



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**  
**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**  
**Corso di Laurea in Biologia**

ELABORATO DI LAUREA

**FORMAZIONE DI TRAPPOLE EXTRACELLULARI**  
**NELL'EMOLINFA DI *RUDITAPES PHILLIPINARUM***

**TUTOR: Prof. Francesca Cima**  
Dipartimento di Biologia

**LAUREANDA: Sofia Comis**

**ANNO ACCADEMICO 2017-2018**



# Indice

	pag.
<b>1. Introduzione</b> .....	1
1.1 Immunità nei molluschi bivalvi.....	1
1.2 Differenziamento e proliferazione degli emociti nei molluschi.....	3
<b>2. Scopo della tesi</b> .....	5
<b>3. Materiali e Metodi</b> .....	6
3.1 Animali utilizzati.....	6
3.2 Prelievo dell'emolinfa.....	6
3.3 Stimolazione immunitaria <i>in vitro</i> .....	6
3.4 Conteggio degli aggregati di emociti.....	6
3.5 Colorazione panottica di Pappenheim modificata.....	7
3.6. Saggio con la lectina di <i>Limax flavus</i> per l'acido sialico.....	7
3.7 Saggio per l'amiloide con Rosso Congo.....	7
3.8 Saggio istochimico per l'eparina.....	8
3.9 Saggio immunoistochimico per l'istamina.....	8
3.10 Saggi istoenzimatici per le serin proteasi.....	8
3.11 Saggio di mortalità batterica.....	9
3.12 Saggi per la cromatina.....	9
3.13 Analisi statistica.....	9
<b>4. Risultati</b> .....	10
4.1 Risposta immunitaria cellulare all'esposizione batterica.....	10
4.2 Caratterizzazione degli emociti responsabili dell'ETosi.....	11
4.3 Struttura e composizione chimica delle reti extracellulari.....	12
<b>5. Discussione</b> .....	15
<b>6. Bibliografia</b> .....	18



# 1. Introduzione

## 1.1 Immunità nei molluschi bivalvi

Il sistema immunitario dei molluschi bivalvi, così come quello di tutti gli invertebrati, comprende solo la componente di tipo innato. A differenza dei vertebrati, che possiedono in aggiunta l'immunità di tipo adattativo, ha scarsa specificità e manca di memoria cellulare a lungo termine; si basa su risposte determinate a livello genetico che attivano meccanismi rapidi preesistenti all'esposizione alle molecole 'non-self'. Infatti il problema della specificità viene risolto tramite l'evoluzione di meccanismi genetici in grado di produrre centinaia di proteine diverse a partire da pochi geni, che permettono il riconoscimento e l'eliminazione di molti patogeni diversi (Canesi e Pruzzo, 2016). Tra queste proteine, un ruolo molto importante è svolto dalle lectine, che legano specificamente carboidrati o componenti carboidrati di glicoproteine e lipidi, provocando agglutinazione od opsonizzazione; sono presenti diversi tipi di lectine in circolo, ognuno con legami specifici a determinati carboidrati e sottoposti ad un livello di regolazione maggiore di quello normalmente osservato per queste proteine, suggerendo quindi un ruolo simile a quello degli anticorpi (Renwranz, 1983; Monroy *et al.*, 1992; Olafsen, 1995).

I molluschi bivalvi sono animali tipici dell'ambiente intertidale, di conseguenza sono soggetti a variazioni rapide e imprevedibili di parametri ambientali che comportano stress di vario tipo: contaminanti, tossine algali, esposizione all'aria, stress meccanico provocato dalle onde, alta temperatura, variazione di salinità. Pertanto l'immunità innata promuove una difesa anche nei confronti di questi tipi di minaccia, grazie ad una grande varietà di recettori sensoriali, effettori selettivi e vie sinergiche di regolazione genica. La concentrazione di patogeni all'interno dell'ospite dipende anche dalla modalità di alimentazione dei bivalvi: essendo filtratori accumulano un gran numero di microorganismi dall'ambiente acquatico, che possono comportarsi da simbionti oppure diventare una minaccia per l'ospite (Canesi e Pruzzo, 2016). I sensori che discriminano 'self' da 'non-self' sono rappresentati da 'pattern' di recettori di riconoscimento (PRR) che si trovano sulla membrana degli emociti e nel siero dell'emolinfa, i quali si legano ai 'pattern' molecolari associati ai patogeni (PAMP) riconoscendoli. I PRR riconoscono anche i 'pattern' di molecole associate ai danni endogeni della cellula (DAMP), che costituiscono un segnale di allarme per il sistema immunitario (de Eguileor *et al.*, 2016).

L'immunità innata si divide in tre principali componenti: barriere esterne di tipo fisico, risposte umorali, risposte cellulari.

Le barriere esterne di tipo fisico caratteristiche dei bivalvi sono le conchiglie, usate come primo ostacolo per l'avanzata dei patogeni verso le cavità interne, in aggiunta a fattori presenti nei fluidi palleali ed extrapalleali (Fisher, 1992; Allame Paillard, 1998). Inoltre l'organo palleale, insieme alle branchie e al mantello, produce un muco che agglutina e lisa i batteri (McDade e Tripp, 1967; Fisher,

1992) e aiuta l'eliminazione dei microorganismi tramite processi meccanici quali il moto delle ciglia (Simkiss, 1983). Di conseguenza l'ingresso dei patogeni nei tessuti interni avviene principalmente attraverso ferite o lesioni dell'epitelio, e a quel punto la loro eliminazione è a carico del sistema di difesa interno.

La risposta umorale prevede sintesi e secrezione di varie sostanze: peptidi antimicrobici, lisozima, sostanze citotossiche, specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte dal 'burst' respiratorio che avviene durante la fagocitosi, molecole citochino-simili in grado di attivare gli emociti e lectine coinvolte nel riconoscimento del non-self, nell'agglutinazione dei patogeni e nell'opsonizzazione della fagocitosi (Prieur *et al.*, 1990; Leclercq, 1996; Song *et al.*, 2010). In particolare i ROS sono prodotti da tutti i metazoi, servono come secondi messaggeri in molti processi. Gli emociti di molluschi e artropodi producono ione superossido in risposta a specifici stimoli di allarme e durante la risposta immunitaria (Peskin *et al.*, 1998; Nappi *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2001). È stato visto un effetto dell'infezione sulla vongola filippina *Ruditapes philippinarum* ad opera di *Vibrio tapetis* nelle attività degli enzimi fenolossidasi e superossidodismutasi (Le Bris *et al.*, 2015). La fenolossidasi (PO) è un enzima endogeno che collabora all'immunità umorale attivando la cascata di melanizzazione (Söderhäll e Cerenius, 1998), che porta alla formazione di prodotti citotossici fungistatici, batteriostatici ed antivirali (Cerenius *et al.*, 2008). La superossidodismutasi (SOD) previene invece l'accumulo di ROS nell'organismo, limitando danni cellulari. I cambiamenti si sono osservati in due tessuti: nel mantello, responsabile della risposta precoce a causa della prossimità della regione di infezione, aumenta l'attività di entrambi gli enzimi; nell'emolinfa, invece, la risposta è tardiva e indotta, e comporta un aumento nell'attività della PO e una diminuzione dell'attività della SOD, (Le Bris *et al.*, 2015) suggerendo l'importanza del mantenimento di un'alta concentrazione di ROS nell'emolinfa come ausilio per l'eliminazione del patogeno.

La risposta cellulare operata dagli emociti, che circolano nel sistema circolatorio aperto, è di primaria importanza nella difesa dai patogeni. Gli immunociti sono coinvolti nella fagocitosi e nell'incapsulamento di materiale estraneo, nonché nei meccanismi di riparazione della conchiglia, di digestione, di trasporto e di escrezione dei nutrienti (Cheng, 1981). Non esistono database molecolari a riguardo degli emociti dei bivalvi, quindi la loro classificazione si basa su caratteristiche morfologiche, citochimiche e funzionali (Smith *et al.*, 2016). Per quanto riguarda *R. philippinarum*, la classificazione degli emociti comprende quattro categorie identificate dal punto di vista morfo-funzionale al microscopio ottico: emoblasti, granulociti, ialinociti e cellule sierose (Cima *et al.*, 2000). Gli emoblasti (19-20% del totale), con diametro di 3-5  $\mu\text{m}$ , si presentano come cellule sferiche od ovoidali e hanno caratteristiche di cellule indifferenziate. Il citoplasma forma uno strato sottile attorno al nucleo. Queste caratteristiche morfologiche, insieme alla positività all'anticorpo anti-CD34, suggeriscono un

comportamento da cellule staminali sostenuta in seguito da osservazioni di mitosi in circolo (Matozzo *et al.*, 2008).

I granulociti sono molto abbondanti, in quanto rappresentano circa la metà degli emociti circolanti; hanno un diametro di 3-16  $\mu\text{m}$  e possono presentarsi sia in forma sferica che ameboide. Hanno un nucleo ovale eccentrico e numerosi granuli citoplasmatici; a questo riguardo, usando diversi metodi istochimici si sono potuti suddividere i granulociti in tre sottopopolazioni sulla base delle caratteristiche tintoriali dei granuli: basofili (50%), neutrofili (46-48%) e acidofili (2-4%). Queste cellule sono fagociti particolarmente attivi sia verso batteri Gram-positivi che Gram-negativi come è stato messo in evidenza recentemente a livello ultrastrutturale mediante l'osservazione di numerosi fagosomi dopo 15 min di esposizione (Monteforte, 2015-16).

Gli ialinociti, rappresentati dal 32-33% delle cellule, hanno un diametro di 4-12  $\mu\text{m}$ , presentano un nucleo tondeggiant e anch'essi si possono trovare con aspetto sia sferico che ameboide. Si distinguono chiaramente dai granulociti per l'assenza di granuli citoplasmatici, ma entrambi possono aggregare e fagocitare attivamente le cellule estranee. Durante la fagocitosi viene prodotto anione superossido, rilevato in entrambi i tipi cellulari, mentre enzimi idrolitici e ossidativi sono variamente distribuiti.

Le cellule sierose sono molto rare (1%), sono emociti sferici non mobili di 7-15  $\mu\text{m}$  di diametro. Il citoplasma ha grandi vacuoli di circa 2  $\mu\text{m}$  di diametro a contenuto basofilo. Il nucleo è periferico e generalmente nascosto. Sono marcate dalle seguenti lectine: *Narcissus pseudonarcissus* Agglutinin (NPA), specifica per D-mannosio; *Canavalia ensiformis* Agglutinin (ConA), specifica per  $\alpha$ -D-mannosio e  $\alpha$ -D-glucosio; *Datura stramonium* Agglutinin (DSL), specifica per  $\beta$ -1,4-N-acetil-D-glucosamina; *Limax flavus* Agglutinin (LFA), specifica per acido sialico; *Arachis hypogaea* Agglutinin, specifica per  $\beta$ -D-galattosio e lattosio; *Ricinus communis* Agglutinin (RCA<sub>120</sub>), specifica per  $\beta$ -D-galattosio (Monteforte, 2015-16).

## 1.2 Differenziamento e proliferazione degli emociti nei molluschi

Relativamente al differenziamento degli emociti sono state formulate diverse ipotesi: secondo Cheng (1981) i tre tipi di emociti differenziati (granulociti, ialinociti e cellule sierose) deriverebbero da tre linee cellulari diverse rappresentate rispettivamente dai granuloblasti, dagli ialinoblasti e da piccole cellule sierose. Successivamente Ottaviani e collaboratori (1998) proposero la presenza di una singola linea di emoblasti che prima maturerebbe in ialinociti, e in seguito in granulociti.

I tessuti ematopoietici dei molluschi sono di vario tipo: nei gasteropodi sono rappresentati da un organo, chiamato 'amoebocyte-producing organ', che si trova tra il pericardio e l'epitelio posteriore del mantello; nei cefalopodi è presente il corpo bianco, un organo multilobato in prossimità dei gangli ottici (Pila *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2016). Per quanto riguarda i bivalvi, inizialmente si riteneva

che l'origine degli emociti andasse ricercata nei tessuti connettivi e/o nel mantello (Donaghy *et al.*, 2009; Rebelo *et al.*, 2013); Jemaà e collaboratori (2014) dimostrarono nelle ostriche che diversi pro-emociti si sviluppano a partire dal tessuto basale delle branchie. Analisi molecolari svolte sullo sviluppo dei giovanili di *Crassostrea gigas* hanno individuato l'espressione dei fattori relativi all'ematopoiesi negli emociti, e non nei tessuti connettivi (Tirapé *et al.*, 2007).

In *R. philippinarum* sono stati condotti studi mirati alla capacità di proliferazione in circolo (Berton 2016-17), i quali, con il metodo colorimetrico con il sale di tetrazolio XTT, hanno confermato che gli emoblasti vanno incontro a mitosi anche in assenza di stimolazioni; questo dimostra quindi che l'ematopoiesi può almeno in parte avvenire nel circolo sanguigno. Questa capacità aumenta significativamente dopo 15 ore di esposizione batterica *in vitro*. Nei bivalvi gli emociti migrano nei focolai di infiammazione (Smolowitz *et al.*, 1998), ma a differenza dei vertebrati in cui gli emociti migrano già completamente differenziati nei siti infiammatori dopo aver proliferato nei tessuti ematopoietici, nei bivalvi è stato osservato che gli emociti proliferano direttamente nel focolaio di infiammazione (granuloma) (Hanselmann *et al.*, 2000). Yue e collaboratori (2014) hanno identificato negli emociti circolanti del bivalve venerinide *Chlamys farreri* numerose molecole della famiglia del gene *runt*, noto nei mammiferi per la codificazione di proteine necessarie all'ematopoiesi e alla migrazione dei nuovi emociti verso i siti di infiammazione tramite il circolo sanguigno; si tratta di una famiglia di fattori di trascrizione identificata anche nei gamberi (Söderhall *et al.*, 2003).

Inoltre, partendo dall'ipotesi degli emoblasti come cellule staminali pluripotenti, capaci di differenziarsi nelle varie linee di immunociti, sono stati eseguiti in *R. philippinarum* esperimenti di stimolazione batterica *in vivo* e *in vitro* (Berton, 2016-17): nel primo caso è stata estratta l'emolinfa di alcuni individui dopo 24 ore di esposizione a batteri in una vasca, nel secondo caso la sospensione emocitaria ottenuta da prelievo dell'emolinfa di vari individui è stata mantenuta in provetta in presenza di batteri su agitatore rotante per 15 e 24 ore. In entrambi i casi è stata valutata la composizione percentuale dei diversi tipi di emociti dopo vari tempi di esposizione rilevando una differenza significativa nel numero delle cellule sierose tra gli individui incubati con batteri e i controlli non esposti. In particolare nei trattati questo tipo cellulare aumentava di numero seppur dimostrandosi di piccole dimensioni, ovvero rappresentando probabilmente fasi giovanili di questo tipo cellulare: ciò suggerisce eventi di proliferazione e differenziamento indotti dalla stimolazione sperimentale escludendo l'ipotesi precedente sull'origine delle cellule sierose dall'organo di Keber o ghiandola pericardica (Fernau, 1914), la cui funzione rimarrebbe esclusivamente escretoria (Monteforte, 2015-16). D'altra parte, emoblasti e granulociti diminuivano significativamente: i primi in correlazione all'attività di differenziamento, i secondi in seguito a lisi dopo aver completato l'intensa attività fagocitica. Negli esperimenti *in vitro* le differenze tra le percentuali sono apparse più marcate,

probabilmente a causa di una perdita correlata di emoblasti, che si differenziano, non compensata da processi che, *in vivo*, possono ripristinare le popolazioni cellulari circolanti mediante mobilitazione e migrazione da vari distretti corporei come osservato precedentemente proprio in questa specie (Oubella *et al.*, 1994).

## 2. Scopo della tesi

La vongola filippina *R. philippinarum* ('Manila clam') è di grande interesse sia dal punto di vista commerciale che ecologico, in quanto rappresenta un buon indicatore ambientale ed è dotata di grandi capacità di adattamento. La comprensione dei meccanismi che sottendono al suo sistema immunitario è di fondamentale importanza per una corretta gestione della venericoltura e per l'interpretazione delle conseguenze all'esposizione a tossine e patogeni nell'ambito dell'ecotossicologia.

In questo lavoro sono proseguiti gli studi riguardo alla caratterizzazione degli emociti, all'ematopoiesi e al differenziamento, condotti precedentemente nel laboratorio di Immunologia degli Invertebrati del Dipartimento di Biologia (Cima *et al.*, 2000; Monteforte, 2015-16; Berton, 2016-17), durante i quali venne osservato per la prima volta un probabile fenomeno di ETosi, cioè la formazione di 'extracellular trap' in seguito a esposizione batterica prolungata degli emociti. Si tratta di un meccanismo di morte cellulare programmata differente da apoptosi e necrosi, caratterizzato inizialmente nei neutrofili dei vertebrati, in grado di rilasciare cromatina e proteine citoplasmatiche nello spazio extracellulare. Queste formazioni, chiamate 'net', sono abbondanti nei siti di infiammazione come si è visto nello studio di molte malattie umane: appendicite, shigellosi, preeclampsia, infezioni da streptococco, polmonite da pneumococco, malattia granulomatosa cronica (Heyworth *et al.*, 2003; Brinkmann *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2005; Beiter *et al.*, 2006; Molloy, 2006; Fuchs *et al.*, 2007). L'ETosi è un fenomeno primordiale, comparso prima dell'evoluzione del celoma: è presente anche negli Cnidari, che non hanno un celoma o un vero e proprio sistema circolatorio, quindi il rilascio di cromatina nell'ambiente extracellulare deve essere un processo di difesa che anticipa lo sviluppo del sistema immunitario organizzato nel mesoderma. Negli invertebrati l'ETosi partecipa alla difesa intrappolando i microorganismi, esternalizzando gli istoni con proprietà antibatteriche e costituendo l'impalcatura sulla quale gli emociti intatti si radunano durante l'incapsulazione scaricandovi il contenuto dei loro granuli (Robb *et al.*, 2014).

Date queste premesse è stato svolto uno studio mirato sugli emociti di *R. philippinarum* per caratterizzare le reti tramite varie tecniche istochimiche e immunoistochimiche volte a ricercarne la composizione. Si è ricercato il loro ruolo e, soprattutto, la determinazione della tipologia cellulare responsabile del fenomeno.

### **3. Materiali e Metodi**

#### **3.1 Animali utilizzati**

Gli esemplari di *R. philippinarum* sono stati acquistati al Conservificio Allevatori Molluschi di Chioggia. Sono stati stabulati in una vasca all'interno di una camera termostatica a 17° C, con un substrato di sabbia calcarea per consentire l'infossamento degli animali e 30 litri di acqua marina (salinità compresa tra 33 e 35 psu) areata con ossigenatori. L'acqua veniva sostituita a giorni alterni tre volte la settimana per simulare il naturale ricambio. Gli animali sono stati nutriti ogni giorno con Liquifry Marine (Interpet, Dorking, England) e una sospensione di alghe unicellulari (*Isochrysis* sp.). Prima di effettuare gli esperimenti gli individui sono stati lasciati acclimatare per almeno una settimana.

#### **3.2 Prelievo dell'emolinfa**

Per ogni esperimento l'emolinfa è stata prelevata dal muscolo adduttore anteriore di una ventina di individui tramite siringhe da 1 ml per insulina, in seguito all'apertura parziale delle valve tramite coltello a lama piatta a sfaccettatura liscia. L'emolinfa è stata poi mantenuta in provette Eppendorf da 1,5 ml a 4° C con una soluzione di citrato di sodio allo 0,38% in acqua di mare filtrata (FSW) a pH 7,5 per prevenire la formazione di coaguli. A prelievo terminato, le provette sono state messe a centrifugare per 15 minuti a 800 g. Dopodiché il surnatante è stato eliminato.

#### **3.3 Stimolazione immunitaria *in vitro***

Il pellet di emociti è stato risospeso in 400 µl di FSW (controllo) oppure in 400 µl di una sospensione di spore di *Bacillus clausii* (Enterogermina®, Sanofi) precedentemente centrifugate a 12000 g per 10 minuti e risospese in pari volume di FSW (campioni trattati). L'incubazione è stata mantenuta overnight a 25° C su un agitatore rotante per simulare il circolo sanguigno e permettere la formazione di 'net'.

#### **3.4 Conteggio degli aggregati di emociti**

A partire dal momento dell'incubazione con i batteri e in seguito una volta ogni ora per complessive quattro ore, sono stati preparati tre vetrini portaoggetto a superficie adesiva elettrostatica (Superfrost™ Plus, Thermo Scientific) posando su ciascuno 30 µl di campione e quindi un vetrino coprioggetto 24 x 24 mm sostenuto ai vertici da plastilina. Per ognuno è stato eseguito il conteggio degli aggregati cellulari per 10 campi ottici ad ingrandimento 10x con un microscopio ottico Olympus CX31 dotato di videocamera digitale Lumenera Infinity 2 e il software Infinity Capture Application versione 5.0.0 (Lumenera Co. 2002-2009).

### 3.5 Colorazione panottica di Pappenheim modificata

Dopo stimolazione con batteri i campioni sono stati fissati come sopra e colorati per 10 s in una soluzione acquosa filtrata di blu di toluidina (Fluka) 0,5% e tetraborato di sodio 0,5%. Dopo lavaggio in acqua di fonte i campioni sono stati colorati con il liquido di May-Grümvald per 3 min, lavati rapidamente con acqua di fonte e colorati con Giemsa (Fluka) al 5% per 10 min. Dopo un lavaggio rapido in acqua distillata, i vetrini sono stati montati con Acquovitrex e osservati al microscopio ottico. Questo metodo mette in evidenza al microscopio i granuli dei granulociti e il contenuto delle cellule sierose; quest'ultimo rivela una tipica metacromasia rosa-violetto, mentre il nucleo si colora di blu.

### 3.6 Saggio con la lectina di *Limax flavus* per l'acido sialico

Dopo stimolazione con i batteri, con una micropipetta è stata depositata una quantità di campione, pari a 60 µl su vetrini portaoggetto a superficie adesiva elettrostatica lasciandovi aderire le cellule per 30 min. Dopo adesione i campioni sono stati fissati in una miscela fissativa per invertebrati marini costituita da paraformaldeide 4% più glutaraldeide 0,2% in tampone cacodilato di sodio 0,2 M a pH 7.4 e con aggiunta di NaCl 1% e saccarosio 1% (Cima, 2010). Alla fissazione sono seguiti 2-3 lavaggi di 10 min ciascuno in tampone fosfato salino 0,1 M (PBS: NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g/l, pH 7.2) a 25 °C. I campioni sono stati incubati per 30 min con una miscela di metanolo assoluto cui è stata aggiunta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µl ml<sup>-1</sup>, per disattivare la perossidasi endogena. Sono stati poi incubati per 60 min nella lectina biotinilata *Limax flavus* Agglutinin (EY Laboratories, Inc.), diluizione 1:100 in PBS, con aggiunta di CaCl<sub>2</sub> 0,0014%. Questa lectina marca selettivamente le cellule sierose (Monteforte, 2015-16). Al termine i campioni sono stati lavati con PBS per 5 min, per poi essere ulteriormente incubati per 30 min con il metodo ABC Vectastain® (Vector Laboratories, Inc.), un complesso avidina-perossidasi biotinilata, che si lega alla biotina coniugata con la lectina, per permetterne il successivo rilevamento con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) come cromogeno; quest'ultima, dopo lavaggio in PBS per 5 min, è stata utilizzata per incubare i campioni per 15 min come soluzione 0,05% con aggiunta di 5 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% al momento dell'uso come attivante della reazione. Al termine dell'incubazione, i vetrini sono stati lavati con acqua deionizzata e montati con un vetrino coprioggetto grazie a un mezzo montante acquoso, Acquovitrex (Carlo Erba), e infine osservati al microscopio ottico per procedere con il conteggio a 1000 x per 10 campi ottici. I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule sierose, marcate di colore bruno, rispetto al totale degli emociti.

### 3.7 Saggio per l'amiloide con Rosso Congo

Una soluzione madre di Rosso Congo è stata preparata sciogliendo 0,3 g di colorante più 0,3 g di NaCl in 100 ml di etanolo 80%. Dopo stimolazione con batteri, adesione su vetrino e fissazione, i campioni sono stati colorati per 10 min

in una soluzione di lavoro di Rosso Congo ottenuta aggiungendo a 50 ml di soluzione madre 0,5 ml di NaOH 1%. Dopo un lavaggio con acqua distillata i vetrini sono stati immersi velocemente per 10 volte in una soluzione alcalina di alcol (1 ml di NaOH 1% in 100 ml di etanolo 50%), quindi lavati in acqua distillata per 10 min. Alla colorazione è seguita la disidratazione nella scala ascendente degli alcoli, la chiarificazione in xilolo e il montaggio con resina sintetica Eukitt (O. Kindler GmbH & Co) .

### **3.8 Saggio istochimico per l'eparina**

I campioni fissati come sopra sono stati incubati per 20 min in una soluzione contenente solfato di berberina (Sigma-Aldrich) 0,02% in acqua distillata portata a pH 4.0 con l'aggiunta di piccole quantità di acido citrico 1%. Dopo rapido lavaggio in acqua distillata e montaggio con FluorSave Reagent (Calbiochem) sono stati osservati al microscopio ottico con modulo a fluorescenza a LED A.F.T.E.R. (Amplified Fluorescence by Transmitted Excitation of Radiation, Fraen Corp.), dotato di sorgente di eccitazione luce UV (365 nm). Polianioni contenenti solfato come le sostanze eparinoidi emettono un'intensa fluorescenza verde.

### **3.9 Saggio immunoistochimico per l'istamina**

I campioni fissati come sopra sono stati permeabilizzati per 5 min con Triton X-100 allo 0,1% in PBS e quindi immersi per 30 min in una soluzione al 10% di siero di capra (Vector) in PBS per bloccare possibili interazioni aspecifiche. I campioni sono stati incubati overnight a 4 °C con anticorpo policlonale di coniglio anti-istamina (Sigma, H7403) alla concentrazione di 10 µg ml<sup>-1</sup> in PBS. Nei controlli l'anticorpo primario è stato omesso. In seguito sono stati incubati per 30 min in anticorpo secondario di capra anti-Ig di coniglio coniugato con biotina (Calbiochem), alla concentrazione di 10 µg ml<sup>-1</sup> in PBS. Dopo lavaggio in PBS sono stati ulteriormente incubati al buio per 30 min in streptavidina-Cy3<sup>TM</sup> (Sigma; il fluorocromo Cy3<sup>TM</sup> ha emissione nel rosso a 565 nm) alla concentrazione di 20 µg ml<sup>-1</sup> in PBS. Infine sono stati lavati in acqua distillata, montati con FluorSave Reagent e osservati con il microscopio ottico a fluorescenza a LED con sorgente di eccitazione luce verde (535 nm).

### **3.10 Saggi istoenzimatici per le serin proteasi**

I campioni fissati come sopra sono stati incubati per 60 min a 37° C usando 4 mg del substrato sintetico Z-Ala-Ala-Lys-4-metossi-2-naftilamide (Z-AAK-mna, MP Biomedicals) specifico per la triptasi, oppure Suc-Ala-Ala-Phe-4-metossi-2-naftilamide (S-AAF-mna, MP Biomedicals) specifico per la chimasi, entrambi precedentemente disciolti in 0,5 ml di dimetilformamide (DMF), e quindi aggiunti a una miscela di reazione contenente 10 ml di tampone Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0 per la triptasi e 7,8 per la chimasi) e 10 mg di Fast Blue BB (Fluka). Successivamente sono stati incubati 5 min in solfato di rame 1%. Dopo lavaggio

in acqua distillata i vetrini sono stati montati con Acquovitrex e osservati al microscopio ottico.

### **3.11 Saggio di mortalità batterica**

I campioni non fissati e lasciati aderire su vetrini portaoggetto elettrostatici per 30 min sono stati incubati per 15 min al buio in una soluzione di 3  $\mu\text{l/ml}$  dei componenti A e B del kit Dead & Live (LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit, for microscopy, L7007, Invitrogen) in uguali proporzioni. Dopo l'incubazione sono stati lavati in FSW, coperti con un vetrino coprioggetto e osservati al microscopio ottico a fluorescenza con sorgenti di eccitazione luce blu (450 nm) e verde (535 nm) che hanno permesso di distinguere rispettivamente i batteri vivi (fluorescenza verde) da quelli morti (fluorescenza rossa).

### **3.12 Saggi per la cromatina**

Il fluorocromo 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI) attraversa facilmente le membrane cellulari e lega fortemente regioni del DNA ricche in sequenze A-T. Ha assorbanza a 358 nm ed emissione a 461 nm mettendo in evidenza la cromatina con una fluorescenza azzurra. I campioni fissati come sopra sono stati incubati per 30 min al buio in una soluzione di DAPI (Sigma) 0,2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  in PBS, montati con FluorSave Reagent e osservati con il microscopio ottico a fluorescenza dotato di sorgente di eccitazione luce UV.

Per mettere in evidenza l'eventuale presenza di cromatina frammentata i campioni fissati sono stati incubati in una soluzione di permeabilizzazione (0,1% Triton X-100 in 0,1% di citrato di sodio) per 2 min a 4 °C. Dopo due lavaggi in PBS, i campioni sono stati incubati con la miscela di reazione TUNEL ('*In situ* cell detection kit-POD', Roche) per un'ora a 37 °C al buio in camera umida. I vetrini sono stati montati con FluorSave Reagent e analizzati al microscopio ottico a fluorescenza dotato di sorgente di eccitazione luce blu (450 nm). Con questa tecnica la cromatina frammentata emette fluorescenza verde.

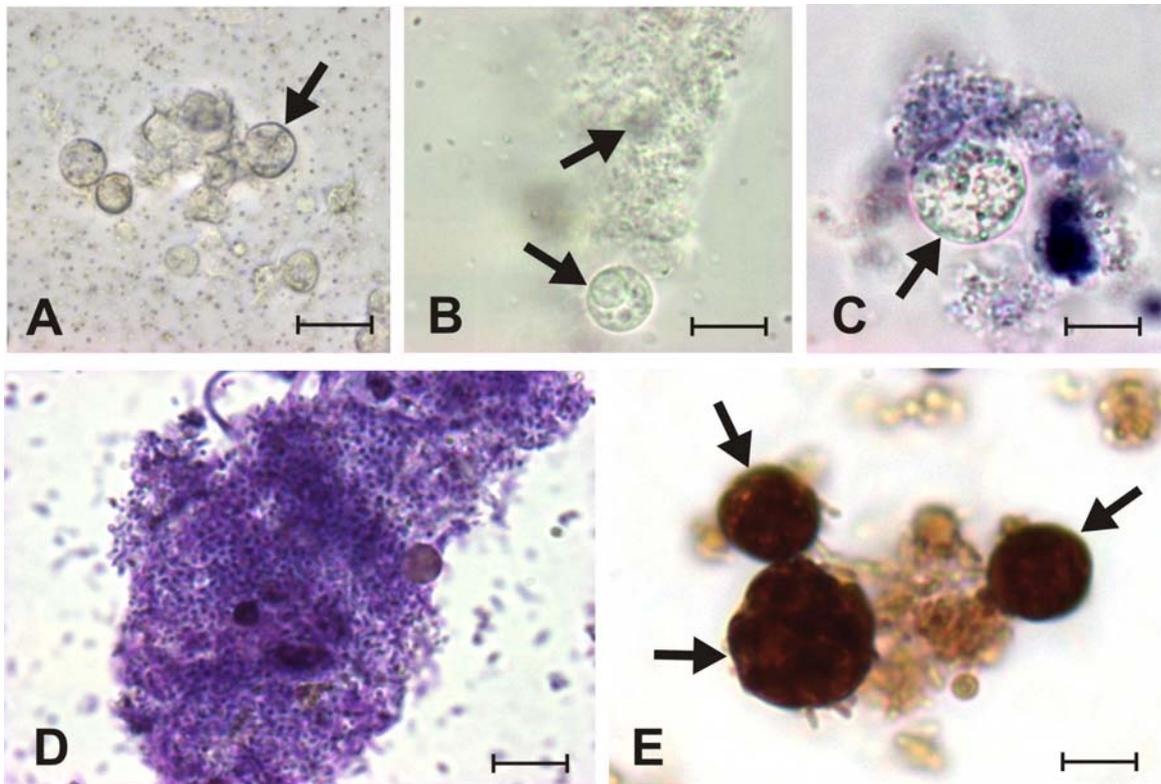
### **3.13 Analisi statistica**

I dati ottenuti dal conteggio degli aggregati cellulari in coltura formati dopo vari tempi di incubazione con batteri sono stati elaborati con il test *t* di Student e dall'ANOVA a una via seguita da test di Dunnett per confronti multipli. I dati relativi al conteggio di cellule sierose nel saggio con la lectina LFA dopo 15 ore di incubazione con i batteri, espressi in media percentuale  $\pm$  deviazione standard, sono stati elaborati statisticamente con il test  $\chi^2$ . Per entrambi i test sono state considerate come significative differenze per  $p < 0,05$ .

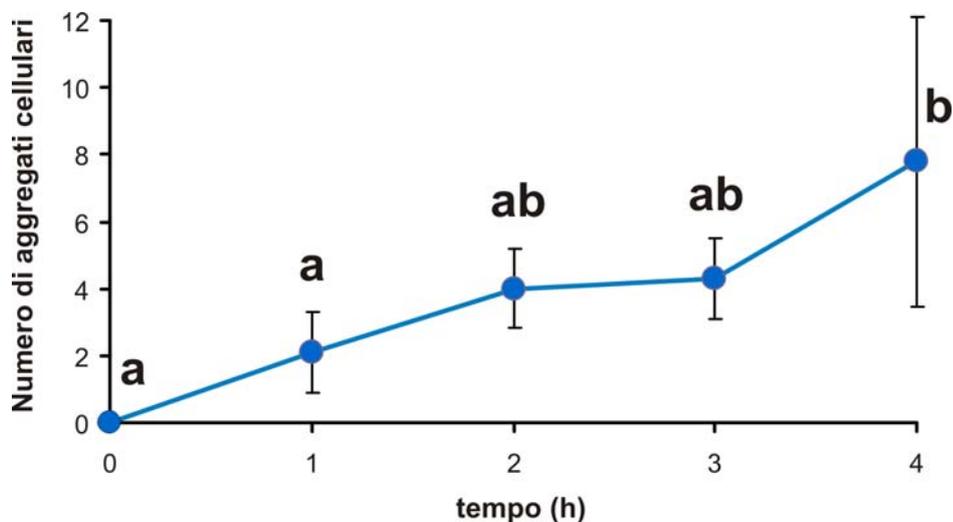
## 4. Risultati

### 4.1 Risposta immunitaria cellulare all'esposizione batterica

Gli emociti prelevati da *R. philippinarum* sono stati osservati al microscopio ottico senza l'uso di colorazioni o fissativi inizialmente per 4 ore a intervalli regolari di un'ora dal momento dell'incubazione con le cellule batteriche ( $t_0$ ). La prima reazione individuabile è la formazione *in vitro* di aggregati di emociti (Fig. 1A), il cui numero aumenta significativamente a partire da 2 ore di esposizione raggiungendo quasi una quantità doppia (Fig. 2). Tra  $t_2$  e  $t_3$  il numero rimane pressoché stabile, mentre si è rilevato un ulteriore incremento significativo a 4 ore.



**Fig. 1** – Emociti di *Ruditapes philippinarum* al M.O. **A.** Emociti e batteri *in vitro* dopo 1 ora di incubazione. La freccia indica una cellula sierosa. **B.** Cellule sierose (freccie) e reti dopo 15 ore di incubazione *in vitro*. **C, D.** Cellula sierosa (freccia) e reti con colorazione di Papanheim. **E.** Cellule sierose (freccie) marcate di colore bruno con il saggio per la lectina LFA per l'acido sialico. Barra: **A:** 19,5  $\mu\text{m}$ . **B:** 10  $\mu\text{m}$ . **C, E:** 6  $\mu\text{m}$ . **D:** 9  $\mu\text{m}$ .



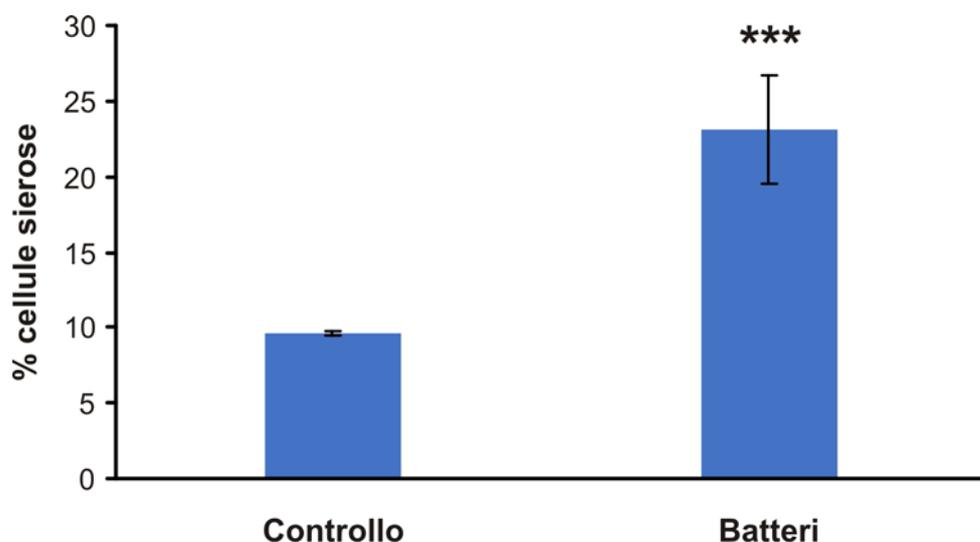
**Fig. 2** – Numero di aggregati cellulari contati al M.O. dopo 1 ( $t_1$ ), 2 ( $t_2$ ), 3 ( $t_3$ ) e 4 ( $t_4$ ) ore dall'incubazione con i batteri. Differenze significative ( $p < 0,05$ ) sono espresse da lettere differenti.

Dopo 15 ore di esposizione sono state osservate reti e ammassi di materiale extracellulare con batteri intrappolati (Fig. 1B). Per questo motivo questo intervallo di esposizione è stato scelto per ulteriori studi di caratterizzazione del fenomeno.

#### 4.2 Caratterizzazione degli emociti responsabili dell'ETosi

L'osservazione degli emociti colorati con la metodica di Pappenheim (Fig. 1C) ha permesso di individuare il tipo cellulare coinvolto nel processo di formazione delle reti extracellulari (ETosi): si tratta di cellule sierose che, al contrario di quelle non incubate con batteri i cui vacuoli rivelano metacromasia rosa-violetto, appaiono con aspetti di degranolazione (Fig. 1C), mentre le reti si colorano in maniera metacromatica a differenza del DNA batterico che rimane blu scuro (Fig. 1D).

Il saggio con lectina LFA, specifica per le cellule sierose, ha reso possibile distinguerle al microscopio ottico all'interno e nell'intorno delle masse extracellulari. In tutti i casi questo tipo cellulare si è rivelato associato alle reti (Fig. 1E). Inoltre questa marcatura ha permesso un conteggio per confrontare la frazione di cellule sierose nei campioni trattati con i batteri con quella dei controlli. L'analisi dei risultati ha mostrato un incremento significativo della percentuale di cellule sierose sugli emociti totali nei campioni trattati rispetto ai controlli (Fig. 3).



**Fig. 3** - Percentuale di cellule sierose rispetto al totale degli emociti riconosciute e contate dopo marcatura con LFA nel controllo e a seguito di incubazione con i batteri per 15 ore. Differenza significativa rispetto al controllo: \*\*\*  $p < 0,001$ .

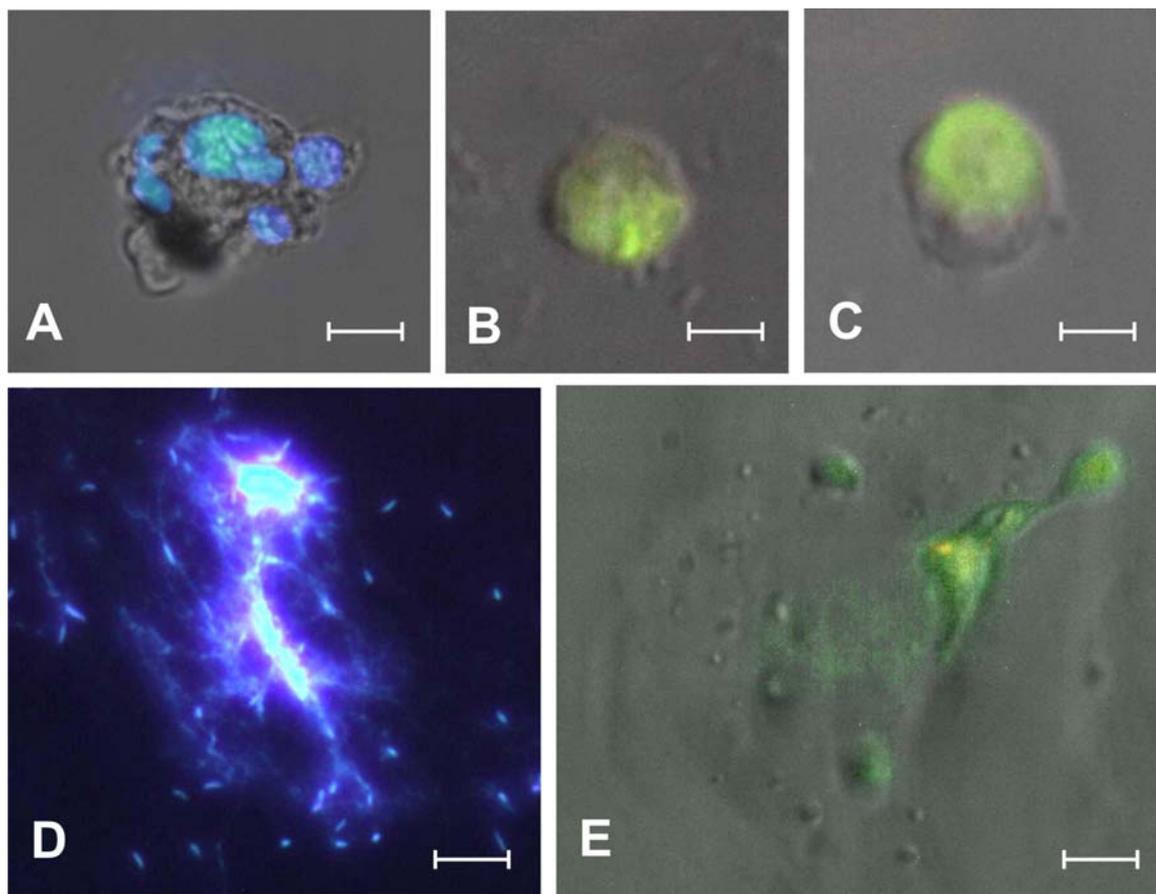
Le cellule sierose si rivelano polinucleate (Fig. 4A) e, a seguito dell'incubazione prolungata con batteri, la cromatina appare frammentata e dispersa nel citoplasma (Fig. 4B,C).

#### **4.3 Struttura e composizione chimica delle reti extracellulari**

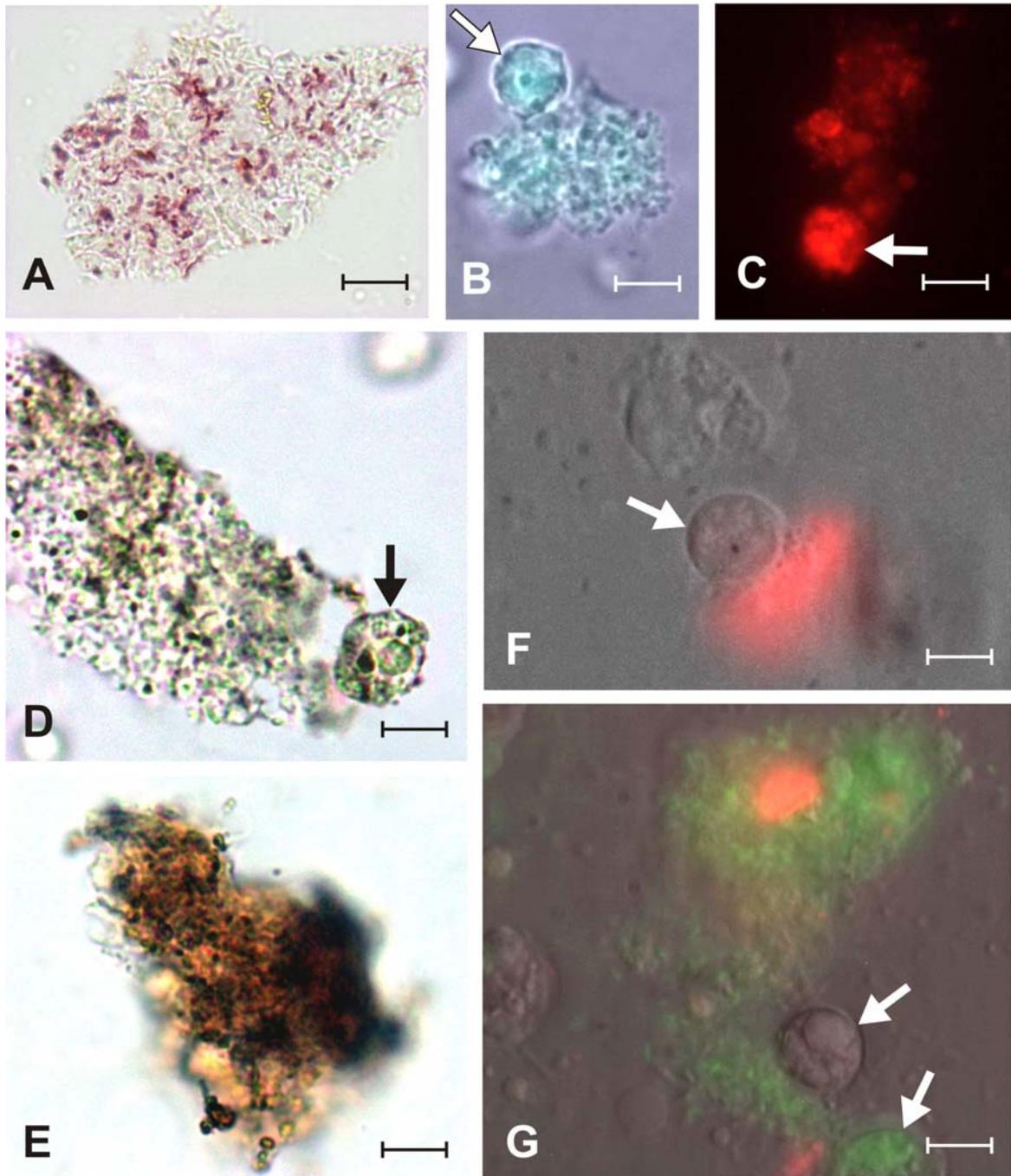
Tramite la microscopia a fluorescenza sono state ottenute immagini che evidenziano la presenza di un'impalcatura delle reti extracellulari costituita da cromatina (Fig. 4D), la quale appare in gran parte frammentata come evidenziato dalla reazione TUNEL (Fig. 4E).

Oltre alla presenza di cromatina sono state identificate altre componenti delle reti grazie a vari saggi istochimici, immunoistochimici e istoenzimatici. Grazie alla colorazione con il Rosso Congo è stata rivelata la presenza di ammassi amiloidi nelle reti (Fig. 5A). Il saggio con solfato di berberina e quello con anticorpo anti-istamina hanno dimostrato positività sia all'interno delle cellule sierose che nelle reti sia per l'eparina (Fig. 5B) che per l'istamina (Fig. 5C). Le reti hanno inoltre mostrato attività enzimatica di serin-proteasi: triptasi (Fig. 5D) e chimasi (Fig. 5E).

L'analisi della vitalità dei batteri condotta con il kit 'Dead & Live' ha dimostrato batteri morti nell'immediato intorno di cellule sierose (Fig. 5F) e la presenza di aggregati di batteri morti all'interno delle reti (Fig. 5G).



**Fig. 4** – **A.** Cellula sierosa in coltura non esposta a batteri a mostrare la presenza di più nuclei evidenziati dal fluorocromo DAPI. **B.** **C.** Cellule sierose con cromatina frammentata evidenziata tramite la reazione TUNEL dopo esposizione a batteri. **D.** Filamenti di cromatina costituenti l'impalcatura della rete che invischiano cellule batteriche, messi in risalto dal fluorocromo DAPI insieme alla fluorescenza del DNA dei batteri. **E.** Cromatina frammentata presente nella rete evidenziata tramite la reazione TUNEL.  
 Barra: **A:** 6,5  $\mu\text{m}$ . **B,** **C:** 3  $\mu\text{m}$ . **D:** 4,5  $\mu\text{m}$ . **E:** 5  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 5** – Cellule sierose (frecche) di *Ruditapes philippinarum* e reti extracellulari sottoposte a diversi saggi. **A.** Rete colorata con Rosso Congo per l'amiloide. **B.** Cellula e rete positive all'eparina, resa visibile grazie alla reazione con solfato di berberina. **C.** Cellula e rete positive al saggio con anticorpo anti-istamina. **D.** Cellula e rete con presenza di attività enzimatica della triptasi. **E.** Rete con presenza di attività enzimatica della chimasi. **F.** Batteri morti colorati di rosso dal kit 'Dead & Live', raggruppati attorno a una cellula sierosa degranulata. **G.** Batteri morti colorati di rosso in mezzo ad altri vivi colorati di verde mediante il kit 'Dead & Live', invischiati nelle reti prodotte dalle cellule sierose. Barra: **A:** 9,5  $\mu\text{m}$ . **B:** 8  $\mu\text{m}$ . **C, E:** 6,5  $\mu\text{m}$ . **D:** 7  $\mu\text{m}$ . **F, G:** 6  $\mu\text{m}$ .

## 5. Discussione

Gli emociti dei bivalvi, in seguito a invasione batterica, vengono attratti nei siti di infezione tramite reazioni chemotattiche e chemocinetiche che dipendono dalla natura delle molecole non-self (Schneeweiss e Renwants, 1993). Dopo la migrazione degli emociti, inizia una prima fase di fagocitosi in cui in genere sono gli emociti presenti in maggiore percentuale, ovvero i granulociti e gli ialinociti, ad espletare questo tipo di risposta (Smith *et al.*, 2016); la loro proporzione varia in maniera specie-specifica tra i bivalvi, anche in relazione all'esposizione a diversi agenti patogeni (Pipe *et al.*, 1997; Parisi *et al.*, 2008). Durante la fagocitosi, insieme a enzimi che degradano il materiale estraneo entro i fagosomi, viene prodotta un'elevata concentrazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) dovuta al 'burst respiratorio' (Song *et al.*, 2010). Questo tipo di risposta innata è molto simile a quella dei granulociti neutrofilo dei mammiferi (Fuchs *et al.*, 2007), i quali, attivati dalla presenza di batteri, producono citochine, chemochine e sostanze citotossiche e si comportano anche da cellule 'scavenger' fagocitando cellule e frammenti cellulari. Il fenomeno dell'ETosi, cioè la formazione di trappole extracellulari da parte dei neutrofilo rappresenta un potente meccanismo secondario, che subentra dopo il rilascio di sostanze citotossiche e la fagocitosi, con cui questi immunociti aggrediscono i batteri potenzialmente patogeni penetrati entro l'organismo sacrificando se stesse. Queste reti, abbondanti nei focolai di infiammazione, sono formate infatti da cromatina decondensata (filamentosa) ornata da proteine precedentemente contenute nei granuli, e sono in grado di agglutinare sia batteri Gram-positivi che Gram-negativi favorendo l'aumento di concentrazione locale di molecole antimicrobiche le quali uccidono infine i batteri immobilizzati. Questo processo è stimolato dalla presenza di ROS che agiscono a loro volta come secondi messaggeri (Tonks, 2005). La capacità di formare trappole extracellulari è un meccanismo ancestrale condiviso anche da molti invertebrati tra cui si riscontrano alcune differenze. Ad esempio, rispetto ai crostacei, i bivalvi mostrano alti livelli di fagocitosi (Wootton *et al.*, 2003), ma livelli più bassi di ETosi (Robb *et al.*, 2014): secondo questi autori, dal momento che i fagociti degli organismi filtratori sarebbero coinvolti anche nel trasporto di sostanze nutritive ai vari compartimenti corporei, la perdita eccessiva di fagociti tramite il meccanismo di morte cellulare nella formazione delle reti extracellulari risulterebbe svantaggiosa.

Dopo 15 ore di esposizione *in vitro* degli emociti di *R. philippinarum* ai batteri abbiamo osservato distintamente ammassi riconducibili a reti extracellulari, suggerendo che il fenomeno dell'ETosi, come avviene nei neutrofilo dei mammiferi, sia quindi successivo all'iniziale aggregazione di emociti: a seguito dell'attacco dei batteri i neutrofilo vengono reclutati in massa nel sito d'infiammazione (Fuchs *et al.*, 2007), dove vengono attivati, secernono sostanze citotossiche, e si comportano inizialmente da fagociti; nei primi 60 minuti di

incubazione, infatti, la fagocitosi sembra essere il principale meccanismo di eliminazione dei batteri, ma questa attività diminuisce a partire dai 120 minuti successivi all'attacco, quando inizia il processo di ETosi e la maggior parte dei granuli citoplasmatici sparisce. In particolare, inizialmente l'involucro nucleare forma vescicole distinte, mentre a partire da 180 minuti dopo l'incubazione il nucleo si disintegra in numerose vescicole, la cromatina si decondensa. L'integrità della membrana plasmatica dei neutrofilii attivati non è tuttavia perturbata dalla rottura delle membrane interne, permettendo il rimescolamento intracellulare dei componenti della rete che verranno rilasciati successivamente; il rilascio delle reti nell'ambiente extracellulare avviene solo nel momento in cui la membrana plasmatica diviene più fluida. *In vitro*, circa 1/3 dei neutrofilii attivati forma reti, in seguito alla stimolazione simultanea di diversi recettori, quali Toll-like receptor, citochinine, Tc (Brinkmann e Zychlinsky, 2007). Il fenomeno è irreversibile per i neutrofilii, ma si è osservato che negli eosinofili, pure in grado di compiere ETosi, vi sono alcune differenze: non solo la degranolazione è incompleta, ma anche la cromatina che compone la rete è parzialmente di origine mitocondriale, meno flessibile e più condensata. Il fatto di non perdere tutto il materiale nucleare permetterebbe agli eosinofili di rimanere attivi più a lungo (Ueki *et al.*, 2016).

L'importanza delle reti extracellulari nella lotta ai patogeni comprende diversi aspetti e rappresenta un meccanismo molto conservato in quanto ci sono evidenze della sua presenza persino nel mondo vegetale (Wen *et al.*, 2009; Hawes *et al.*, 2011). Innanzitutto esse intrappolano fisicamente i patogeni impedendone la diffusione nell'organismo, meccanismo importante soprattutto nel caso degli animali con sistema circolatorio aperto, quali i bivalvi, per impedire l'entrata degli agenti infettanti nelle cavità corporee (Robb *et al.*, 2014); inoltre, grazie alla loro struttura, garantiscono un'alta concentrazione locale di molecole antimicrobiche (nel caso dei mammiferi si tratta soprattutto di istoni e calprotectine) e di ROS minimizzandone il danno tissutale (Fuchs *et al.*, 2007; Guimarães-Costa *et al.*, 2012). Nelle reti extracellulari osservate da noi in *R. philippinarum* è stata rilevata la presenza di sostanze amiloidi, aggregati proteici amorfi con il ruolo, strettamente conservato in invertebrati e vertebrati, di segnali per l'adesione (Coulson *et al.*, 2000). Il fenomeno di ETosi, pur nascendo come meccanismo per favorire l'incapsulazione di materiali e cellule estranei, presenta anche dei lati negativi alla base di diverse patologie nei mammiferi. Gli assembramenti di leucociti e piastrine sulle reti di cromatina nei vasi sanguigni possono portare a trombosi (Fuchs *et al.*, 2010; 2012; Brill *et al.*, 2012). Le reti inoltre sembrano facilitare le metastasi tumorali intrappolando le cellule cancerogene e permettendo la loro adesione ai tessuti sani (Cools-Lartigue *et al.*, 2013). Sono associate a malattie respiratorie croniche perché aumentano la viscosità degli espettorati, con conseguente colonizzazione microbica e formazione di 'biofilm' (Papayannopoulos *et al.*, 2011; Youg *et al.*, 2011; Dubois *et al.*, 2012).

L'efficacia della rete come sistema di uccisione dei batteri è stata osservata in *R. philippinarum* mediante l'utilizzo del kit 'Dead & Live': i batteri ancora vivi

vengono invischiati dalla rete e vanno incontro a morte in alcune zone della rete stessa, suggerendo la presenza di sostanze antimicrobiche. D'altra parte si è osservato nei mammiferi che i patogeni sono in grado di difendersi dall'azione delle reti: molti batteri Gram-positivi sono in grado di secernere DNAsi o la portano legata alla loro parete, agendo direttamente sullo scheletro di cromatina delle reti e quindi disassemblandole (Brinkmann e Zychlinsky, 2007). Anche la catalasi, comunemente presente nei batteri, potrebbe essere utilizzata per diminuire la concentrazione di ROS (Fuchs *et al.*, 2007). Un altro contributo alla resistenza di molti batteri è la formazione di una capsula, che rende difficoltoso l'attacco delle reti alla spora (Cole *et al.*, 2010). Nei bivalvi, come *R. philippinarum*, la presenza di proteasi nelle reti potrebbe rappresentare un'ulteriore arma antibatterica per digerire gli enzimi batterici.

La cromatina è dunque un elemento fondamentale per il corretto funzionamento delle reti, in quanto costituisce l'impalcatura per altre sostanze battericide citoplasmatiche. Il suo ruolo di sostegno è stato messo in evidenza nelle reti di *R. philippinarum*; la cromatina, proveniente dalle cellule sierose, si è rivelata abbondantemente frammentata. Queste osservazioni sembrano compatibili con quanto si verifica durante il processo di morte cellulare per ETosi, che è molto diverso da quello che avviene per apoptosi o necrosi. In studi effettuati sul granchio *Carcinus maenas* si è evidenziato il ruolo sinergico di enzimi e citoscheletro nei fenomeni che coinvolgono il nucleo e il suo contenuto: inizialmente la NADPH ossidasi permette la decondensazione della cromatina prima del suo rilascio, mentre l'actina citoscheletrica posiziona correttamente il nucleo vicino alla membrana plasmatica poco prima della fuoriuscita della rete (Robb *et al.*, 2014). Il processo negli invertebrati appare quindi paragonabile a quello che avviene nei mammiferi, i cui meccanismi sono stati però caratterizzati molto più nel dettaglio: usando marcatori per la morte cellulare e per la formazione delle reti extracellulari è stato dimostrato che i componenti della rete vengono rilasciati solo al momento della morte della cellula, e hanno reso possibile la distinzione dell'ETosi dall'apoptosi e dalla necrosi in quanto durante l'ETosi viene perduta l'organizzazione dell'involucro nucleare (Brinkmann e Zychlinsky, 2007).

In *R. philippinarum*, le cellule sierose sono le protagoniste di questo fenomeno. Fin dalle prime osservazioni a tempi diversi di incubazione con i batteri è emerso che, oltre all'aumento progressivo del numero di aggregati di emociti, si verificava un incremento significativo della percentuale di cellule sierose rispetto al totale degli emociti. Tali risultati sono a supporto di quelli ottenuti precedentemente *in vivo* e *in vitro* da Berton (2016-17) sulla capacità di proliferazione in circolo di emoblasti competenti nel differenziarsi in cellule sierose in seguito a infezione batterica prolungata. La cellula sierosa era stata finora un tipo cellulare poco considerato perché scarsamente rappresentato in circolo e poco caratterizzato dal punto di vista morfo-funzionale. Solo recentemente uno studio basato sull'affinità delle lectine (Monteforte 2015-16) ha

permesso di rivelare che questo tipo cellulare esibisce sulla superficie grandi quantità di acido sialico che viene marcato dalla lectina LFA. Questo particolare monosaccaride ha un ruolo molto importante nell'immunità innata, in quanto, nei mammiferi, viene utilizzato per riconoscere le cellule 'self' tramite il legame tra il fattore H e C3b nella via di attivazione del complemento che porta alla lisi dei batteri (Varki e Gagneux, 2012); questo meccanismo viene sfruttato tuttavia anche da alcuni patogeni che usano a loro volta l'acido sialico per legare le cellule da aggredire (Lehmann *et al.*, 2006), e per rendersi difficilmente individuabili dall'ospite (Lewis *et al.*, 2009).

In passato alcuni autori avevano osservato che, in seguito a infezione batterica, il primo fenomeno osservabile nei bivalvi era una tendenza all'aggregazione *in vitro* di cellule sierose con altri emociti (Nakayama *et al.*, 1997). In *R. philippinarum* abbiamo potuto constatare che le cellule sierose sono responsabili del fenomeno di ETosi, in quanto, oltre ad essere stata riscontrata sempre un'associazione fisica tra cellule e reti, si sono trovate strette corrispondenze tra la composizione dei granuli citoplasmatici e quella delle reti extracellulari, rappresentata in prevalenza da eparina, istamina e serin proteasi. Inoltre la colorazione di Pappenheim ha permesso di identificare lo stesso contenuto dei granuli delle cellule sierose, soggetto a metacromasia, nelle reti che intrappolano i batteri. Nelle cellule sierose attivate di *R. philippinarum* la cromatina appare non più confinata nei nuclei ma distribuita omogeneamente nella cellula, dove verosimilmente sarà mescolata alle componenti citoplasmatiche, suggerendo un meccanismo simile a quello che avviene nei neutrofilo attivati.

In conclusione questa tipologia cellulare si è dimostrata fondamentale nella risposta infiammatoria e nella difesa contro i materiali 'non-self', risultando simile in quanto a contenuto dei granuli ai mastociti dei vertebrati: si è determinata la presenza di eparina, molecola fondamentale nel rilascio di altri mediatori chimici come l'istamina e le proteasi, e di istamina, importante mediatore chimico nel processo infiammatorio. Nella formazione delle reti extracellulari, infine, le cellule sierose potrebbero non essere le sole cellule coinvolte. Così come i neutrofilo sono affiancati dagli eosinofili nella formazione di reti nei mammiferi, non è escluso che anche le cellule sierose siano potenziate dal contributo di altri emociti, come ad esempio i granulociti.

## 6. Bibliografia

- ALLAM B., PAILLARD C. (1998) – Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Org.*, **33**: 123-128.
- BEITER K., WARTHA F., ALBINGER B., NORMARK S., ZYCHLINSKY A., HENRIQUES-NORMARK B. (2006) – An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.*, **16**: 401-407.

- BERTON F. (2016-17) – “Proliferazione e differenziamento degli emociti della vongola filippina in seguito a infezione batterica”. Elaborato di Laurea in Biologia, Università degli Studi di Padova.
- BRILL A., FUCHS T.A., SAVCHENKO A.S., THOMAS G.M., MATINOD K., DE MEYER S.F., BHANDARI A.A., WAGNER D.D. (2011) – Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J. Thromb. Haemost.*, **10**: 136-144.
- BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A. (2007) – Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev.*, **5**: 577-582.
- BRINKMANN V., REICHARD U., GOOSMANN C., FAULER B., UHLEMANN Y., WEISS D.S., WEINRAUCH Y., ZYCHLINSKY A. (2004) – Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, **303**: 1532-1535.
- CANESI L., PRUZZO C. (2016) – Specificity of innate immunity in bivalves: A lesson from bacteria. In: “Lessons in Immunity: From Single-cell Organisms to Mammals”, Ballarin L., Cammarata M. Eds., Academic Press, London, pp. 79-91.
- CERENIUS L., LEE B.L., SÖDERHÄLL K. (2008) – The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.*, **29**: 263-271.
- CHENG T.C. (1981) – Bivalves. In: “Invertebrate blood cells. Volume 1. General aspects, animals without true circulatory system to cephalopods”, Ratcliffe N.A., Rowley A.F. Ed., Academic Press, London, pp. 233-300.
- CIMA F., MATOZZO V., MARIN M.G., BALLARIN L. (2000) – Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adam & Reeve, 1850): morphofunctional characterization. *Fish Shellfish Immunol.*, **10**: 677-693.
- COLE J.N., PENCE M.A., von KÖCKRITZ-BLICKWEDE M., HOLLANDS A., GALLO R.L., WALKER M.J., NIZET V. (2010) – M protein and hyaluronic acid capsule are essential for *in vivo* selection of covRS mutations characteristic of invasive serotype MIT1 group A *Streptococcus*. *mBio*, **1**: e00191-10.
- COOLS-LARTIGUE J., SPICER J., McDONALD B., GOWING S., CHOW S., GIANNIAS B., BOURDEAU F., KUBES P., FERRI L. (2013) – Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.*, **123**: 3446-3458.
- COULSON E.J., PALIGA K., BEYREUTHER K., MASTERS C.L. (2000) – What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem. Int.*, **36**: 175-184.
- DE EGUILEOR M., GRIMALDI A., TETTAMANTI G. (2016) – Protective responses in invertebrates. In: “Lessons in Immunity: From Single-cell Organisms to Mammals”, Ballarin L., Cammarata M. Ed., Academic Press, London, pp. 145-157.
- DONAGHY L., LAMBERT C., CHOI K.S., SOUDANT P. (2009) – Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. *Aquaculture*, **297**: 10-24.
- DUBOIS A.V., GAUTHIER A., BRÉA D., VARAIGNE F., DIOT P., GAUTHIER F., ATTUCCI S. (2012) – Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **47**: 80-86.
- FERNAU W. (1914) – Die Niere von *Anodonta cellensis* Schröt I Teil. Die Histologie der Niere. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, **120**: 222-245.
- FISHER W.S. (1992) – Occurrence of agglutinins in the pallial cavity mucus of oysters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **162**: 1-13
- FUCHS T.A., ABED U., GOOSMANN C., HURWITZ R., SCHULZE I., WAHN V., WEINRAUCH Y., BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A. (2007) – Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.*, **176**: 231-241.
- FUCHS T.A., BRILL A., DUERSCHMIED D., SCHATZBERG D., MONESTIER M., MYERS jr. D.D., WROBLESKI S.K., WAKEFIELD T.W., HARTWIG J.H., WAGNER D.D. (2010) – Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **107**: 15880-15885.
- FUCHS T.A., BRILL A., WAGNER D.D. (2012) – Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **32**: 1777-1783.
- GUIMARÃES-COSTA A.B., NASCIMENTO M.T.C., WARDINI A.B., PINTO-da-SILVA L.H., SARAIVA E.M. (2012) – ETosis: a microbicidal mechanism beyond cell death. *J. Parasit. Res.*, **2012**: e929743.
- GUPTA A.K., HASLER P., HOLZGREVE W., GEBHARDT S., HAHN S. (2005) – Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 anche their presence in preeclampsia. *Hum. Immunol.*, **66**: 1146-1154.

- HANSELMANN R., SMOLOWITZ R., GIBSON D. (2000) – Identification of proliferating cells in hard clams. *Biol. Bull.*, **199**: 199-200.
- HAWES M.C., CURLANGO-RIVERA G., WEN F., WHITE G.J., VANETTEN H.D., XIONG Z. (2011) – Extracellular DNA: the tip of root defenses? *Plant Sci.*, **180**: 741-745.
- HEYWORTH P.G., CROSS A.R., CURNUTTE J.T. (2003) – Chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Immunol.*, **15**: 578-584.
- JEMAA M., MORIN N., CAVELIER P., CAU J., STRUB J.M., DELSERT C. (2014) – Adult somatic progenitor cells and haematopoiesis in oysters. *J. Exp. Biol.*, **217**: 3067-3077.
- LE BRIS C., RICHARD G., PAILLARD C., LAMBERT C., SEGUINEAU C., GAUTHIER O., PERNET F., GUÉRARD F. (2015) – Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the Manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish Shellfish Immunol.*, **42**: 16-24.
- LECLERC M. (1996) – Humoral factors in marine invertebrates. In: “Invertebrate Immunology”, Rinkevich B., Muller W.E.G. Ed., Springer Verlag, Berlin, pp. 1-10.
- LEHMANN F., TIRALONGO E., TIRALONGO J. (2006) – Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**: 1331-1354.
- LEWIS A.L., DESA N., HANSEN E.E., KNIREL Y.A., GORDON J.I., GANGNEUX P., NIZET V., VARKI A. (2009) – Innovations in host and microbial sialic acid biosynthesis revealed by phylogenomic prediction of nonulosonic acid structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**: 13552-13557.
- MATOZZO V., MARIN M.G., CIMA F., BALLARIN L. (2008) – First evidence of cell division in circulating hemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum*. *Cell. Biol. Int.*, **32**: 865-868.
- McDADE J.E., TRIPP M.R. (1967) – Lysozyme in the oyster mantle mucus. *J. Invertebr. Pathol.*, **9**: 581-582
- MOLLOY S. (2006) – Bacterial pathogenesis: escaping the net. *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**: 242-243.
- MONROY F., HERTEL L.A., LOKER E.S. (1992) – Carbohydrate-binding plasma proteins from the gastropod *Biomphalaria glabrata*: strain specificity and the effects of trematode infection. *Dev. Comp. Immunol.*, **16**: 355-366.
- MONTEFORTE S. (2015-16) – “Nuove indagini sugli emociti di *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): aspetti ultrastrutturali e funzionali”. Elaborato di Laurea in Scienze Naturali, Università degli Studi di Padova.
- NAKAYAMA K., NOMOTO A.M., NISHIJIMA M., MARUYAMA T. (1997) – Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. *J. Invertebr. Pathol.*, **69**: 105-111.
- NAPPI A.J., VASS E., FREY F., CARTON Y. (2000) – Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide*, **4**: 423-430.
- OLAFSEN J.A. (1995) – Role of lectins (C-reactive protein) in defense of main bivalves against bacteria. In: “Advances in Mucosal Immunology”, Mestecky J. et al. Eds., Plenum Press, New York, pp. 343-348.
- OTTAVIANI E., FRANCHINI A., BARBIERI D., KLETSAS D. (1998) – Comparative and morphofunctional studies on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Presence of two aging-related hemocyte stage. *It. J. Zool.*, **65**: 349-354.
- OUBELLA R., PAILLARD C., MAES P., AUFFRET M. (1994) – Changes in hemolymph parameters in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacteria challenge. *J. Invertebr. Pathol.*, **64**: 33-38.
- PAPAYANNOPOULOS V., STAAB D., ZYCHILINSKY A. (2011) – Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PLoS ONE*, **6**: e285226.
- PARISI M.G., LI H., JOUVET L.B.P., DYRYNDA E.A., PARRINELLO N., CAMMARATA M., PHILIPPE R. (2008) – Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol.*, **25**: 834-840.
- PEREIRA L.S., OLIVERIA P.L., BARJA-FIDALGO C., DAFFRE S. (2001) – Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattieck *Boophilus microplus*. *Exp. Parasitol.*, **99**: 66-72.
- PESKIN A.V., LABAS Y.A., TIKHONOV A.N. (1998) – Superoxide radical production by sponge *Sycon* sp. *FEBS Lett.*, **434**: 201-204.

- PILA E.A., SULLIVAN J.T., WU X.Z., FANG J., RUDKO S.P., GORDY M.A., HANINGTON P.C. (2016) – Haematopoiesis in molluscs: a review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. *Dev. Comp. Immunol.*, **58**: 119-128.
- PIPE R.K., FARLEY S.R., COLES J.A. (1997) – The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.*, **289**: 537-545.
- PRIEUR G., MEVEL G., NICOLAS J.L., PLUSQUELLEC A., VIGNEULLE M. (1990) – Interactions between bivalve mollusks and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, **28**: 277-352.
- REBELO M.d.F., FIGUEIREDO E.d.S., MARIANTE R.M., NÓBREGA A., de BARROS C.M., ALLODI S. (2013) – New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. *PLoS One*, **8**: e57384.
- ROBB C.T., DYRYNDA E.A., GRAY R.D., ROSSI A.G., SMITH V.J. (2014) – Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. *Nat. Commun.*, **5**: e4627.
- SCHNEEWEISS H., RENWRANTZ L. (1993) – Analysis of the attraction of haemocytes from *Mytilus edulis* by molecules of bacterial origin. *Dev. Comp. Immunol.*, **17**: 377-387.
- SIMKISS K. (1983) – Molluscan skin. In: “The Mollusca, vol. 11”, K.M. Wilbur Ed., Academic Press, London, pp. 11-35.
- SMITH V.J., ACCORSI A., MALAGOLI D. (2016) – Hematopoiesis and hemocytes in pancrustacean and molluscan models. In: “The Evolution of the Immune System”, Ch. 1, D. Malagoli Ed., Academic Press-Elsevier, Amsterdam, pp. 1-28.
- SMOLOWITZ R., LEAVITT D., PERKINS F. (1998) – Observations of a protistan disease similar to QPX in *Mercenaria mercenaria* (hard clam) from the coast of Massachusetts. *J. Invertebr. Pathol.*, **71**: 9-25.
- SÖDERHÄLL K., CERENIUS L. (1998) – Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 23-28.
- SONG L., WANG L., QIU L., ZHANG H. (2010) – Bivalve immunity. In: “Invertebrate Immunity”, K. Söderhäll Ed., Landes Bioscience/Springer Science+Business Media, LLC, New York, pp. 44-65.
- TIRAPÉ A., BACQUE C., BRIZARD R., VANDENBULCKE F., BOULO V. (2007) – Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev. Comp. Immunol.*, **31**: 859-73.
- TONKS N.K. (2005) – Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*, **121**: 667-670.
- UEKI S., TOKUNAGA T., FUJIEDA S., HONDA K., HIROKAWA M., SPENCER L.A., WELLER P.F. (2016) – Eosinophil ETosis and DNA traps: a new look at eosinophilic inflammation. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **16**: 54-61.
- VARKI A., GAGNEUX P. (2012) – Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1253**: 16-36.
- WEN F., WHITE G.J., VANETTEN H.D., XIONG Z., HAWES M.C (2009) – Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant Physiol.*, **151**: 820-829.
- WOOTTON E.C., DYRYNDA E.A., RATCLIFFE N.A. (2003) – Bivalve immunity: Comparison between the marine mussel (*Mytilus edulis*) the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish Shellfish Immunol.*, **15**: 195-210.
- YOUNG R.L., MALCOLM K.C., KRET J.E., CACERES S.M., POCH K.R., NICHOLS D.P., TAYLOR-COUSAR J.L., SAAVEDRA M.T., RANDELL S.H., VASIL M.L., BURNS J.L., MOSKOWITZ S.M., NICK J.A. (2011) – Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS ONE*, **6**: e23637
- YUE F., ZHOU Z., WANG L., SUN R., JIANG Q., YI Q., ZHANG T., SONG L. (2014) – The essential roles of core binding factors Cfrunt and CfcBfb in hemocyte production of scallop *Chlamys farreri*. *Dev. Comp. Immunol.*, **44**: 291-301.