il sito dell'*Institute for Genomic Research* (<http://www.tigr.org/software>). Essa è stata progettata per consentire l'analisi dei dati dei microarray, in modo da identificare i pattern di espressione genica ed i geni differenzialmente espressi.

Il programma SAM assegna un punteggio ad ogni gene sulla base della variazione di espressione genica rispetto alla deviazione standard delle misurazioni ripetute. Geni con punteggi superiori ad una soglia stabilita, sono ritenuti potenzialmente significativi; la percentuale di tali geni individuati a caso è detta "False Discovery Rate" (FDR). Per stimare il FDR, i geni non-senso sono identificati analizzando le permutazioni delle misure. La soglia può essere regolata per identificare i gruppi più piccoli o più grandi di geni, e i FDRs sono quindi calcolati per ogni set (Tusher et al., 2000).

Analisi funzionale di geni differenzialmente espressi

Le analisi delle annotazione relative ai geni differenzialmente espressi è stata effettuata utilizzando il software DAVID ("Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery"), disponibile in rete (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). DAVID è costituito da una base di conoscenze biologiche integrate e strumenti di analisi ed ha l'obiettivo di estrarre sistematicamente il significato biologico dalle grandi liste di geni/proteine. La procedura di utilizzo di DAVID richiede il caricamento di un primo elenco di geni, che contiene un qualsiasi numero di geni comuni, identificati attraverso le analisi, usando uno o più testi e strumenti presenti nel software, come *Gene Functional Classification*, *Functional Annotation Chart* o *Clustering* e *Functional Annotation Table*. Seguendo questo protocollo di utilizzo di DAVID, è possibile risalire al significato biologico di ciascun gene (Da Wei Huang et al., 2008).

Validazione della piattaforma microarray mediante RT-Real-Time PCR

Ai fini della validazione è stato scelto di analizzare i profili di espressione di alcuni geni mediante real-time PCR su cDNA ottenuto mediante retrotrascrizione degli estratti di RNA di singoli individui, diversamente dall'approccio utilizzato nelle analisi di microarray, dove si sono valutati pool di individui.

Quattro dei geni, dei quali è stata valutata l'espressione genica, sono stati scelti in base alla significatività dimostrata in uno studio effettuato precedentemente nello stesso laboratorio (Milan et al., 2011). Altri due geni, invece, sono stati scelti in base al loro potere discriminante, evidenziato durante l'analisi (*Predictive Analysis Microarray*) dei risultati ottenuti con microarray, mentre la GST (rutipaes_c17047) è risultata significativa in entrambi gli studi. Nella tabella 6 sono riportati i geni considerati.

Gene	Probe
No match	ruditapes_c20179
No match	ruditapes_2c2341
NRFP6	ruditapesP_c25931
GST	ruditapes_c17047
AChE	ruditapesN_c12315
No match	ruditapes_c1189
SULT	ruditapes_c28883

Tabella 6: Tabella dei geni considerati

Sono stati analizzati gli RNA di 30 individui pescati nel mese di febbraio (10 per ciascun sito di campionamento) e di 60 pescati nel mese di gennaio (20 per ciascun sito di campionamento). Nello specifico, per gli animali di gennaio, sono stati scelti 4 estratti per ciascuno dei 15 pool analizzati mediante *microarray*. La retrotrascrizione dell'RNA è stata effettuata mediante *SuperScript™ II Reverse Transcription (Invitrogen, Milano)*, a partire da 1 µg di RNA. Prima di procedere con la retrotrascrizione è stato necessario effettuare diluizioni degli estratti in modo da ottenere, in un volume finale di 10 µL, una concentrazione pari a 1 µg. È stata quindi preparata la soluzione di denaturazione, composta da 1 µL di esameri random e 1 µL di nucleosidi trifosfato (NTPs) per ciascun campione. Ai 10 µL di ciascun estratto, opportunamente diluito, sono stati aggiunti 2 µL del suddetto mix di denaturazione. I tubi contenenti l'RNA, gli esameri e gli NTPs sono stati posti in termociclatore a 65 °C per 5 minuti e successivamente in ghiaccio per 2 minuti. A questo punto si è proceduto alla composizione del mix di retrotrascrizione (escluso l'enzima, aggiunto successivamente), composto da *Buffer 5X*, ditioneitolato (DTT) e *RNASE OUT* (Tab. 7). Per ogni campione sono stati aggiunti 7 µl della soluzione così composta.

COMPONENTE	VOLUME (µL) PER REAZIONE
Buffer 5X	4 µl
DTT	2 µl
RNASE OUT	1 µl

Tab.7: Reagenti necessari per il mix di retrotrascrizionee relativi volumi di utilizzo

Una volta aggiunto il mix di retrotrascrizione, i tubi sono stati posti in termociclatore a 25°C per 2 minuti. Successivamente, ad ogni campione, esclusi i controlli negativi “noRT”, è stato aggiunto 1 µl di retrotrascrittasi *Super Script II*.

Il ciclo termico utilizzato è stato il seguente:

- 25°C per 10'
- 42°C per 50'
- 70°C per 15'.

Terminata la reazione di retrotrascrizione, sono state preparate delle aliquote di cDNA, contenenti ciascuna 4µl. Queste ultime sono poi state conservate in congelatore a -80°C in attesa delle successive analisi.

In un saggio di *real-time* PCR finalizzato allo studio dell'espressione genica è preferibile disegnare i *primer* e/o l'eventuale sonda, se presente, in modo che il punto di giunzione tra un'esone e l'esone successivo sia presente all'interno della sequenza del *primer*, in modo da garantire l'effettiva amplificazione del trascritto e non di DNA genomico contaminante. Per poterlo fare è quindi necessario conoscere la struttura esone-introne sia dei geni *target* che del gene *reference*. Tuttavia, le informazioni in nostro possesso sulle sequenze genomiche da analizzare, non ci hanno permesso di individuare l'esatta collocazione di queste giunzioni, per cui, per risalire ad esse, ove possibile, abbiamo fatto ricorso a strumenti bioinformatica diversi – *Blastn*, *Blast 2 sequence*, *Blat* – ricercando le sequenze in animali filogeneticamente il più possibile vicini a *R. philippinarum*. Non per tutti i geni considerati, quindi, è stato possibile disegnare almeno uno dei due *primer* sulla giunzione esone-esone.

Per il disegno dei *primer* è stato utilizzato il programma Primer 3. Parte dei *primer* utilizzati sono stati disegnati precedente (Milan et al., 2011). In tabella 9 sono riportati i *primer* utilizzati per ciascun gene considerato.

probe name	FW	REV
ruditapesN_c12315	CGTCATACTTTGGCCACGCT	GCTAAGACTGGCGACCCAAA C
ruditapesP_c17047	CGCATGGGCAGACAGAGTTA	TTCCTCTTGGCAAGGCTCG
ruditapes_c20179_S	GCGGTTGTCAATCCACAATA	GCAGAGAAGATATTCGCTCC A
ruditapes2_c2341_AS	TGTTTGCTTTAAATTGTACGGAAC	AACCCAACGATGTTCAAGTC A
ruditapesP_c28883	ATCCAAAATGTGGCAGCA	GCAGTGCCTTTAACCCAGCAT AAC
ruditapes2_c1189_S	AATTTGAAATAAACCGAATGGAA	TTGTACCGTCGTTCAAGTAT TTC
ruditapesP_c25931	CAGCTAGCCGTCATTGTTGA	GGTGCAGCTTAGAACTGCTT G

Tabella 9: Tabella dei primer utilizzati forward – FW – e reverse – REV –

Protocollo di *Real-time* PCR

Le analisi di real-time PCR sono state condotte con lo strumento *Stratagene Mx3000P* (Agilent Technologies) utilizzando il mix per *real-time* fornito da *KAPA SYBR FAST Universal qPCR Kit* (*Kapa Biosystem, Capetown*), basato sulla chimica di reazione del *Sybr Green*. L'espressione genica è stata quantificata in termini relativi: è stata infatti determinata la quantità di amplificato target presente nel campione, paragonandolo ad un altro campione, chiamato calibratore, costituito da un pool rappresentativo dei campioni oggetto d'indagine, al quale viene attribuito un livello di espressione unitario.

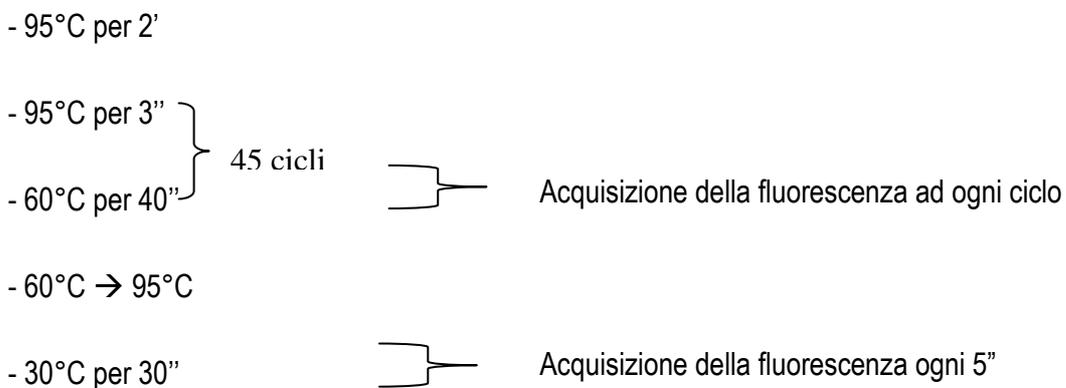
Si è resa pertanto necessaria una normalizzazione, utile a compensare le differenze quantitative del materiale biologico presente nei campioni in analisi. La strategia più utilizzata è quella di selezionare un *reference*, ossia un gene di riferimento predeterminato, la cui stabilità dell'espressione nelle condizioni sperimentali in oggetto rappresenta il prerequisito fondamentale per la normalizzazione dei dati ottenuti. In questo studio è stato utilizzato il gene *housekeeping* RBS-4 (*Ribosomal Binding Site 4*).

Prima di effettuare le analisi di real-time è stato necessario diluire i cDNA di ciascun campione di un fattore 100, scelto in seguito a prove preliminari condotte sul campione

calibratore. Successivamente è stato allestito un mix di reazione per ciascun gene target contenente: 5 μl di Master Mix Kapa SYBR FAST, 0.25 μl di ciascun *primer* (senso e antisenso) in concentrazione pari a 50 M e 2 μl di acqua bidistillata, per un totale di 7.5 μl per ogni campione.

Il mix così ottenuto è stato aliquotato nei pozzetti della multi piastra da *real-time* PCR, in volume di 7.5 μl . Successivamente 2.5 μl di ciascun campione, precedentemente diluiti, è stato aliquotato in piastra.

Il protocollo termico di amplificazione (e dissociazione) utilizzato è stato il seguente:



Per analizzare l'espressione dell'RNA dei 7 geni target nei 90 individui considerati, sono state eseguite in tutto 16 corse di *real-time* PCR.

Analisi dei risultati

Per calcolare l'espressione relativa di ciascun gene è stato utilizzato il metodo del $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) ed il gene RSB4 è stato utilizzato come gene di riferimento per la quantificazione relativa del gene target. Al termine della reazione lo strumento fornisce, sia per il gene target che per il gene di riferimento di ciascun campione, il valore Ct. Il Ct rappresenta il valore numerico del ciclo di amplificazione al quale la fluorescenza registrata dallo strumento oltrepassa una certa soglia. Per verificare che l'efficienza di amplificazione del gene target e del gene di riferimento fossero simili è stato effettuato un esperimento preliminare di validazione, cioè si è valutato come varia il ΔCt al variare della diluizione del pool utilizzato come calibratore. Si è eseguito pertanto un esperimento di *real time* utilizzando diluizioni scalari del suddetto calibratore e si è tracciato un grafico coi valori del logaritmo della diluizione verso i valori di ΔCt calcolati per ciascuna diluizione. Si è ottenuta

una retta, il cui valore di pendenza è risultato inferiore a 0,1, condizione necessaria per ritenere l'esperimento validato.

L'analisi delle curve di amplificazione e dissociazione ed il calcolo del $\Delta\Delta Ct$ sono stati effettuati con l'ausilio del software *MxPro* (Agilent Technologies), in dotazione con lo strumento *Stratagene Mx300P*, il quale permette di esportare i risultati ottenuti in un file Excel.

Infine, per validare la piattaforma *microarray*, è stato necessario confrontare i dati ottenuti con quest'ultima con quelli ottenuti mediante *real-time* PCR, in modo da verificare se il trend dell'espressione genica dei 7 target osservata con *microarray* veniva confermato dalle analisi effettuate con *real-time*. Questo è stato possibile grazie all'ausilio di un software per l'analisi statistica: *SPSS v.12.0*.

Risultati e discussione

Estrazione dell'RNA, composizione dei pool e analisi della qualità mediante Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies

E' stato estratto RNA a partire da 10 mg di ciascuna ghiandola digestiva, prelevata da ciascun animale. Sono stati utilizzati in tutto 150 animali (50 per ciascuna area presa in considerazione – CH, CC, MI –). La concentrazione di ciascun estratto è stata valutata con il *Nanodrop* e si è poi proceduto a formare dei pool (15 in tutto), ognuno dei quali conteneva , in uguali quantità, l'estratto di 10 campioni. Una volta composti i pool si è effettuata l'analisi, mediante *Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)*, della qualità del RNA. Sono stati ancora una volta considerati i picchi in corrispondenza della subunità 18s, senza prendere in considerazione i valori di RIN, in quanto la subunità 28s come in molte specie di invertebrati risulta degradata nelle matrici trattate.

Ibridazione e processazione dei campioni

Effettuata la marcatura e l'ibridazione dei campioni (pag.31: Materiali e metodi) è stata effettuato il lavaggio e la scansione dei vetrini. A partire dall'immagine ottenuta dalla scansione è stato possibile tramite il programma *Feature Extraction 9.5* effettuare un controllo di qualità sull'intero "workflow" dell'esperimento. Il passaggio più importante è rappresentato dall'analisi della fluorescenza degli *spike in*, i quali sono costituiti da 10 trascritti virali presenti in concentrazioni conosciute, che vengono processati allo stesso modo dei campioni. In ciascun array sono collocate 20 sonde specifiche per ciascuno dei 10 trascritti virali, che permettono di correlare la concentrazione nota di ciascun trascritto al segnale di fluorescenza. Grazie alla presenza di 20 sonde per ciascun trascritto è inoltre possibile verificare il coefficiente di variabilità dei valori di fluorescenza all'interno della stessa piattaforma.

Questo software è quindi in grado di fornire per ciascun campione un "Quality report", contenente i dati estratti relativi al campione oggetto d'analisi e ottenere anche dati relativi all'espressione dei singoli trascritti. I *quality report* dei campioni considerati nelle analisi riportate successivamente hanno tutti dimostrato un corretto processamento.

Analisi dei valori di espressione genica mediante TmeV

I valori di espressione ottenuti, sono stati normalizzati con una normalizzazione quantile, effettuata con il programma R 2.9.2. I dati così ottenuti sono stati analizzati tramite TmeV (*MultiExperiment Viewer*), un'applicazione Java, che fa parte del software TM4. TmeV permette di compiere diverse analisi su dati di espressione genica ottenuti con tecnologia *microarray* (Saeed et al., 2003).

Per prima cosa si è proceduto ad una “*Cluster Analysis*” gerarchica, eseguita su tutti i campioni. L'applicazione di cui sopra consiste in un' “analisi dei *cluster*”, ovvero dei gruppi – ed è costituita da un insieme di tecniche di analisi multivariata dei dati, che mirano alla selezione ed al raggruppamento di elementi omogenei in un insieme di dati forniti.

In questa analisi, tramite il sistema di Clustering gerarchico, è possibile costruire una gerarchia delle partizioni, caratterizzate ciascuna da un numero (de)crecente di gruppi. La visualizzazione di questa gerarchia è rappresentata da un dendrogramma, ossia un diagramma ad albero, nel quale è possibile visualizzare i rapporti che intercorrono fra i vari gruppi. Questa analisi ci è quindi utile, in quanto ci permette di discriminare tra geni e campioni con pattern di espressione genica simili, fornendoci inoltre la rappresentazione grafica della divisione in gruppi che intercorre tra i vari “*clusters*” presi in esame e della suddivisione che sussiste tra i medesimi, sulla base del profilo di espressione genica complessivo.

Per poter effettuare questo tipo di analisi sono stati inputati al programma i valori di fluorescenza dei 15 pool, provenienti dalle diverse aree della Laguna di Venezia (MI, CH e CC), il quale li ha rielaborati, fornendoci una rappresentazione grafica, in base a due colori – verde e rosso –, del valore di fluorescenza rilevato: il verde indica valori minimi di fluorescenza, mentre il rosso valori massimi di espressione.

Prima di procedere con la “*Cluster analysis*” gerarchica, è stata effettuata un'analisi con SAM *multiclass*, a tre gruppi, per poter identificare i geni differenzialmente espressi tra i tre gruppi di campioni. Si sono così ottenuti 147 geni differenzialmente espressi, con un FDR dello 0%. Questo set di geni è stato poi utilizzato come matrice di dati per la *Cluster analysis* gerarchica, il cui risultato è visibile nella figura Figura 8 sottostante:

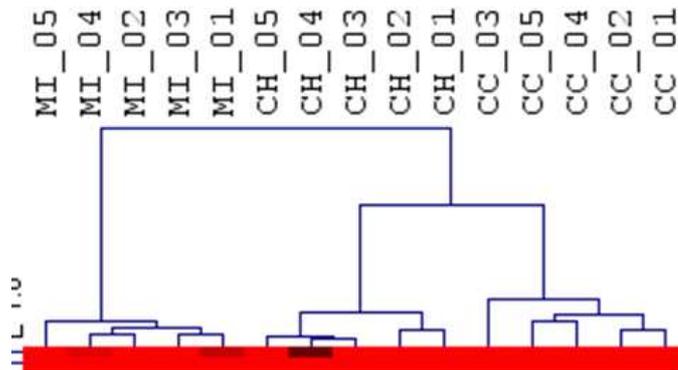


Figura 8 : Cluster analysis derivata da SAM con FDR 0%

Come si può notare dall'immagine ottenuta, è possibile vedere un'evidente separazione tra i campioni appartenenti ai tre gruppi, che riflettono evidentemente le diverse zone in cui gli animali sono stati prelevati. Inoltre, dall'immagine si può altresì notare come i campioni appartenenti a Porto Marghera (MI) si differenzino maggiormente rispetto alle altre due popolazioni.

Successivamente alla "Cluster analysis" gerarchica è stata poi effettuata un'analisi dei componenti principali (denominata PCA); la quale, tramite l'uso di un algoritmo di analisi è in grado di riassumere i dati delle frequenze alleliche in due o tre variabili principali, in modo da sintetizzare i dati immessi nel sistema. Tramite algoritmi dell'algebra lineare, vengono calcolate delle nuove variabili, che consistono in una combinazione lineare delle frequenze alleliche originali.

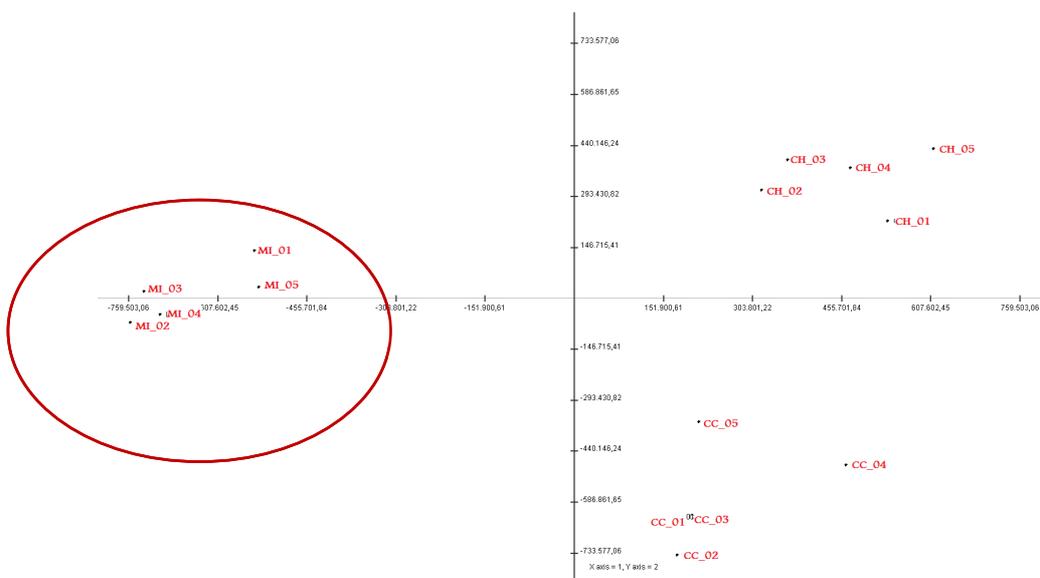


Figura 9 : PCA dei 15 pool analizzati

Come si può vedere dall'immagine di cui sopra, questo studio mette in evidenza come l'analisi dei valori di espressione di 147 trascritti può consentire la netta separazione dei pool analizzati in base al sito di provenienza. Si può inoltre notare una maggiore differenziazione dei campioni provenienti da Marghera rispetto alle altre aree. L'asse X (componente principale 1) in cui appaiono separati gli animali provenienti dall'area industriale spiega infatti il 49% della variabilità tra i campioni. L'asse Y (componente principale 2) nella quale appaiono separati anche gli animali provenienti dall'area di Chioggia da quelli di Colmata, spiega invece il 29% della variabilità tra i campioni.

Analisi dei valori di espressione genica tramite l'utilizzo di SAM

L'utilizzo dell'applicazione SAM (*Significance Analysis Microarray*) ha permesso il confronto a coppie dei valori di espressione esistenti tra i 5 pool di animali campionati a Porto Marghera ed i 10 pool provenienti dalle altre due aree di campionamento (Chioggia e Colmata). Oltre alle liste dei trascritti differenzialmente espressi tra i due gruppi di campioni analizzati, il programma restituisce i relativi *Fold Change* (FC) e quindi il numero di volte che il gene risulta essere sovra o sottoespresso.

Dall'analisi con SAM sono stati ottenuti 189 trascritti differenzialmente espressi con un *Fold Change* superiore a 1.5 (*False Discovery Rate* <1%) (Figura 10). Tra i geni differenzialmente espressi trovati, si sono evidenziati trascritti con funzione di detossificazione dagli xenobiotici, tra cui: Glutazione S-Transferasi (GST) e Sulfotransferasi (SULT).

Le Glutazione S-Transferasi sono una famiglia di isoenzimi detossificanti coniugativi, quindi svolgono una reazione nei confronti degli intermedi reattivi formati dal citocromo P450. La loro attività consiste nel catalizzare la reazione tra il gruppo sulfidrilico del glutatione con molecole che contengono atomi di carbonio elettrofili, prevenendo così il legame covalente di queste molecole con costituenti vitali della cellula. Il glutatione è un cofattore tripeptide formato da una glicina e da una cisteina, legata attraverso un legame gamma-carbossilico ad un acido glutammico. I composti ad esso coniugati risultano meno reattivi e vengono eliminati dall'organismo come acidi mercapturici (*Galli et al., 2008*). Un aumento nell'attività di questo enzima può essere imputata alla presenza di sostanze tossiche nell'ambiente.

Le Solfotransferasi sono invece una famiglia di enzimi citosolici coniugativi di fase II, deputati al metabolismo di sostanze endogene ed esogene. Sono in grado di trasferire solfati su ossidrili fenolici ed alifatici, formando esteri solforici ed in misura minore su ammine aromatiche ed idrossilammine per formare solfammati. I prodotti così coniugati sono altamente ionizzati, perdono buona parte delle loro caratteristiche tossicologiche e vengono facilmente escreti attraverso le urine (Galli et al.,2008). Questi enzimi hanno perciò un ruolo importante nella difesa dell'organismo dai composti chimici esogeni. In studi precedenti la solfotransferasi è stata riscontrata sovra-espressa in seguito all'esposizione ad HCB ("Hexachloro Benzene"), PCDDs / PCDFs (Policlorodibenzofurani, policlorodibenzodiossine) e PCB (Policloro bifenili) (Milan et al.,in pubblicazione).

Altri geni differenzialmente espressi trovati sono stati ad esempio le colinesterasi. Queste sono enzimi presenti nei tessuti colinergici e non colinergici, così come nel plasma ed in altri fluidi del corpo. Si dividono in due classi in base alle differenze del loro substrato specifico. La colinesterasi più conosciuta è senza dubbio l'Acetilcolinesterasi (AChE). Essa è abbondante nella membrana del cervello, dei muscoli e degli eritrociti, mentre BChE ha una maggiore attività nel fegato. La funzione principale di AChE è quella di permettere una rapida idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina nelle sinapsi colinergiche (Biyokimya, 2003; Pezzementi et al., 2011). Nel nostro studio, è risultata sovraespressa, forse in relazione ad un probabile meccanismo di compensazione, conseguente all'azione inibitoria esercitata dai pesticidi organocloruranti sull'attività proteica.

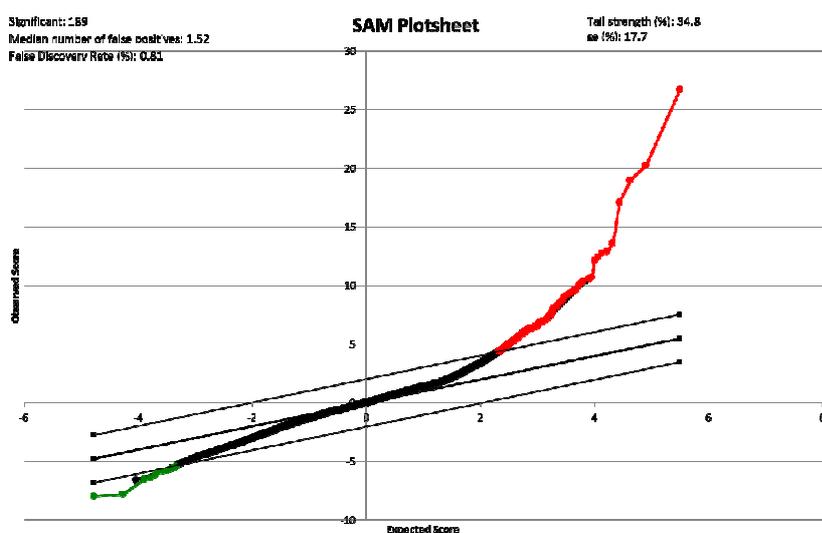


Figura 10: SAM Plot con un **Fold Change** superiore a 1.5 ed un **False Discovery Rate** <1%: la linea rossa evidenzia i geni sovra-espressi, mentre quella verde i geni sotto-espressi

Analisi mediante l'utilizzo di DAVID (*Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis*)

Al fine di identificare le vie metaboliche e quindi le funzioni biologiche dei geni differenzialmente espressi tra le popolazioni analizzate si è effettuata un'analisi con DAVID *Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). Questo software disponibile *online* permette di effettuare delle analisi di arricchimento, e quindi di identificare le vie metaboliche sovra rappresentate nei geni differenzialmente espressi. L'analisi permette in particolare di identificare i processi biologici – *Biological Process* (BP) – , il compartimento cellulare – *Cellular Component* (CC) – , le funzioni molecolari – *Molecular Function* (MF) – ed i KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome*) *pathways* sovra rappresentati rispetto all'atteso dai geni differenzialmente espressi. Come già detto, l'analisi con DAVID viene detta di arricchimento, in quanto ogni gene, ogni *pathways*, sono presenti con una determinata frequenza nei trascritti rappresentati nell'array; quando la frequenza teorica viene disattesa, il programma calcola il suo aumento e questo valore corrisponde al cosiddetto *Fold Enrichment*. Il software tuttavia non riconosce le *entries* di *R.philippinarum* ed è stato quindi necessario risalire ai trascritti omologhi in *Danio rerio*. Questo passaggio che permette di ottenere delle *entries* riconosciute dal programma, causa un inevitabile perdita di informazioni per i trascritti differenzialmente espressi per cui non è possibile risalire ai geni omologhi nella specie di riferimento. Gli IDs di *Danio rerio* corrispondenti ai trascritti differenzialmente espressi di *R. philippinarum* e tutti i geni rappresentati sull'array sono stati quindi utilizzati per definire una “*gene list*” ed un “*background*” in DAVID.

Nella tabella sottostante (Tab.5), sono riportati processi biologici, le componenti cellulari, le funzioni molecolari, e le KEGG *pathways* risultate dall'analisi sovrarappresentate tra i geni differenzialmente espressi.

GOTERM_BP_FAT			
Term	Count	%	PValue
GO:0006584~catecholamine metabolic process	3	4.61	0.0069
GO:0009712~catechol metabolic process	3	4.61	0.0069
GO:0034311~diol metabolic process	3	4.61	0.0069
GO:0018958~phenol metabolic process	3	4.61	0.0069
GO:0006576~biogenic amine metabolic process	3	4.615	0.0185
GO:0055114~oxidation reduction	8	12.307	0.0271
GO:0006575~cellular amino acid derivative metabolic process	3	4.615	0.0345
GO:0008202~steroid metabolic process	2	3.076	0.0543
GO:0006805~xenobiotic metabolic process	2	3.076	0.0804
GOTERM_CC_FAT			
GO:0005886~plasma membrane	5	76.923	0.0021
GO:0005794~Golgi apparatus	3	4.615.	0.0546
GO:0009898~internal side of plasma membrane	2	3.076	0.0570
GO:0044459~plasma membrane part	3	4.615	0.0622
GOTERM_MF_FAT			
GO:0008146~sulfotransferase activity	4	6.153	0.0020
GO:0016782~transferase activity, transferring sulfur-containing groups	4	6.153	0.0028
GO:0008289~lipid binding	4	6.153	0.0216
GO:0005506~iron ion binding	5	76.923	0.0467

KEGG_PATHWAY			
dre03320:PPAR signaling pathway	3	4.615	0.0431
dre00071:Fatty acid metabolism	3	4.615	0.0501
dre00620:Pyruvate metabolism	3	4.615	0.0733
dre03320:PPAR signaling pathway	3	4.615	0.0431

Tab.10: processi biologici, componenti cellulari, funzioni molecolari e KEGG pathways risultate dall'analisi con DAVID

Come si può notare dalla tabella di cui sopra, tra le funzioni biologiche presenti, alcune di esse fanno parte dei processi biotrasformativi o della risposta agli stress. Quello che si nota sono geni coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici e diverse funzioni molecolari presumibilmente coinvolte nella detossificazione, come "Sulfotransferase activity" e "Xenobiotic metabolism". L'analisi dei processi biologici ha inoltre evidenziato diversi geni differenzialmente espressi con un ruolo nei processi di ossido-riduzione. Tra gli otto trascritti aventi un ruolo in questo processo biologico, quattro codificano per *cytochrome P450*.

Il citocromo p450 costituisce una superfamiglia di enzimi microsomiali di fase I specializzati nella biotrasformazione degli xenobiotici. Formano un complesso con la NADH- citocromo P450 riduttasi e la loro attività di ossidasi a funzione mista coinvolge l'O₂, di cui un atomo viene ridotto ad acqua e l'altro sfruttato per l'ossidazione del substrato. Le caratteristiche di inducibilità dei citocromi P450 rendono gli enzimi appartenenti a questa famiglia dei buoni indicatori della presenza di inquinanti xenobiotici nell'ambiente, e ne consentono quindi l'utilizzo come biomarkers. E' stato osservato infatti che alcune classi di composti, come ad esempio i bifenili (come i PCB) e le diossine, sono in grado di provocare un'induzione del citocromo. Un esempio in proposito è fornito dalla 2,3,7,8 – tetracloro-p-dibenzodiossina (TCDD), la cui capacità di indurre il citocromo P-450 deriva dal legame che essa attua con il recettore citosolico degli idrocarburi aromatici (*AhR: Aryl Hydrocarbon Receptor*), chiamato anche "recettore della diossina" (*Galli et al., 2007*).

I PPAR – "*Peroxisome proliferator-activated receptor*" – sono recettori ormonali nucleari che vengono attivati da acidi grassi e loro derivati. PPAR ha tre sottotipi (PPAR alpha, beta/delta e gamma) che mostrano diversi pattern di espressione nei vertebrati. Ciascuno

di essi è codificato in un gene separato e lega gli acidi grassi e eicosanoidi. La presenza di PPAR si è visto essere correlata a variazioni stagionali ed essere legata al ciclo riproduttivo; come espresso da Cancio *et al.* (1999) in *Mytilus edulis*, infatti, cambiamenti nel numero dei perossisomi sono stati correlati a variazioni stagionali nel contenuto di lipidi neutri nella ghiandola digestiva, in relazione al ciclo riproduttivo ed all'assunzione di cibo. Tuttavia da altri studi è stato dimostrato come l'esposizione di animali marini ad alcuni inquinanti organici e metalli – quali *benzo(a)pyrene* (B(a)P), il *di(2-ethylhexyl)phthalate* (DEHP) ed il Cadmio (Cd) – , causa non solo la proliferazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), con alterazioni nella produzione dei meccanismi di difesa (antiossidanti); ma anche la proliferazione dei perossisomi, processo questo che comporta la produzione di ulteriori ROS.

Questa analisi ha quindi permesso di identificare alcuni processi biologici, che potrebbero essere influenzati dalla presenza degli inquinanti.

Analisi mediante PAM

Tramite il software PAM (*Prediction Analysis for Microarray*) è possibile identificare il set minimo di geni in grado di discriminare le varie popolazioni, sulla base dei valori di espressione genica (*Tibshirani et al., 2002*). PAM è una tecnica di *clustering*, in quanto utilizza dati di espressione genica per calcolare il “*centroid*” – baricentro – per ogni gruppo, per poi prevedere come un campione sconosciuto cadrà nella zona base più vicina al centroide. Attraverso questo processo, PAM è in grado di identificare anche i geni specifici che determinano per la maggior parte il centroide, ovvero i geni relativi ad un dato gruppo. Nel caso del nostro studio, abbiamo ricercato il gruppo minimo di geni in grado di discriminare gli animali provenienti da Porto Marghera, area interdotta all'uso della pesca per fini alimentari. Dalle analisi condotte, è risultato sufficiente un gruppo di tre geni per discriminare un *pool* come proveniente dall'area oggetto dell'interdizione alla pesca.

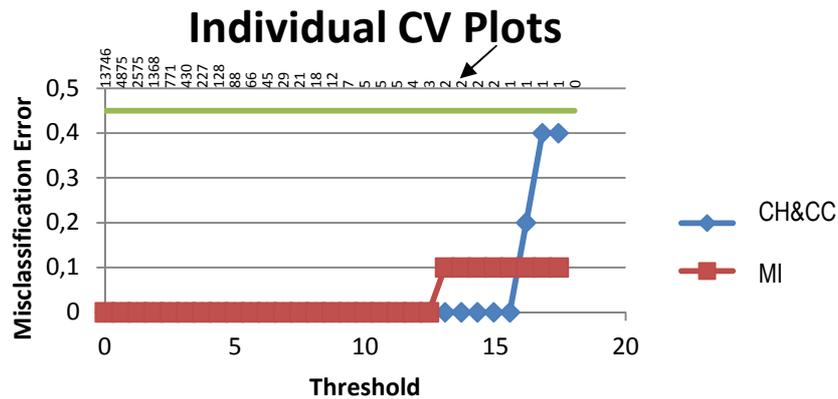


Figura 11: Grafico rappresentante l'analisi di PAM: un set di 3 trascritti è in grado di classificare i 2 gruppi (Porto Marghera e altre aree di campionamento) con un errore di assegnazione pari a 0

Come mostrato nella figura 11, la suddivisione tra i due gruppi – “CH & CC” ed “MI” (ovvero tutti i campioni delle altre aree contro quelli di Porto Marghera) – risulta evidente se si discrimina per tre geni, come indicato dalla freccia. L'errore di assegnazione con il set di tre geni in questo caso è pari a zero.

Al fine di validare il set di trascritti in grado di identificare gli animali campionati nell'area industriale si è effettuata un'analisi di assegnazione di ciascuno dei *pool* analizzati (Figura 12).

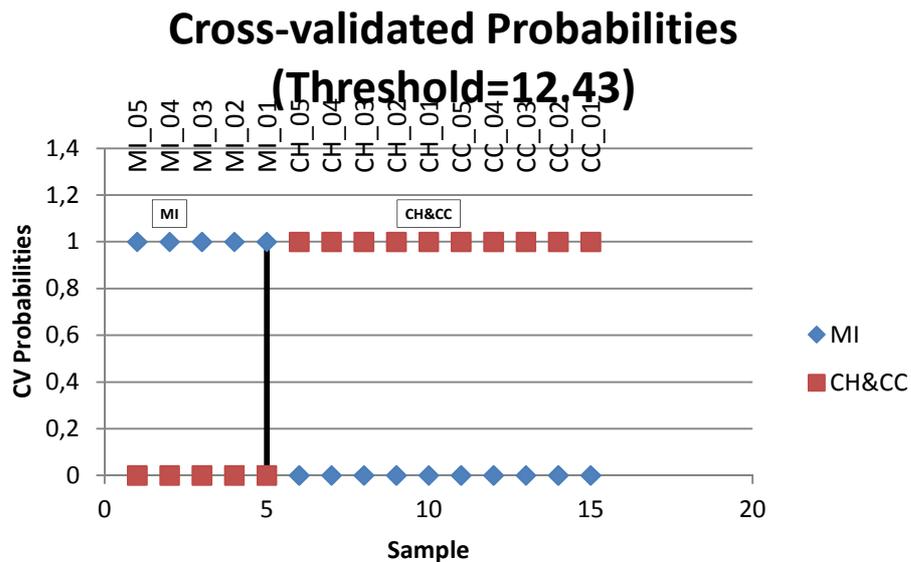


Figura 12: Cross-validated Probabilities: Assegnazione dei pool al gruppo di animali provenienti da Marghera e dalle altre due aree di campionamento. Nell'asse y è riportata la probabilità di assegnazione a ciascuno dei due gruppi.

Come si può vedere dalla Figura 12, la *cross-validazione* effettuata con PAM, utilizzando il set di geni minimi selezionato, è stata in grado di assegnare i pool analizzati alle popolazioni di origine. Grazie a questo set di geni siamo quindi in grado di assegnare ciascun pool alla popolazione d'origine.

Probe Name	Score 1	Score 2	Gene Name
ruditapesP_c17047	2,0469	-1,0234	Glutathione S-transferase theta-1
ruditapesP_c25931	1,1327	-0,5663	Nose resistant to fluoxetine protein 6
ruditapesP2_c2899	0,147	-0,0735	None

Tab.11: Geni identificati da PAM in grado di discriminare le popolazioni campionate

Come mostra la tabella di cui sopra, è stato possibile risalire all'annotazione per soli due dei tre trascritti identificati dall'analisi fatta con PAM. Uno dei trascritti in questione codifica per un gene importante nei processi di detossificazione – la *Glutathione S-Transferasi* –, mentre per l'altro non è nota una correlazione tra la sua espressione e la presenza di inquinanti – *Nose Resistant To Fluoxetine Protein 6* –.

La correlazione tra gli inquinanti e la GST è stata presa in considerazione in diversi lavori ed in specie diverse (*Viganò et al., 2001; Napierska et al., 2005*). Alcuni studi, condotti su *Mytilus galloprovincialis* (*Banni et al., 2010*) e su *Chlamys ferrari* (*Pan et al., 2005*), dopo esposizione all'idrocarburo policiclico aromatico *benzo [a] pirene* (B[a]P) ed a *benzo (k) fluorantene* (Bkf), hanno dimostrato come all'aumentare della concentrazione del tossico, aumentava anche l'attività della GST. L'induzione da parte degli IPA della GST è infatti dimostrata in diversi studi (*Ramos-Gómez et al., 2011; Myrnes et al., 2007; Orbea et al., 2002; Galloway et al., 2004*). Altre analisi, condotte per osservare gli effetti di altri contaminanti – metalli pesanti (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, e Zn) e PCB – su *Carcinus maenas*, vongole *Ruditapes philippinarum* e *Laternula elliptica*, ha dimostrato che anche in questo caso la GST subisce un'induzione significativa in entrambi gli organismi considerati (*Martín-Díaz M.L. et al., 2007, Park et al., 2009*). E' stato poi osservato che le diossine in orate (*Abalos et al., 2008*) ed in carpe (*Carassius auratus gibelio*) (*Guosheng et al., 1998*) mostravano di avere i medesimi effetti visti precedentemente per gli altri inquinanti. Un'ulteriore conferma del ruolo di questa proteina nel metabolismo degli xenobiotici è data dalla up-regolazione che è stata rilevato nel bivalve in risposta all'esposizione ad una miscela di PCB.

La “Nose resistant to fluoxetine protein 6” (o NRF-6) è una proteina con 12 domini transmembrana, identificata per la prima volta in *C. elegans*. Uno studio ha dimostrato come in questi organismi, quelli che presentano mutazioni a livello del gene della nrf-6, siano resistenti agli effetti tossici provocati dalla fluoxetina cloridrato – un inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina (SSRI) nei neuroni centrali –. È possibile che questa proteina agisca in complesso con NDG-4 (*Resistant to nordihydroguaiaretic acid-4*) ; infatti entrambe sono proteine transmembrana che possono agire insieme, creando un complesso con la funzione di trasporto della fluoxetina, attraverso la barriera ipodermica all'interno dell'animale, dove può quindi agire sul bersaglio neuromuscolare, per indurre una contrazione (*Choy et al., 1999*). Sembra essere di vitale importanza per lo sviluppo embrionale. Ulteriori studi saranno tuttavia necessari per comprendere la funzione di questa proteina anche in *R. philippinarum*.

Un ulteriore analisi utilizzando PAM è stata effettuata al fine di identificare il set minimo di trascritti in grado di identificare la provenienza da ciascuna delle tre aree analizzate. Il grafico riportato in Figura 13 dimostra come i campioni di Colmata (CC) e Chioggia (CH) siano difficilmente differenziabili. Per questo una corretta assegnazione alle aree di provenienza può essere ottenuta considerando almeno 145 trascritti.

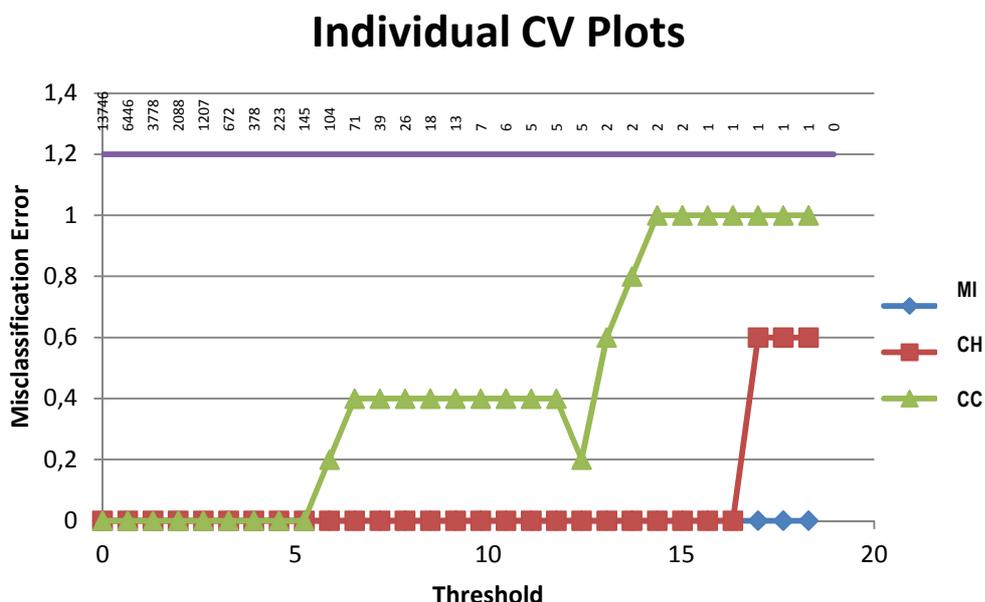


Figura 13: Grafico rappresentante l'analisi di PAM: suddivisione tra i tre gruppi

Questo è dimostrato in figura 14 dove si è provato ad assegnare i campioni utilizzando un set di 5 trascritti. Il risultato evidenzia che, nonostante ci sia una corretta assegnazione degli animali provenienti da Marghera, non sia possibile assegnare correttamente almeno 3 dei 5 pool di animali provenienti da Colmata.

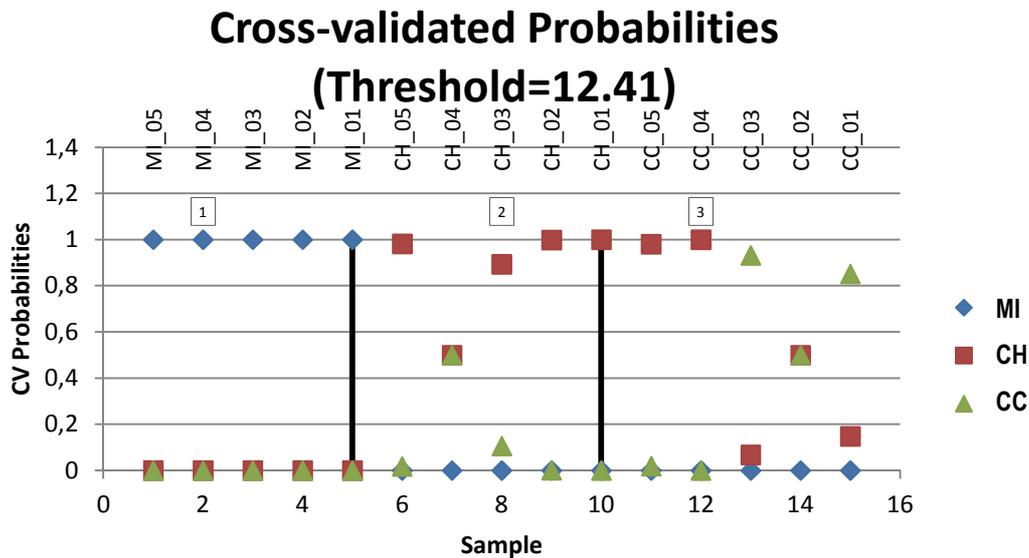


Fig.14: Cross-validated probabilities

Siamo andati inoltre ad osservare i valori di espressione di sette geni – c14595, 17047 (GST), 28883 (aryl sulfotransferase isoform 5), 2c_2341, c12315, c20179, c1189e – già utilizzati come biomarcatori in un lavoro precedente (*Milan et al., in pubblicazione*). Questo set minimo nello studio di Milan *et al.* risultava in grado di discriminare i campioni della popolazione di Marghera rispetto a quelli delle altre popolazioni. La presenza di questo set di biomarcatori è stata confermata anche nei campioni di Gennaio. Sono stati quindi creati dei grafici (Figura 15) che rappresentano l'espressione di ciascun biomarcatore del set del lavoro precedente (*Milan et al., in pubblicazione*) ricercato negli animali campionati nel periodo di Gennaio. In essi si può osservare una sovraespressione dei campioni pescati nell'area di Porto Marghera. Questa analisi permette quindi di confermare la presenza di questi geni anche nel mese di Gennaio. Questo set è quindi in grado di identificare la provenienza dei campioni, anche in un periodo di tempo minore.

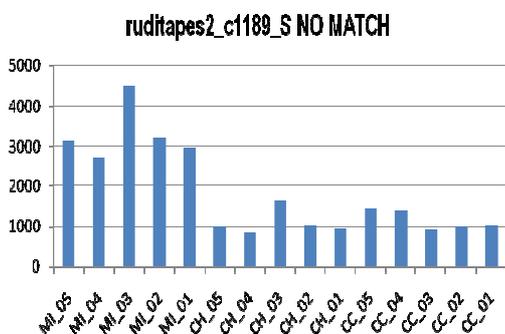
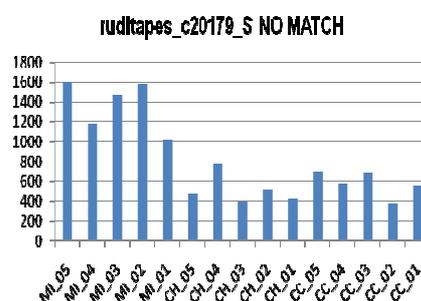
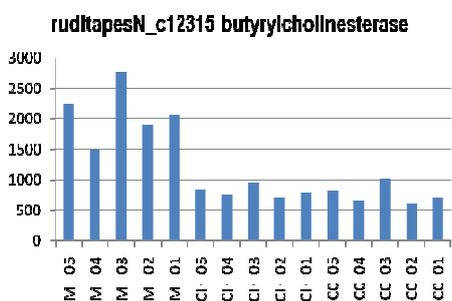
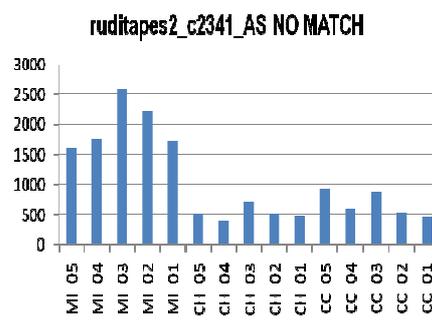
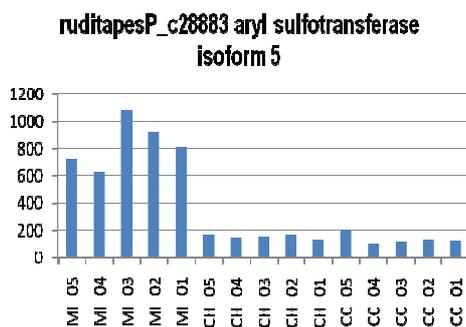
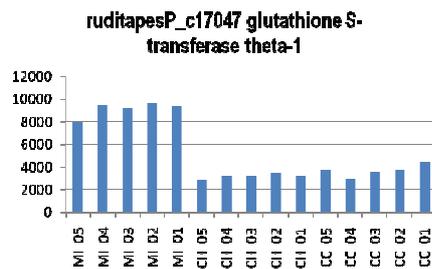
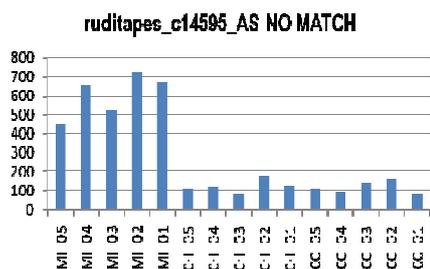


Figura 15 : Grafici dei valori di espressione del set di biomarcatori confermato a Gennaio

Validazione mediante qRT PCR

Per validare le performance della piattaforma *microarray*, un set di geni significativi è stato testato, utilizzando la metodica qRT PCR.

Per fare ciò, sono stati analizzati quattro campioni per ciascun *pool* rappresentato in *array* per il mese di Gennaio – per un totale di 60 campioni – e 10 campioni per il campionamento di Febbraio – per un totale di 30 campioni – . Questo ha permesso, per i campioni del mese di Gennaio, di attuare una correlazione tra le analisi ottenute con la piattaforma *microarray*; mentre i campioni del mese di Febbraio sono serviti per confermare i biomarcatori, mediante qRT PCR. I trascritti per i quali è stato scelto di analizzare l'espressione genica in real-time sono: c20179, 2c_2341, c1189e, 12315 (AChE), 17047 (GST), 28883 (SULT), 25931 (NRFP6). E' importante notare che alcuni geni differenzialmente espressi tra quelli scelti, sono ancora sconosciuti; il che implica che si abbiano, purtroppo, dei potenziali biomarcatori non ancora identificati, a causa del ridotto numero di annotazioni disponibili per *R. philippinarum*.

Test statistico di Mann-Whitney

Il test di Mann-Whitney è un test non parametrico, che è stato utilizzato per verificare l'ipotesi nulla che due campioni provengano dalla stessa popolazione (cioè hanno la stessa mediana).

Il test è stato applicato per valutare se i geni considerati avessero un *pattern* di espressione caratteristico in ciascuna popolazione campionata e, quindi, se permettessero di discriminare la provenienza degli animali campionati. Nello specifico il test è stato condotto considerando due gruppi di individui: quelli campionati a Porto Marghera e quelli campionati negli altri due siti (Chioggia e Colmata). Il test è stato effettuato senza considerare la dimensione temporale e quindi sulla popolazione complessiva di individui pescati nei mesi di gennaio e febbraio (vedi Tab 13).

	AchE	GST	Rp_c20179	Rp_c2341	Sulf2A	NRFP6	Rp_c1189
Mann-Whitney U	243.000	197.500	203.000	38.000	64.500	86.000	139.500
Wilcoxon W	1063.000	1017.500	1023.000	858.000	884.500	906.000	959.500
Z	-2.462	-3.176	-3.089	-5.677	-5.261	-4.924	-4.085
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014	.001	.002	.000	.000	.000	.000
Exact Sig. (2-tailed)	.013	.001	.002	.000	.000	.000	.000
Exact Sig. (1-tailed)	.007	.001	.001	.000	.000	.000	.000
Point Probability	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

Tabella 13: Test di Mann-Whitney (output del software SSPS). Gruppo 1: CH+CC (n=58); gruppo 2: MI (n=29). L'ipotesi nulla viene rifiutata per tutti i geni considerati ($p < 0.05$ in tutti i casi).

Il profilo di espressione di tutti i geni è statisticamente differente tra gli individui campionati nelle aree interessate da un basso livello di inquinamento (Chioggia e Colmata) e quelli pescati nelle acque di Porto Marghera interno. Questo conferma quanto visto nelle analisi di microarray.

	AchE	GST	Rp_c20179	Rp_c2341	Sulf2A	NRFP6	Rp_c1189
Mann-Whitney U	66.000	35.000	47.000	14.000	7.000	65.500	29.000
Wilcoxon W	102.000	206.000	218.000	185.000	178.000	236.500	182.000
Z	-.333	-2.056	-1.389	-3.222	-3.611	-.361	-2.272
Asymp. Sig. (2-tailed)	.739	.040	.165	.001	.000	.718	.023
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.765(a)	.041(a)	.177(a)	.001(a)	.000(a)	.724(a)	.023(a)
Exact Sig. (2-tailed)	.765	.040	.177	.001	.000	.734	.023
Exact Sig. (1-tailed)	.382	.020	.089	.000	.000	.367	.011
Point Probability	.021	.002	.009	.000	.000	.010	.002

Tabella 14: Test di Mann-Whitney (output del software SSPS), campionamento di febbraio. Gruppo 1: CH+CC (n=18); gruppo 2: MI (n=9). L'ipotesi nulla viene rifiutata per i geni GST, Rp_c2341, Sulf2A e Rp_c1189 ($p < 0.05$)

Nel mese di febbraio, invece, solo alcuni geni (GST, Rp_c2341, SULF2A e Rp_c1189) presentano un profilo di espressione statisticamente differente tra gli individui campionati nelle aree interessate da un basso livello di inquinamento e quelli pescati nelle acque di Porto Marghera interno.

L'assenza di significatività statistica per i geni AchE, Rp_c20179 ed NRFP6 può essere spiegata dalla scarsa numerosità dei campioni (solo 8 individui singoli campionati a Marghera interno) ed una elevata variabilità inter-individuale.

Correlazione statistica *Spearman rho*

Per valutare il grado di correlazione tra i risultati ottenuti in *microarray (pool)* e quelli registrati in *Spearman* (in singolo), sugli individui campionati nel mese di gennaio, è stato utilizzato il test di correlazione di *Spearman*, che consiste nell'utilizzo di un "indice di correlazione *rho* per ranghi di *Spearman*", cioè di una misura statistica, non parametrica, della correlazione di due variabili ordinali. Il coefficiente di correlazione *rho* di *Spearman* è un numero compreso tra -1 e 1, dove il valore assoluto indica l'entità della correlazione (1 = massima correlazione) e il segno ne indica la direzione (positiva o negativa).

È stato pertanto valutato il grado di correlazione tra i valori di espressione di ciascun pool di individui e i relativi individui singoli (in numero di 4 per ciascun pool). Nello specifico: la correlazione è stata effettuata tra il valore di fluorescenza di ciascun pool, registrato in array, e il $\Delta\Delta C_t$ media di 4 dei 10 campioni che compongono ogni pool.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza una correlazione statisticamente significativa tra i livelli di espressione per ciascuno dei geni bersaglio considerati (vedi Tab.12). Per tutti i geni, tranne uno, si è riscontrata infatti una correlazione significativa ($p\text{-value} \leq 0.01$) con valori di *Spearman rho* compresi tra 0.7 e 0.8. Solo per il gene 12315 (relativo ad AChE) non è stata dimostrata correlazione. Questo potrebbe essere imputabile alla variabilità inter-individuale dell'espressione di questo gene, che risulta comunque significativamente sovra-espresso nella popolazione di Porto Marghera (in *microarray* e in *real-time*).

Gene	Probe	<i>Spearman's rho</i> qPCR/probe (63 samples)
No match	ruditapes_c20179	.664(**)
No match	ruditapes_2c2341	.779(**)
NRFP6	ruditapesP_c25931	.789(**)
GST	ruditapes_c17047	.732(**)
AChE	ruditapesN_c12315	.436
No match	ruditapes_c1189	.739(**)
SULT	ruditapes_c28883	.711(**)

Tab.12: Tabella relativa ai risultati ottenuti con il test di correlazione di *Spearman*, condotto mediante software statistico SPSS v. 12.0. (**: $p\text{-value} \leq 0.01$)

Conclusione

I risultati, avvalorati dalla ricerca eseguita su altri studi, sembrano quindi confermare i dati da noi ottenuti nella Laguna di Venezia, nella quale è stata dimostrata un'elevata esposizione a sostanze inquinanti negli animali provenienti da Marghera. L'utilizzo della piattaforma *microarray* in quest'ottica di lavoro d'indagine eco tossicologica, conferma quindi le sue potenzialità ed il suo valore come oggetto d'indagine nell'ambito tossico genomico. Il *microarray* nel nostro studio ha permesso di ottenere delle conoscenze preliminari relative alle conseguenze dell'esposizione cronica a diverse classi di inquinanti ambientali nell'organismo sentinella *R. philippinarum*, nell'ottica della sicurezza alimentare e della salute del consumatore; in quanto l'utilizzo di questa specie in ambito alimentare e la sua ampia diffusione, possono rappresentare un pericolo per la salute pubblica, se non sono attuate le giuste norme di prevenzione dal rischio. L'individuazione di una set di geni come biomarcatori potrebbe poi rappresentare un sicuro meccanismo di controllo contro le frodi alimentari, che mirano a falsificare la vera origine del prodotto; in quanto tramite i biomarcatori sarebbe possibile individuare senza ombra di dubbio la vera origine dell'alimento, nell'ottica di un controllo di filiera, che mira a salvaguardare la salute del consumatore.

Studiando i geni ricavati dall'analisi del *microarray*, associata alla validazione con qRT-PCR, si potrebbe adottare un nuovo test di *screening* basato sull'identificazione di geni considerati biomarcatori, in grado di precedere le analisi mediante spettrofotometria di massa, in modo da permettere un'analisi a priori sulla presenza di contaminanti in una data zona, da confermare successivamente con delle analisi chimiche in grado di misurare la concentrazione degli xenobiotici. Questo potrebbe migliorare il monitoraggio dell'ecosistema lagunare, permettendo di agire in modo mirato e riducendo i costi ed i tempi delle analisi.

Tuttavia, nonostante le nuove tecnologie di sequenziamento permettano di ottenere a costi sempre più accessibili e in tempi brevi, interi trascrittomi di nuove specie per alcune di esse – come nel caso di *R. philippinarum* – non è possibile risalire all'identità di tutti i geni rappresentati nel trascrittoma sequenziato. L'opportunità di avere il sequenziamento del genoma o trascrittoma genomico di altre specie di bivalvi potrà permettere una più accurata annotazione in futuro anche per *R. philippinarum*.

Bibliografia

Abalos M, Abad E, Estévez A, Solé M, Buet A, Quirós L, Piña B, Rivera J: Effects on growth and biochemical responses in juvenile gilthead seabream 'Sparus aurata' after long-term dietary exposure to low levels of dioxins, *Chemosphere*. 2008 Aug;73(1 Suppl):S303-10. Epub 2008 May 9

Akcha F., Izuel C., Venier P., Budzinski H., Burgeot T., Narbonne J-F., 2000, Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aqua Toxicol.* 49, 269–287

Albani A, Favero VM, Serandrei Barbero R (1995): The geochemistry of recent sediments in the lagoon of Venice: environmental implications. *Atti dell' Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti CLIII*, pp 235–321

Anzenbacher P., Anzenbacherová E., *Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics*, CMLS, *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2001) 737–747, Birkhäuser Verlag, Basel

Apitz SE, Barbanti Andrea, Bernstein Alberto Giulio, Bocci Martina, Delaney Eugenia e Montobbio Laura, The Assessment of Sediment Screening Risk in Venice Lagoon and other Coastal Areas using International Sediment Quality Guidelines. *J Soils Sediments* 7 (5) 326 – 341 2007

Arpa Emilia-Romagna, I quaderni di Arpa: Bioaccumulo di microinquinanti nella rete trofica marina, 2010

Au D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar Pollut Bull* 48, 817-834.

Auld David S., Bert L Vallee, *Carboxypeptidase A*, CHAPTER 4, A. Neuberger and K. Brocklehurst (Eds.), *Hydrolytic Enzymes*, 1987, Elsevier Science Publishers RV. (Biomedical Division)

Baccetti B., Bedini C., Capanna E., Cobolli M., Ghirardelli E., Giusti F., Minelli A., Ricci N., Ruffo S., Sarà M., Zullini A., 1994. Lineamenti di zoologia sistematica. Zanichelli Bologna 200-212

Banni M., A.Negri, A.Dagnino, J.Jebali, S.Ameur, H.Boussetta; Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (2010) 842–848

Banni, M., Jebali, J., Daubez, M., Clerandeaux, C., Guerbej, H., Narbonne, J.F., Boussetta, H., 2005. Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers* 10 (2–3), 105–116.

Bargagli B., Cruscanti M., Leonzio C. e Bacci E., 1998. I bioindicatori

Bayarri, S., Turrio Baldassarri, L., Iacovella, N., Ferrara, F., & di Domenico, A., 2001. PCDDs, PCDFs, PCBs, and DDE in edible marine species from the Adriatic sea. *Chemosphere* 43, 601 – 610

Bayne B.L., Livingstone D.R., Moore M.N. e Widdows J., 1976. A cytochemical and a biochemical index of stress in *Mytilus edulis* L.. *Mar Pollut Bull* 7, 221- 224

Bayne BL, Brown DA, Burns K, Dixon DR, Ivanovici A, Livingstone DR, Lowe DM, Moore MN, Stebbing ARD, Widdows J (1985). The effects of stress and pollution on marine animals. Prager Scientific.

Berg Karin, Pål Puntervoll, Stig Valdersnes, Anders Goksøyr, Responses in the brain proteome of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to methylmercury, 2010, *Aquatic Toxicology* 100; 51–65

Biyokimya Türk Dergisi, Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance, [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem] 2003; 28 (2); 54-61

Blalock Eric M., A Beginner's Guide to Microarrays, (Ed.) Hardcover 2003, 368 p.

Blasco J., J. Puppo. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 122 (1999) 253–263

Bona F., Cecconi G., Maffiotti A. 2000 - An integrated approach to assess the benthic quality after sediment capping in Venice lagoon. *Aquatic Ecosystem Health and Management*. 3: 379-386

Borgå, K., Fisk, A.T., Hargrave, B., Hoekstra, P.F., Muir, D.C.G., 2005. Bioaccumulation Factors for PCBs Revisited. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4523 - 4532

Borghi and Porte, Organotin pollution in deep-sea fish from the Northwestern Mediterranean, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002), pp. 4224–4228

Bustin S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.*, Oct;25(2):169-193

Butler, G. C. 1978, *Principles of ecotoxicology*; Published on behalf of the Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE) of the International Council of Scientific Unions (ICSU; New York)

Cajaraville Miren P, Ibon Cancio, Arantza Ibabe, Amaia Orbea; Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment., *Microsc Res Tech.* 2003 June 1; 61(2): 191–202

Cancio I, Ibabe A., Cajaraville M.P.; Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content; *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1999 June; 123(2): 135–144

Carnevali O, Maradonna F., Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers, *Gen Comp Endocrinol.* 2003 May;131(3):203-8

Cesari P., Pellizzato M., 1985. Molluschi pervenuti in Laguna di Venezia per apporti volontari o casuali. Acclimazione di *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley, 1933) e di *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *Boll. Malacologico, Milano*, 21 (10-12): 237-274

Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 52, 189–203

Choy R.K., Kemner J.M., Thomas J.H., Fluoxetine-resistance genes in *Caenorhabditis elegans* function in the intestine and may act in drug transport, *Genetics*. 2006 Feb;172(2):885-92

Choy R.K., Thomas J.H., Fluoxetine-resistant mutants in *C. elegans* define a novel family of transmembrane proteins, 1999, *Mol. Cell* 4, 52-143,

Da Ros L, Meneghetti F, Nasci C: Field application of lysosomal destabilisation indices in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: biomonitoring and transplantation in the Lagoon of Venice (north-east Italy). *Mar Environ Res* 2002, 54:817-22.

Da Wei Huang, Brad T Sherman, Richard A Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nature Protocols* 4, 44 - 57 (2008)

Depledge M.H. e Fossi M.C., 1994. The role of biomarker in environmental assessment: invertebrates. *Ecotoxicology*. 3, 173-179.

Depledge, 1994. M.H. Depledge. In: M.C. Fossi and C. Leonzio, Editors, *Non-destructive Biomarkers in Vertebrates*, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida (1994), pp. 271–295

Devauchelle N., 1990. Sviluppo sessuale e maturità di *Tapes philippinarum*. In: E.S.A.V. (Ed.), *Tapes philippinarum, Biologia e sperimentazione*. E.S.A.V., Treviso, pp. 49-58

EPA, 2000. Bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assessment: status and needs, EPA-823-R-00-001 and Appendix, EPA-823-R- 00-002.

Epifani R., 2009. Indicatori per il monitoraggio ambientale. Tesi di Dottorato di ricerca in Colture Erbacee, Sistemi Agroterritoriali e Genetica Agraria, Università degli Studi di Bologna

Erdős E.G., E.M. Sloane, I.M. Wohler, Carboxypeptidase in blood and other fluids: Properties, distribution, and partial purification of the enzyme, *Biochemical Pharmacology*, Volume 13, Issue 6, June 1964, Pages 893-905

Fossi M.C. *Biomarkers: strumenti di diagnosi e prognosi ambientale*. Rosini Editrice, Firenze, 2000

Frignani M, Bellucci LG, Langone L Muntau H (1997): Metal fluxes to the sediments of the northern Venice Lagoon. *Marine Chemistry* 58, 275–292

Frignani M, Bellucci LG, Raccanelli S, Carraro C (2001): Polychlorinated biphenyls in sediments of the Venice lagoon. *Chemosphere* 43, 567–575

Galli C.L., Corsini E., Marinovich M.. *Tossicologia*, II edizione, Editore Piccin 2008

Galloway T.S., Brown R.J., Browne M.A., Dissanayake A., Lowe D., Jones M.B., Depledge M.H.; A multibiomarker approach to environmental assessment, *Environ Sci Technol.* 2004 Mar 15;38(6):1723-31

Gaworecki KM, Rice CD, van den Hurk P: Induction of phenol-type sulfotransferase and glucuronosyltransferase in channel catfish and mummichog. *Mar Environ Res* 2004, 58:525–528

Gill T.S.,Tewari H.,Pande J., 1990. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. Part C97(2)*,287–292

Goksoyr, A., 1991. A semi-quantitative cytochrome P450IA1 ELISA: a simple method for studying the monooxygenase induction response in environmental monitoring and ecotoxicological testing of fish. *Sci. Total Environ.* 101, 255–262

Goksøyr, A., Arukwe, A., Larsson, J., Cajaraville, M.P., Hauser, L., Nilsen, B.D., Lowe, D., Matthiessen, P., 2003. Molecular/cellular processes and the impact on reproduction. In: Lawrence, A., Hemingway, K. (Eds.), *Effects of pollution on fish*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 179–220

Goldberg, E.D., 1975. The mussel watch — a first step in global marine monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 6, 111

Goldberg, E.D., Bertine, K.K., 2000. Beyond the mussel watch—new directions for monitoring marine pollution *Sci. Total Environ.* 247, 165–174.

Guilhermino L., Lacerda MN., Nogueira AJ., Soares AM., 2000. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Sci.Total Environ.* 247 (2–3),137–141

Guosheng Chen, Xu Ying, Xu Lihong, Zhang Yongyuan, Karl-Werner Schramm, Antonius Kettrup, Influence of Dioxin and Metal-contaminated sediment on phase I and II biotransformation enzymes in silver crucian carp, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 40, Issue 3, July 1998, Pages 234-238

Hahn M.E., 2002. Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment. *Sci Total Environ* 28, 49-69.

Hayes, J.D., Wolf, C.R., 1988. In: Sies, H., Ketterer, B. (Eds.), *In Glutathion Conjugation: Mechanism and Biological Significances*. Academic Press, London, pp. 315–355.

Hugget R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M. e Bergman H.L., 1992. In: AA.VV., *Biomarkers: biochemical, physiological and hystological Markers of anthropogenic stress*. Lewis: Boca Raton, FL, pp. 265.

Ibba Michael, Dieter Söll, *Aminoacyl-Trna Synthesis*, *Annu. Rev. Biochem.* 2000. 69:617–50

Iserentant R. e De Sloover J., 1976. Le concept de bioindicateur. *Mem Soc Roy Bot Belg* 7, 15-24. Lazzari g., rinaldi e., 1994. Alcune considerazioni sulla presenza di specie extra mediterranee nelle lagune salmastre di Ravenna. *Boll. Malacologico*, 30 (5-9): 195-202

Keen, J.H., Jakoby, W.B., 1978. Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J. Biol. Chem.* 253, 5654–5657

Kopecka Justyna , Pempkowiak Janusz, Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70 (2008) 379–391

Kurelec, B., Britvic, S., Rijavec, M., Muller, W.E.G., Zahn, R.K., 1977. Benzo (a)pyrene monooxygenase induction in marine fish—Molecular response to oil pollution. *Mar. Biol.* 44, 211–216

Lake, J.L., Rubinstein, N.I., Lee II, H., Lake, C.A., Heltshe, J., Pavignano, S., 1990. Equilibrium Partitioning and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Infaunal Organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 9, 1095 – 1106

Lalli C.M., Parsons T.R. (1993). *Biological oceanography: an introduction*. Pergamon Press, Oxford

Lam P.K.S. e Gray J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar Pollut Bull* 46, 182-186.

Lavado R, Janer G, Porte C.; Steroid levels and steroid metabolism in the mussel *Mytilus edulis*: the modulating effect of dispersed crude oil and alkylphenols; *Aquat Toxicol*. 2006 Jun 1;78 Suppl 1:S65-72

Lie KK, Lanzen A, Breilid H, Olsvik PA: Gene expression profiling in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) from two contaminated sites using a custom-made cDNA microarray. *Environ Toxicol Chem* 2009, 28:1711-21.

Lima Inês, Susana M. Moreira, Jaime Rendón-Von Osten, Amadeu M.V.M. Soares, Lúcia Guilhermino; Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal; *Chemosphere*, Volume 66, Issue 7, January 2007, Pages 1230-1242

Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4), 402-408

Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.

Locatello L., Matozzo V., Marin M.G., Biomarker responses in the crab *Carcinus aestuarii* to assess environmental pollution in the Lagoon of Venice (Italy), *Ecotoxicology* 2009 Oct;18(7):869-77 Epub 2009 Jun 5

Losso C. e Volpi Ghirardini A., 2010. Overview of ecotoxicological studies performed in the Venice Lagoon (Italy). *Environ Int* 36, 92-121.

Maffiotti e L. Volterra. *Analisi e recupero dei sedimenti marini. Quaderni di tecniche di protezione ambientale*. Pitagora Editrice Bologna. 139 pp.

Maffiotti, A. & Bona, F., 1997. Introduzione all'ecotossicologia In: F. Bona, A. Maffiotti, L. Volterra Analisi e recupero dei sedimenti marini. Quaderni tecnici di protezione ambientale - Valutazione di impatto ambientale, n57 Pitagora Editrice Bologna ,pp.17-28

Magistrato delle acque di Venezia. Attività di salvaguardia di Venezia e della sua laguna: lo stato ecologico della laguna. Rapporto tematico, settembre 2008.

Mannervik, B., Danielson, U.H., 1989. Glutathione transferases—structure and catalytic activity. CRC Crit. Rev. Biochem. 23, 283–337.

Manning, W.J. e Feder W.A. (1980). Biomonitoring air pollutants with plants. Applied Science Pub. Ltd, London, UK, pp. 142.

Marin, M.G., Matozzo, V., 2004. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. Mar. Pollut. Bull. 48, 835–839.

Mark G.J. Hartl, Cristiano Poletto, Susanne Charlesworth, Chapter 6, Biomarkers in integrated ecotoxicological sediment assessment, 2010, Blackwell Publishing Ltd

Martín-Díaz M.L., Blasco J., Sales D., Delvalls T.A., Biomarkers study for sediment quality assessment in spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*, Arch Environ Contam Toxicol. 2007 Jul;53(1):66-76

Martin-Skilton Rebeca, Michael W.H. Coughtrie, Cinta Porte, Sulfotransferase activities towards xenobiotics and estradiol in two marine fish species (*Mullus barbatus* and *Lepidorhombus boscii*): Characterization and inhibition by endocrine disrupters, Aquatic Toxicology Volume 79, Issue 1, 12 August 2006, Pages 24-30

Matozzo V, Binelli A, Parolini M, Locatello L, Marin MG., Biomarker responses and contamination levels in the clam *Ruditapes philippinarum* for biomonitoring the Lagoon of Venice (Italy), J Environ Monit. 2010 Mar;12(3):776-86

Matozzo V, Marin MG., First evidence of altered vitellogenin-like protein levels in clam *Tapes philippinarum* and in cockle *Cerastoderma glaucum* from the Lagoon of Venice, Mar Pollut Bull. 2007;55(10-12):494-504

Matozzo V, Tomei A, Marin MG: Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar Pollut Bull* 2005, 50:1686–1693.

Matozzo V, Tomei A, Marin MG: Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar Pollut Bull* 2005, 50:1686-93

Matozzo V, Tomei A, Marin MG: Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar Pollut Bull* 2005, 50:1686–1693

Matozzo Valerio, Andrea Binelli, Marco Parolini, Lisa Locatello and Maria Gabriella Marin. Biomarker responses and contamination levels in the clam *Ruditapes philippinarum* for biomonitoring the Lagoon of Venice (Italy). *J. Environ. Monit.*, 2010, 12, 776–786.

Matozzo, V., Marin, M.G., 2005. Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? *Environ. Res.* 97, 43–49.

Meyer, D.J., Coles, B., Pemble, S.E., Gilmore, K.S., Fraser, G.M., Ketter, B., 1991. Theta, a new class of glutathione transferase purified from rat and man. *Biochem. J.* 274, 409–414.

Meyer, D.J., Thomas, M., 1995. Characterization of rat spleen prostaglandin H D-isomerase as a sigma-class GSH transferase. *Biochem. J.* 311, 739–742.

Milan M., Coppe A., Reinhardt R., Cancela L.M., Leite R.B., Saavedra C., Ciofi C., Chelazzi G., Patarnello T., Bortoluzzi S., Bargelloni L.; Toxicogenomic analysis of *Ruditapes philippinarum* by DNA Microarray. *BMC Genomics*, 2011.

Milan M., Coppe A., Reinhardt R., Cancela L.M., Leite R.B., Saavedra C., Ciofi C., Chelazzi G., Patarnello T., Bortoluzzi S., Bargelloni L.; Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring. *BMC Genomics*. 2011 May 12;12:234.

Mizzan L., 1999. Le specie alloctone del macrozoobenthos della Laguna di Venezia: il punto della situazione. *Boll. Mus. civ. St. Nat. Venezia*, 49 (1998): 145-177

Mizzan L., 1999. Le species alloctone del macrozoobenthos della Laguna di Venezia: il punto della situazione. Bollettino del Museo Civico di Storia Naturale di Venezia, 49: 145-177

Mora P, Michel X, Narbonne JF: Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. Environ Toxicol Pharmacol 1999, 7:253–260.

Moraga, E. Mdelgi-Lasram, M.S. Romdhane, A.El Abed, I. Boutet, A. Tanguy, M. Auffret. Genetic responses to metal contamination in two clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. Marine Environmental Research 54 (2002) 521–525.

Moreiro, S.M., Guilhmino, L., 2005. The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest Portuguese coast. Environ. Monit. Assess. 105, 309–325.

Moschino Vanessa, Eugenia Delaney, Francesca Meneghetti, Luisa Da Ros, Biomonitoring approach with mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) and clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in the Lagoon of Venice. Environ Monit Assess (2011) 177:649–663.

MxPro Manual

Myrnes Bjørnar, Inge W. Nilsen, Glutathione S-transferase from the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): Isolation and partial characterization, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 144 (2007) 403–407

Napierska Dorota, Magdalena Podolska, Biomarkers of contaminant exposure: results of a field study with flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea, Marine Pollution Bulletin Volume 50, Issue 7, July 2005, Pages 758-767

Napierska Dorota, Magdalena Podolska, Field studies of eelpout (*Zoarces viviparus* L.) from Polish coastal waters (southern Baltic Sea), Science of The Total Environment Volume 371, Issues 1-3, 1 December 2006, Pages 144-155

Nasci C, Da Ros L, Nesto N, Sporni L, Passarini F, Pavoni B: Biochemical and histochemical responses to environmental contaminants in clam, *Tapes philippinarum*,

transplanted to different polluted areas of Venice Lagoon, Italy. *Mar Environ Res* 2000, 50:425-30

Nasci C, Nesto N, Monteduro RA, Da Ros L: Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy). *Mar Environ Res* 2002, 54:811-6

National Research Council (NRC), 1987. Biological Markers in Environmental Health Research. *Environ Health Perspect* 74, 3-9

Nesto N., Romano S., Moschino V., Mauri M., Da Ros L., Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy, *Marine Pollution Bulletin* Volume 55, Issues 10-12, 2007, Pages 469-484

Nigro M, Falleni A, Barga ID, Scarcelli V, Lucchesi P, Regoli F, Frenzilli G: Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquat Toxicol* 2006, 77:339-47

Oliver, B.G., Niimi, A.J., 1988. Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in the Lake Ontario ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 22, 388-397.

Orbea Amaia, Maren Ortiz-Zarragoitia, Miren P. Cajaraville; Interactive effects of benzo(a)pyrene and cadmium and effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on antioxidant and peroxisomal enzymes and peroxisomal volume density in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk.; *Biomarkers*. 2002 Jan-Feb; 7(1): 33–48.

Orio AA, Donazzolo R (1987): Specie tossiche ed eutrofizzanti nella Laguna e nel Golfo di Venezia. *Istituto Veneto Sci Lett Arti, Rapporti e Studi* vol. XI, 149–215

Pampanin DM, Camus L, Gomiero A, Marangon I, Volpato E, Nasci C., Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy), *Mar Pollut Bull.* 2005 Dec;50(12):1548-57. Epub 2005 Jul 22.

Pan Ke, Wen-Xiong Wang, Trace metal contamination in estuarine and coastal environments in China, *Science of the Total Environment* (2011) 1-14

Pan Luqing, Jiayun Ren, Jing Liu, Effects of benzo(k)fluoranthene exposure on the biomarkers of scallop *Chlamys farreri*, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 141 (2005) 248 – 256

Park H, Ahn IY, Kim H, Lee J, Shin SC: Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2009, 150:528-36

Pascoli F, Negrato E, Di Giancamillo A, Bertotto D, Domeneghini C, Simontacchi C, Mutinelli F, Radaelli G., Evaluation of oxidative stress biomarkers in *Zosterisessor ophiocephalus* from the Venice Lagoon, Italy, *Aquat Toxicol.* 2011 Feb;101(3-4):512-20. Epub 2010 Dec 13

Payne J.F., 1977. Mixed function oxidases in marine organisms in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection. *Mar Pollut Bull* 8, 112-116

Peakall D., 1992. *Animal Biomarkers as pollution indicators*. Chapman and Hall, New York, USA.291

Pennec, G.L., Pennec, M.L., 2003. Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusc bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquat. Toxicol.* 64, 131–142.

Perin G., *Ambiente e salute: Ergocinetiche e chemio-bio cinetiche*, 2004

Pezzementi L, Nachon F, Chatonnet A, 2011 Evolution of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Vertebrates: An Atypical Butyrylcholinesterase from the Medaka *Oryzias latipes*. *PLoS ONE* 6(2): e17396

Porte et al., 2002 C. Porte, E. Escartín, L.M. Garcia, X. Biosca and J. Albaigés, Assessment of coastal pollution by combined determination of chemical and biochemical markers in *Mullus barbatus*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 235 (2002), pp. 205–216.

Porte, C., Sole', M., Albaige's, J., Livingstone, D.R., 1991. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidase enzyme system of *Mytilus*; sp. to organic pollution. *Comp. Biochem. Phys. C* 100, 183–186.

Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C., Costello, M., Wilson, J., Mothersill, C., 2006. Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 142, 118–127

Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., Mothersill, C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat. Toxicol.* 66, 279–292.

Ramos-Gómez J, Coz A, Viguri JR, Luque A, Martín-Díaz ML, Delvalls TÁ. Biomarker responsiveness in different tissues of caged *Ruditapes philippinarum* and its use within an integrated sediment quality assessment. *Environ Pollut.* 2011 Jul;159(7):1914-22

Ramos-Gómez Julia, Alberto Coz, Javier R. Viguri, Ángel Luque, M. Laura Martín-Díaz, T. Ángel DelValls; Biomarker responsiveness in different tissues of caged *Ruditapes philippinarum* and its use within an integrated sediment quality assessment, *Environmental Pollution* 159 (2011) 1914-1922

Ricciardi F, Matozzo V, Binelli A, Marin MG., Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments, *Water Res.* 2010 Mar;44(6):1725-36. Epub 2009 Nov 26.

Rodríguez-Ortega, M., Alhama, J., Funes, V., Romero-Ruiz, A., Rodríguez-Ariza, A., López-Barea, J., 2002. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from South-Spanish littoral., *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 542–549.

Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.* 2003 Feb;34(2):374-8.

Schlenk D., Role of biomarkers in ecological risk assessment. *Human and ecological Risk Assessment* 2:251-256, 1996

Sheppard K, Yuan J, Hohn MJ, Jester B, Devine KM, Soll D., From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis, *Nucleic Acids Res.* 2008, Apr;36(6):1813-25. Epub 2008 Feb 5

Shier Rosie, *Statistics: 2.3 The Mann-Whitney U Test*, Mathematics Learning Support Center, 2004; pag.1-3

Shugart L. R., 1995. Biomarkers of DNA damage. In: de Serres F.D. & Bloom A.D, *Ecotoxicity and Human Health: a biological approach to environmental remediation.* pp. 123-141

Somnuek C, Boonphakdee C, Cheevaporn V, Tanaka K: Gene expression of acetylcholinesterase in hybrid catfish (*Clarias gariepinus* X *Clarias macrocephalus*) exposed to chlorpyrifos and carbaryl. *J Environ Biol* 2009, 30:83-8.

SPSS Base User's Guide 12.0

Tibshirani Robert, Hastie Trevor, Narasimhan Balasubramanian, and Chu Gilbert, Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 May 14;99(10):6567-72

Truhaut, R. 1977, "Eco-Toxicology - Objectives, Principles and Perspectives", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 1, no. 2, pp. 151–173

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:5116-5121

Venier P, De Pittà C, Pallavicini A, Marsano F, Varotto L, Romualdi C, Dondero F, Viarengo A, Lanfranchi G.; Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution?; *Mutat Res.* 2006 Dec 1;602(1-2):121-34. Epub 2006 Sep 28

Vieira L.R., Gravato C., Soares A.M.V.M., Morgado F.,Guilhermino L., Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behavior, *Chemosphere* 76 (2009) 1416–1427

Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008, Acute effects of benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Sci. Total Environ.* 395 (2–3), 87–100

Viganò L, Arillo A, Falugi C, Melodia F, Polesello S. Biomarkers of exposure and effect in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to sediments of the Adriatic Sea. *Mar Pollut Bull* 2001; 42 (10): 887-94.

Vighi M., Bacci E., *Ecotossicologia*. UTET, Torino, Italia, pp. 237

Vighi M., Bacci E.. *Ecotossicologia*. Utet, Torino, 1998

Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak, A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 71–133

Willmer P., Stone G., Johnston J., *Fisiologia Ambientale degli animali*. Zanichelli, Bologna, 2003

Wong Marisa L., Medrano Juan F., Real-time PCR for mRNA quantitation, *BioTechniques* 39, July, 2005

Zhou Q., Zhang J., Fu J., Shi J. e Jiang G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta* 606:135–150

Risorse informatiche

Comités Régionaux de la Conchyliculture (CRC) (<http://www.huitres-de-bretagne.com/venericulture>)

Consiglio Nazionale delle Ricerche (<http://www.cnr.it>)

Entrez gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

FAO Fisheries and Aquaculture Department FAO (<http://www.fao.org/fishery/species/>)

http://microcribi.cribi.unipd.it/site/index.php/Analisi_qualitativa_con_Agilent_BioAnalyzer

<http://www.arpa.vda.it/>

<http://www.biomart.org/>

<http://www.ebi.ac.uk/chebi/>

<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>

<http://www.ensembl.org/biomart/martview/>

<http://www.eol.org/pages/2869873>

<http://www.fishbase.org/>

<http://www.geneontology.org>

<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=sourcedetails&id=9271>

<http://www.marinespecies.org/asteroidea/aphia.php?p=sourcedetails&id=149081>

Istituto superiore per la ricerca e la protezione ambientale (http://www.apat.gov.it/site/it-IT/Temi/Acqua/Fonti_di_inquinamento/Biomonitoraggio.html)

Microgen (<http://microgen.ouhsc.edu/bioanalyzer.htm>)

Museo di storia naturale di Venezia (<http://www.msn.ve.it>)

Pan-european Species Directories Infrastructure (<http://www.eunomen.eu/portal/>)

Serving History (<http://www.servinghistory.com/topics/clams::sub::Anatomy>)

UniProtKB/Swiss-Prot: <http://www.uniprot.org/uniprot/>