

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA AVANZATA
INDIRIZZO BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA
XXIV CICLO**

TESI DI DOTTORATO

**La vitellogenina
in *Mytilus galloprovincialis* e la sua
utilizzo quale biomarcatore dello
stato d'inquinamento del Golfo di Napoli**

Relatore:
Ch.mo Prof. Piero Andreuccetti

Candidato:
Dott. Enrico de Meo

Coordinatore del corso:
Ch.mo Prof. Luciano Gaudio

Anno Accademico 2010/2011

INDICE

INTRODUZIONE.....	
CAPITOLO I: La VITELLOGENINA.....	
1.1 La vitellogenina nei vertebrati.....	
1.2 La vitellogenina negli invertebrati.....	
CAPITOLO II: LA VITELLOGENINA COME BIOINDICATORE.....	
CAPITOLO III. SCOPO DELLA TESI.....	
CAPITOLO IV: IL MODELLO SPERIMENTALE: <i>Mytilus galloprovincialis</i>	
CAPITOLO V: MATERIALI E METODI.....	
Animali.....	
RT-PCR e Analisi di Espressione della VTG.....	
Ibridazione in <i>situ</i>	
Sintesi della sonda a RNA per la VTG.....	
Sintesi delle sonde a cDNA per i recettori degli estrogeni (ER1 e ER2).....	
Ibridazione in situ per rilevare l'mRNA per la VTG.....	
Ibridazione in situ con cDNA per rilevare l'mRNA dei recettori degli estrogeni (ER ₁ e ER ₂).....	
Microscopia elettronica.....	
Analisi di espressione.....	
Estrazione di RNA.....	
Retrotrascrizione.....	
PCR.....	
PCR per ER ₁	
PCR per ER ₂	
PCR per rRNA 18S.....	
Saggio TUNEL.....	
Analisi di immunocitochimica.....	
Analisi biometriche.....	
Indice di condizione.....	
Indice gonadico.....	
CAPITOLO VI: RISULTATI.....	
I Parte.....	
Il ciclo ovogenico di <i>Mytilus galloprovincialis</i> presente nel Golfo di Napoli.....	
II Parte.....	
Siti di sintesi della vitellogenina e sua regolazione.....	
Localizzazione del mRNA per la VTG nei follicoli ovarici e ghiandola digestiva.....	
Microscopia elettronica (TEM).....	
Analisi di espressione del mRNA per la VTG.....	
Localizzazione del mRNA per i recettori ER1 e ER2 nei follicoli ovarici e ghiandola digestiva.....	
Analisi di espressione per i recettori ER ₁ e ER ₂	
Immunocitochimica.....	
Confronto fra zona A e B.....	
CAPITOLO VII: DISCUSSIONE.....	
TAVOLE.....	
BIBLIOGRAFIA.....	

INTRODUZIONE

Come noto è solo negli ultimi anni che lo studio della vitellogenina (VTG) ha assunto un ruolo di primaria importanza negli organismi marini acquatici quali i molluschi bivalvi. In queste specie le indagini sulla VTG porta con se delle problematiche ancora irrisolte. Infatti, il problema principale nei mitili e nei bivalvi in generale è la determinazione della possibile sede/i di sintesi della VTG; In *Mytilus galloprovincialis*, così come in altre specie di bivalvi, la precisa conoscenza dei distretti di sintesi e del susseguente pathway metabolico della VTG è utile non solo per la comprensioni dei meccanismi fisiologici della suddetta proteina, ma anche per la corretta utilizzazione della VTG come possibile biomarker d'inquinamento ambientale. Tuttavia, in molte specie di bivalvi compreso *M. galloprovincialis* l'idea di una possibile autosintesi della VTG è spesso in contrasto con quella della eterosintesi della stessa proteina. Per quanto concerne *Mytilus galloprovincialis* le analisi di ibridazione *in situ* (ISH), eseguite in questa specie per la prima volta, e di microscopia elettronica sono a favore di una sintesi della VTG all'interno della gonade dal momento che tale sintesi è stata rilevata nell'ovocita e in altri distretti quali le cellule follicolari, all'interno del follicolo, e le cellule vescicolari (VCT). In questa specie sembra da escludere invece un possibile coinvolgimento della ghiandola digestiva. I nostri risultati necessiterebbero però di ulteriori conferme. Solo l'uso di un anticorpo omologo anti-VTG, attualmente non disponibile, potrebbe confermare e/o escludere la presenza della VTG nei distretti d'interesse e dimostrare la presenza della vitellogenina nei granuli di vitello osservati al TEM. Lo studio sui recettori degli estrogeni ER₁ e ER₂ e sulla VTG nei tessuti di gonade e ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* sembrerebbe dare ulteriore forza ai risultati precedentemente esposti. L'analisi di espressione ha evidenziato che nella gonade l'mRNA per tali recettori è assente nei momenti del ciclo in cui non è stata rilevata la presenza dell'mRNA per la VTG, mentre risulta presente quando tale sintesi è presente. Inoltre, dalle analisi di ISH è emerso che, nella gonade, mentre il mRNA ER₁ mostra una localizzazione a livello ovarico analoga a quella dell'mRNA *Vtg*, la marcatura del mER₂ è stata riscontrata in tutti i periodi del ciclo riproduttivo analizzato. Le stesse analisi hanno evidenziato che nella ghiandola digestiva il mRNA ER₁, al pari del mRNA *Vtg*, non mostra alcuna marcatura, mentre il mRNA ER₂, a differenza del mRNA *Vtg*, risulta espresso in tutte differenti fasi del ciclo. Si può dunque ipotizzare, in base ai risultati, che in anche in *Mytilus galloprovincialis*, al pari di altri molluschi, tali recettori siano coinvolti nella regolazione della vitellogenasi, anche se con funzioni differenti: ER₁ con una funzione regolativa, ER₂ costitutiva. Infine, le indagini condotte nelle due differenti zone del Golfo di Napoli localizzate nei pressi di Castel dell'Ovo (zona A e zona B) hanno evidenziato che i mitili possono essere utilizzati quali specie sentinella per rilevare lo stato di stress ambientale del Golfo di Napoli. Ciò che è emerso chiaramente dallo studio di alcuni biomarkers quali l'indice di condizione e l'indice gonadico, l'incidenza di processi apoptotici ed in particolare l'espressione del mRNA dei recettori per gli estrogeni. In maniera analoga la VTG per la sua origine prevalentemente endogena non sembra costituire un valido biomarker di stress ambientale in *Mytilus galloprovincialis*.

CAPITOLO I

LA VITELLOGENINA

1.1 LA VITELLOGENINA NEI VERTEBRATI

Gli ovociti degli animali ovipari e ovovivipari sono caratterizzati dalla presenza di differenti materiali di riserva complessivamente indicati come vitello, fondamentali per la crescita dell'embrione. La componente più rilevante del vitello è costituita da materiale proteico, di cui la parte prevalente è rappresentata dalla/e vitellogenina (VTG). Esse sono glicolipofosfoproteine ad alta densità (300–700 kDa) che più spesso esibiscono caratteristiche simili nell'ambito di un determinato taxon (Blaise et al., 1999; Wallace, 1985). I geni codificanti la VTG appartengono a una famiglia multigenica. Nei vertebrati la famiglia dei geni per la VTG di *Xenopus laevis* è quella meglio caratterizzata: è costituita da quattro geni (A1, A2, B1, B2) che presentano il 95% di identità di sequenza tra i due membri dei gruppi A e B (Wahli 1979, 1981; Germond et al., 1984). Essi sono strettamente associati in due duplicati in tandem, A1-B1 e A2-B2, localizzati su differenti cromosomi (Wahli et al, 1982;. Germond et al, 1983). La divergenza tra le sequenze codificanti A e B è superiore tra A1 e A2 e tra B1 e B2, suggerendo che le sequenze di A e B sono sorte prima dalla duplicazione di un gene *Vtg* ancestrale prima della tetraploidizzazione relativamente recente, circa 40 milioni di anni (Myr) fa (Hellsten et al., 2007). L'analisi bio-molecolare ha suggerito che un iniziale evento di duplicazione del genoma ha portato alla formazione di due geni ancestrali A e B; un secondo evento di duplicazione ha portato infine alle coppie A1-A2 e B1-B2. È degno di nota che il genoma di *Xenopus tropicalis*, più antico di *X. laevis*, contiene singoli geni A e B, con un terzo gene (A*) espresso a livelli più bassi (Baker et al., 1985). Nel pollo sono stati identificati tre geni per la vitellogenina: *VtgI*, *VtgII*, e *VtgIII* (Van het Ship et al., 1987; Silva et al., 1989; Nardelli et al, 1987; Evans et al, 1988). Questi geni sono localizzati sul cromosoma 8 e *VtgII* e *VtgIII* sono co-localizzate a circa 2,1 megabasi (Mb) a monte di *VtgI*. La sequenza completa del gene *VtgII* di pollo ha mostrato elevata omologia con il gene A2 di *Xenopus* (Polzonetti-Magni et al., 2004). Entrambi presentano 35 esoni e 34 introni: le differenze in lunghezza dei due trascritti sono dovute alla lunghezza degli introni. Circa il 50% degli esoni presenta la stessa lunghezza e un'identità di sequenza che supera spesso il 50% (Mouchel et al., 1997). Tra i teleostei sono noti due geni per la VTG in *Fundulus* (LaFleur et al., 1995a, 1995b), uno in *Rivulus marmoratus* (Kim et al., 2004), sette in *Danio rerio* (Wang et al., 2000), mentre in *Oncorhynchus mykiss* si distinguono due locus genici per la VTG: il primo contenete due geni con quasi il 99% di identità di sequenza e separati da una regione intergenica di 4,5 Kb (Mouchel, 1997); un secondo locus al cui interno si distinguono venti geni *Vtg* completi e dieci pseudogeni con elevato grado di identità a livello di sequenza (97,4% -100%), nonostante vi siano differenze dovute a inserzioni di sequenza del tipo retrotrasposone, delezioni ed eventi di riarrangiamento (Trichet V., 2000). Molti salmonidi mostrano un andamento simile (Buisine, et Al., 2000). L'estensione dello studio dei geni per la VTG ad altre specie di salmonidi ha permesso di rilevare che in questa famiglia esistono due cluster di geni indicati con *A* e *B*. L'esistenza di un unico cluster nel genere *Oncorhynchus* e la

considerazione che tale genere è uno dei più recenti della famiglia ha portato alla conclusione che la mancanza dei geni *Vtg B* è dovuta alla perdita di questo cluster e non a una condizione ancestrale (Buisine et al., 2002).

Nei vertebrati le VTG sono sintetizzate dal fegato, rilasciate nel circolo sanguigno, sequestrate dall'ovocita in accrescimento (Wiley e Wallace, 1981; Baker et al., 1985, Wallace, 1985; Polzonetti-Magni, 2004). Le VTG dei vertebrati sono composte di due lipovitelline e una fosvitina, così distribuite all'interno del precursore: all'estremità N-terminale è localizzato il dominio che rappresenta la lipovitellina I; all'estremità C-terminale il dominio che rappresenta la lipovitellina II; e tra i due domini suddetti si pone il dominio della fosvitina. I domini della VTG si dispongono, dunque, in maniera lineare nel seguente modo: NH₂-catena pesante lipovitellina-fosvitina-catena leggera lipovitellina-componente β'-COOH (Lubzens et al., 2010). La VTG nei vertebrati è sintetizzata per lo più nel fegato per cui si parla vitellogenesi esogena o anche di eterosintesi della VTG. Successivamente questa lipofosfoglicoproteina viene secreta nel torrente circolatorio e trasportata all'ovario, dove viene assunta per un meccanismo di endocitosi mediata da recettori. L'internalizzazione della vitellogenina avviene in fossette rivestite della membrana plasmatica da cui si formano poi le vescicole rivestite; queste poi perdono il loro rivestimento di clatrina e si uniscono le une alle altre per dare vita ai globuli di vitello (Wallace, 1985; Limatola e Filosa, 1989; Prisco et al., 2002b; 2004). All'interno dei globuli, la VTG viene scissa in lipovitelline e fosvitine che rappresentano le principali classi di proteine del vitello. Questa proteolisi è definita degradazione primaria e avviene grazie ad enzimi appartenenti alla famiglia delle catepsine. Tra queste, la catepsina D, che è una proteasi aspartica lisosomiale è quella maggiormente coinvolta: (Retzek et al., 1992; Sire et al., 1994; Carnevali et al., 1999; Komazaki e Hiruma, 1999); è una proteina di circa 30-40kDa (Yoshizaki et Yonezawa, 1998; De Stasio et al., 1999) con azione enzimatica ottimale a pH acido (pH3-4). È interessante notare che la VTG è espressa anche in siti extraepatici. Il primo ad ipotizzare una sintesi extraepatica fu Wallace (1985), il quale suggerì che un 5-10% della sintesi totale della VTG potesse essere effettuata a livello gonadico, in particolare dall'ovocita stesso, e per questo denominata sintesi endogena o autosintesi in contrapposizione a quella che si verifica in maniera esogena a livello epatico. Studi successivi hanno confermato che in effetti la sintesi della VTG si attua anche in distretti extraepatici: nel pesce zebra *Danio rerio* è stato dimostrato che i geni per la VTG sono espressi anche nell'intestino e negli adipociti: tale sintesi è di scarsa rilevanza dal momento che costituisce solo il 5% della sintesi totale (Wang et al., 2005). Evidenze di una sintesi gonadica e precisamente a livello delle cellule follicolari è stata rilevata in *Torpedo marmorata* (Prisco et al; 2002; Prisco et al; 2004).

La vitellogenesi è un evento chiave della funzione riproduttiva e avviene durante l'ovogenesi, il cui principale sistema regolativo è l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Fattori ambientali naturali, come la temperatura e il fotoperiodo, la disponibilità di cibo, la presenza di luoghi adeguati per la riproduzione e la nidificazione influenzano il sistema nervoso centrale e l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi nel regolare la maturazione gonadica e la secrezione di ormoni sessuali. In seguito dunque a condizioni favorevoli i neuroni secernenti dell'ipotalamo rilasciano GnRH che stimola l'ipofisi a rilasciare LH e FSH. Tali gonadotropine, una volta riversate nel flusso sanguigno raggiungono la gonade dove attuano la produzione degli estrogeni che in parte vengono utilizzati per l'ovogenesi e in parte vengono immessi nel flusso circolatorio attraverso cui raggiungono il fegato e stimolano gli epatociti a sintetizzare la VTG che viene trasportata dal torrente circolatorio nell'ovario. Qui la VTG raggiunge i follicoli attraverso i capillari della teca, passa la membrana basale e gli spazi intercellulari nello strato della granulosa e arriva nello spazio perivitellino che circonda l'ovocita (Selman e Wallace, 1989; Wallace e Selman, 1990), dove viene incorporata con un meccanismo di endocitosi mediata da recettori (Wallace e Selman, 1990; Barber et al, 1991; Wahli et al., 1981; Denslow et al., 1999). In generale gli estrogeni e, in particolare il 17β-estradiolo sono potenti induttori della vitellogenesi. Sin dai primi esperimenti, infatti, la risposta vitellogenica alla somministrazione di estrogeni è stata descritta in condroitti (Woodhead, 1968; 1969a; Craik, 1978), teleostei (Bailey, 1957; Chung-Wai Ho e Vanstone, 1961; Fleming et al., 1964; Plack e Pritchard,

1968; Woodhead, 1969b; Plack et al., 1971; Aida et al., 1973; Amirante, 1972; Campbell e Idler, 1976), anfibi (Follett e Redshaw, 1968), rettili (Clark, 1967; Harh, 1967; Suzuki e Prosser, 1968; Geistle e Callard, 1972) e uccelli (Vanstone et al., 1957). L'attività di regolazione del 17 β -estradiolo sulla sintesi della VTG è stata poi suffragata da studi molecolari condotti principalmente in *Xenopus* (Klein-Hitpass, 1986; 1988) e in *Gallus* (Cato et al., 1988). Tali studi hanno infatti portato all'identificazione degli ERE (Estrogen Responsive Element) nelle regioni che fiancheggiano l'estremità 5' dei geni della VTG. Gli estrogeni sono inoltre in grado di aumentare il numero dei loro recettori in epatociti di maschi o femmine immature (Wallace, 1985) e di stabilizzare il messaggero della VTG contro la degradazione citoplasmatica (Brock e Shapiro, 1983). Nei vertebrati, come già detto, la VTG è normalmente prodotta nel fegato di femmine sessualmente mature in risposta a estrogeni endogeni, rilasciati in circolo sanguigno, e depositati negli ovociti in accrescimento attraverso endocitosi mediata da recettore. I livelli di VTG generalmente aumentano in femmine sessualmente mature, ma sono modesti nelle femmine immature e nei maschi, dove se presenti sono comunque evidenti in tracce. Nei maschi infatti i geni per la VTG sono normalmente silenti, ma i maschi possono sintetizzare e secernere VTG in risposta a estrogeni o a sostanze simili agli estrogeni. (Polzonetti-Mani, 2004; Mazzo et al., 2008) La produzione di VTG è influenzata inoltre dal pathway del recettore di estrogeno. La fig.A riassume i differenti momenti della vitellogenesi nei vertebrati.

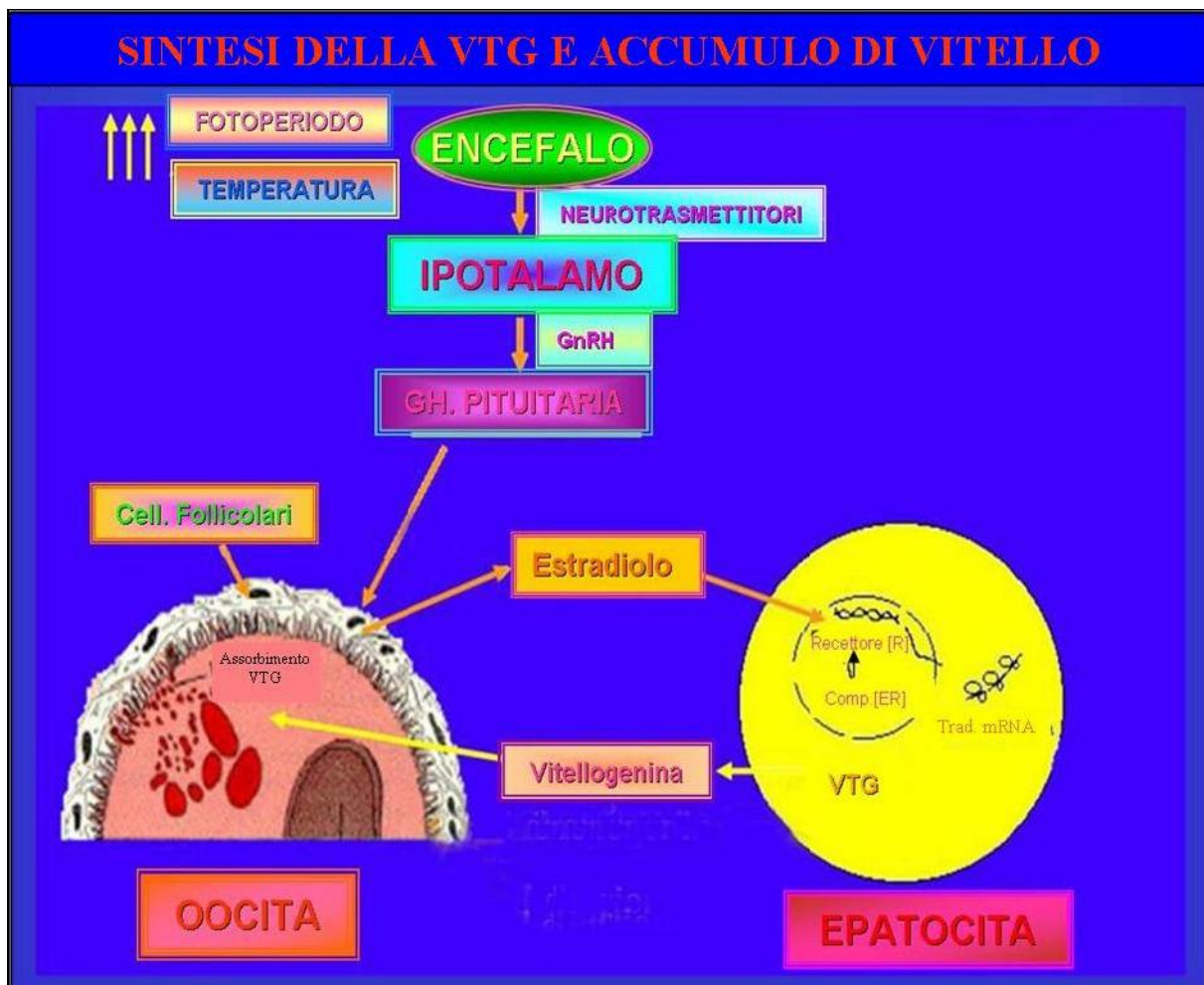


Fig.A: Schema di sintesi della VTG nei vertebrati. Fattori ambientali quali fotoperiodo e temperatura stimolano il SNC dove l'ipotalamo rilascia il GnRH che induce l'ipofisi a produrre e rilasciare le gonadotropine. Queste attraverso il sangue, giungono all'ovocita stimolandolo a produrre 17- β -estradiolo che per via ematica giunge agli epatociti dove, una volta internalizzato mediante un meccanismo di endocitosi mediata da recettore, stimola la trascrizione e la traduzione del gene della VTG. La VTG, attraverso il torrente ematico, giunge all'ovocita da cui viene assorbita e

depositata nel citoplasma sottoforma di granuli di vitello. Sistema nervoso centrale (SNC); Fattore di rilascio delle gonadotropine (GnRH).

1.2 LA VITELLOGENINA NEGLI INVERTEBRATI

Gli ovociti in accrescimento di tutte le specie ovipare accumulano elevate quantità di tuorlo per assicurare un'ampia disponibilità di acidi nucleici, proteine, lipidi, fosforo, carboidrati, ioni, e vitamine necessarie per uno sviluppo indipendente del futuro embrione. La fonte principale di questa proteina negli insetti è stata identificata nei corpi grassi ed è stata chiamata "vitellogenina" (VTG) o proteina del tuorlo (YP) da [Pan et al. \(1969\)](#). Dalla VTG ha origine, in seguito a scissione proteolitica della fosvitina, la vitellina. Il dominio della fosvitina, tipico delle VTG dei vertebrati e degli insetti, manca in parte o del tutto negli invertebrati finora studiati ([Ishikawa et al., 2004](#); [Chen et al., 1997](#)) il che spiegherebbe la maggiore suscettibilità delle proteine del vitello al danno ossidativo. Negli invertebrati, così come nei vertebrati, i geni derivanti da eventi di duplicazione, selezione purificante ed evoluzione concertata guidano l'evoluzione dei geni *Vtg* ([Chen S. et Al., 2010](#)). Nella selezione purificante, nota anche come selezione negativa, si verifica la rimozione selettiva di alleli rari che sono dannosi e allo stesso tempo porta al mantenimento delle sequenze geniche, conservate tra le specie, per lunghi periodi di tempo. Nell'evoluzione concertata, invece, esiste una certa forza (o forze molecolari) che mantiene uniformità di sequenza tra copie multiple di un gene. L'evoluzione concertata tra i geni duplicati (due copie) che non cambiano numero di copie ([Li WH. 1999](#); [Teshima KM., 2004](#)) può essere spiegata dalla conversione genica, un evento di ricombinazione genetica del DNA, dove tutto o parte di un gene è convertito nella sequenza di un gene omologo ([Chen JM, et Al., 2007](#)). Il crossover ineguale è un evento di ricombinazione tra sequenze non-alleleliche disallineate su una coppia di cromosomi omologhi e di solito provoca fluttuazione del numero-copia attraverso la delezione o la duplicazione della regione del gene. È spesso usato per spiegare l'evoluzione concertata all'interno delle famiglie di un gene disposte in tandem (tre o più copie) e genera sempre duplicati con lo stesso orientamento ("testa-coda") ([Chen JM, et Al., 2007](#)). Tra i sei geni *Vtg* (*Vit-1* - *Vit-6*), del nematode *Caenorhabditis elegans*, è stata osservata una elevata identità di sequenza tra *Vit-1* e *Vit-2* (95% identità) e tra *Vit-3*, *Vit-4* e *Vit-5* (sopra il 96%), mentre *Vit-3* e *Vit-4* si trovano in tandem sul cromosoma X e sono quasi identici gli uni agli altri nella regione codificante ([Spieth et al, 1985](#)); inoltre, il gene *Vtg*, *Vit-1*, è uno pseudogene ([Spieth et al., 1985](#); [Trichet et al., 2000](#)). Nello scarafaggio *Leucophaea maderae* due geni *Vtg* con somiglianza elevata tra loro (96% di identità a livello di aminoacidi) sono situati in loci diversi ([Tufail, 2007](#)). In *Culex tarsalis*, tutti e quattro geni *Vtg* sono trascrizionalmente espressi e non sono pseudogeni ([Provost-Javier et al., 2010](#)). Inoltre, i geni *Vtg* di *Culex*, *Aedes* e *Ochlerotatus*, non ripetuti in tandem, sono figli di una possibile conversione genica, piuttosto che di un crossover ineguale. Un esempio di evoluzione concertata è evidente in *Anopheles gambiae* dove, a causa di un crossover ineguale, i geni *Vtg* mostrano una organizzazione ripetuta in tandem ("testa-coda") e una conservazione di sequenza elevata ([Chen S. et Al., 2010](#)). In seguito alla duplicazione, la copia del gene duplicato può avere destini diversi, come la perdita di funzione attraverso la formazione dello pseudogene o la diversificazione della funzione del gene acquistando nuove funzioni ([Prince et al., 2002](#); [Long et al., 2003](#)). Tuttavia i geni *Vtg* invece di subire una divergenza di sequenza possono guadagnare nuove funzioni semplicemente alterando il pattern di espressione trascrizionale. Nelle api, la VTG è espressa nelle caste immature delle operaie e dei maschi ed è associata a una varietà di comportamenti sociali ([Amdam et al., 2004](#); [Guidugli et al., 2005](#); [Nelson et Al., 2007](#)). Le proteine VTG hanno importanti attività antiossidanti e prolungano la durata della vita delle api e di *C. elegans* ([Nakamura et al., 1999](#); [Seehuus et al., 2006](#)). In *Cx. tarsalis*, VTG1b è espressa non solo nella femmina adulta, ma la sua espressione è costitutiva durante le fasi di sviluppo larvale e pupale, mentre VTG1a, VTG2a e VTG2b sono espresse esclusivamente nella fase adulta ([Provost-Javier et al., 2010](#)).

Per quanto riguarda i molluschi, poiché l'interesse per questo taxon è sorto solo di recente, le conoscenze sulla vitellogenina sono piuttosto ridotte; tuttavia, sono stati ultimamente sequenziati diversi geni della VTG come nel gasteropode *Haliotis discus hannai* (Matsumoto et al., 2008) e in altri bivalvi tra cui l'Ostrica del Pacifico *Crassostrea gigas* (Matsumoto et al., 2003), la conchiglia dentellata *Patiopecten yessoensis* (Osada et al., 2004) e nel mitilo marino *Mytilus edulis* (Puinean et al., 2006). Per quanto riguarda le identità di sequenza mediante allineamenti dei geni si è visto che la sequenza aminoacidica della VTG dedotta di *Haliotis* condivide il 25% di identità con una regione della VTG di *C. gigas*, il 27% con una regione di *P. yessoensis* e il 20% con le regioni rispettivamente *C. elegans* e il gamberetto Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* (Tsutui et al., 2000). Nei bivalvi come *C. gigas* la VTG condivide invece il 35% di identità con una regione di *P. yessoensis*, il 21% con la VIT-5 di *C. elegans* e il 28% con la VTG di Kuruma Prawn. Per *Mytilus edulis*, invece, un tratto di sequenza di 713 nucleotidi di cDNA *Vtg* è stato allineato da Puinean (2006) con le sequenze di cDNA *Vtg* di *C. gigas* e *P. yessoensis*. In seguito all'allineamento delle sequenze geniche, in particolare con il cDNA di *C. gigas*, si è visto che i 713 nucleotidi di *M. edulis* corrispondono agli aminoacidi 39-276 del cDNA *Vtg* di *C. gigas*. La sequenza aminoacidica dedotta della VTG fa parte di una zona conservata ovvero del dominio N-terminale della lipoproteina, caratteristico di una proteina della famiglia che lega i lipidi. Mentre nella maggior parte degli invertebrati quali anellidi, molluschi poco si sa circa la struttura della VTG, negli insetti, invece, a causa anche di un interesse di natura commerciale, le conoscenze sulla VTG sono ben documentate. Le descrizioni biochimiche e biomolecolari della VTG che seguiranno sono state ricavate dagli insetti come riferimento per altri taxa come ad esempio i molluschi. Le VGT degli insetti hanno anche mostrato di essere omologhe alle VTG di altri organismi così diversi quali nematodi e vertebrati (Blumenthal e Zucker-Aprison, 1987; Trewitt et al, 1992; Chen J.S. et al, 1994). I geni *Vtg* degli insetti sono grandi e specificano un unico trascritto mRNA di 6-7-kb e il loro numero varia nelle diverse specie di insetti (Tufail et al., 2005). Le VTG di insetto sono fosfolipoglicoproteine sintetizzate come precursori di circa 200-kD derivate da un mRNA *Vtg* di 6-7-kb. Il precursore primario subisce taglio proteolitico da parte di una endoproteasi dibasica dividendolo in subunità di grandi (140-190-kD) e piccole (40-60-kD) dimensioni (Tufail et al., 2005). Queste subunità sono assemblate e secrete nella emolinfa come grandi proteine oligomeriche ad alto peso molecolare (400-600-KD) (Della Cioppa e Engelmann, 1987). La VTG generalmente è presente sottoforma di dimeri, ma sono note molecole monomeriche di circa 300-kD in *Nauphoeta cinerea* (Imboden et al., 1987). Tuttavia, negli scarafaggi, in aggiunta alla subunità piccole e grandi, il precursore della VTG è scisso in polipeptidi di dimensioni medie di circa 90-110 kD (Tufail et al, 2001, 2007; Tufail e Takeda, 2002). A volte, le VTG sono poi processate nell'ovario come riportato in *Leucophaea maderae* (Tufail e Takeda, 2002). La funzione delle vitelline oligomerizzate degli insetti potrebbe essere quella di legare i lipidi, in cui sono racchiusi gli steroidi inattivi. Gli steroidi vengono poi rilasciati dalle vitelline subendo proteolisi durante l'embriogenesi (Hagedorn et al, 1998; Giorgi et al, 1999). La caratteristica più sorprendente delle VTG di insetto è l'esistenza di tratti di poliserina, presenti ad entrambi gli estremi della proteina e conservati al N-terminale di tutte le vitellogenine sequenziate, che potrebbero essere utilizzati come buoni siti di fosforilazione (Tufail M. et Al., 2008). In *L. maderae*, ad esempio, è stato rilevato che la fosforilazione della VTG avviene nel reticolo endoplasmatico delle cellule del corpo grasso appena prima della sua secrezione nella emolinfa (Della Cioppa e Engelmann, 1987). Il tratto di fosfoserina mostra concentrazioni elevate di cariche negative (Goulas et al., 1996), che possono promuovere la solubilità della VTG (Gerber-Huber et al., 1987) o la chelazione degli ioni metallici essenziali come Ca²⁺ e Fe³⁺ (Taborsky, 1991). La defosforilazione della VTG (Miller et al. 1982; Dhadialla et al. 1992) riduce il suo assorbimento da parte degli ovociti, suggerendo che i residui fosforilati possono contribuire nella interazione tra la vitellogenina e il suo recettore presente sulla superficie dell'ovocita. In tutti gli insetti, il prodotto primario del gene *Vtg* viene scisso a livello di un sito consenso di clivaggio R/K) XX (R/K, da una endoproteasi subtilisina-simile (Barr, 1991; Rouille et al, 1995). Questo motivo tetra-residuo si trova conservato presso la regione N-terminale della

maggior parte delle VTG ed è fiancheggiato dai domini di poliserina che caratterizzano la fosvitina (Tufail et al., 2008). Tuttavia, analogamente alle altre VTG di invertebrati, la VTG del gasteropode abalone *Haliotis discus hannai* (Matsumoto et al., 2008) e dei molluschi in generale sono prive del motivo della fosvitina presente in molti vertebrati e insetti. A ciò si aggiunge che la sequenza del mRNA VTG nell'ostrica del Pacifico *Crassostrea gigas* (Matsumoto et al., 2003) ha mostrato di essere simile alla Vtg di altri molluschi, pesci, crostacei e nematodi, specialmente nella regione N-terminale. La parte C-terminale della VTG di tutti gli insetti ha rivelato un alto grado di conservazione di residui di cisteina a 9 posizioni successive al motivo GL/ICG. Un motivo simile, ma leggermente più lungo (TCGLCG) è stato riconosciuto nelle VTG dei vertebrati (Mouchel et al., 1996). In aggiunta, un motivo DGXR è situato a 17-19 residui a monte del motivo GL/ICG in quasi tutte le sequenze VTG di insetto (Tufail et al., 2008). È stato proposto in precedenza che i residui DG (motivo di DGXR) insieme con il motivo GL/ICG e i residui di cisteina in posizioni conservate potrebbero formare una struttura necessaria per il corretto funzionamento delle vitelline durante l'embriogenesi (Tufail et al., 2001). Inoltre, alcuni residui di aminoacidi come Asp e Asn (acidi), Pro (idrofobi) e Tyr (idrofilo) sono altamente conservati presso il C-terminale di quasi tutte le VTG anche se il loro ruolo specifico in questa posizione non è chiaro (Tufail et al., 2008). La vitellogenina viene sintetizzata sui ribosomi associati al reticolo endoplasmatico rugoso, trasferita all'apparato Golgi, e infine impacchettata nei granuli di secrezione che emergono dal reticolo trans Golgi (Mazzini et al., 1989; Snigirevskaya et al., 1997; Giorgi et al., 2005). Oltre al taglio proteolitico, le molecole VTG sono modificate co- e post-traduzionalmente per facilitare il trasporto di carboidrati, lipidi, solfati, e altri nutrienti nella emolinfa agli ovari (Raikhel e Dhadialla, 1992; Hagedorn et al., 1998; Giorgi et al., 1999; Tufail et al., 2005). Questi coniugati non solo sostengono l'embrione, ma sono in qualche modo coinvolti anche nella internalizzazione della VTG all'interno dell'ovocita (Giorgi et al., 1998; Tufail et al., 2005). In *Aedes aegypti*, la VTG è anche glicosilata, fosforilata, e solfatata (Bose e Raikhel, 1988; Dhadialla e Raikhel, 1990; Chen J.S. et al., 1994). In *Drosophila* è stata inoltre riscontrata una certa solfatazione della proteina; la marcatura radioattiva in vivo con solfato inorganico [³⁵S] è stata trovata in tutti e tre i polipeptidi del tuorlo (Baeuerle e Huttner, 1987; Huttner, 1988). Anche in *A. aegypti*, entrambi i prodotti di taglio risultavano solfatati (Dhadialla e Raikhel, 1990).

Negli invertebrati accanto agli studi biochimici molti ricercatori hanno ritenuto opportuno ampliare le conoscenze sulla VTG determinandone la sede di sintesi e il pathway metabolico utili, ad esempio, per gli studi sulla VTG come biomarker. Nel corso dei vari studi eseguiti lungo i vari taxa si è visto che la sede di sintesi della VTG non è unica e inoltre, nel caso degli invertebrati, sembra differire all'interno di uno stesso taxon. In molti animali, le VTG sono sintetizzate dai tessuti extraovarici come il fegato nei vertebrati (Wallace, 1985), intestino nei nematodi, corpo grasso (Sappington e Raikhel, 1998), cellule dell'intestino e ovari (Cabrera et al., 2009a) negli insetti (Sappington e Raikhel, 1998), l'epatopancreas nei crostacei decapodi (Wilder et al., 2002). Negli insetti in seguito alla secrezione nella emolinfa, le VTG sono assorbite dagli ovociti in accrescimento. L'assorbimento della VTG si realizza tramite il legame dei recettori di membrana (VgR) attraverso endocitosi mediata da recettore (Raikhel e Dhadialla, 1992; Sappington e Raikhel, 1998; Snigirevskaya e Raikhel, 2005). L'internalizzazione negli ovociti in accrescimento interessa anche altre proteine diverse dalla VTG come la lipoforina (Lp) (Machado et al., 1996), arylforina (Telfer, 1983), microvitellogenina (Kawooya et al., 1986), e diverse altre proteine specifiche del follicolo (Sato e Yamashita, 1991). L'accumulo delle VTG nelle vescicole rivestite negli ovociti di vermi e insetti, così come nei vertebrati, è mediata dai VgRs (recettori della vitellogenina) appartenenti alla famiglia LDLR (recettore delle lipoproteine a bassa densità) (Raikhel e Dhadialla, 1992; Sappington e Raikhel, 1998; Van Antwerpen et al., 2005). A livello evolutivo i LDLR sono stati trovati nelle specie che vanno da nematodi e insetti fino ai mammiferi. Molti LDLR imparentati sono impegnati nella endocitosi mediata da recettore delle lipoproteine (Goldstein e Brown, 1974; Herz et al., 1992). Le proteine LDLR, spesso codificate da distinti esoni nei geni corrispondenti, condividono domini modulari strutturalmente e funzionalmente ben definiti. In esse

si trovano sempre: un dominio avente ripetizioni di legame del ligando (LBRs) con sei residui di cisteina ciascuno, uno avente ripetizioni del fattore di crescita epidermico (EGF)-like con sei residui di cisteina ciascuno, un altro che presenta ripetizioni contenenti un motivo YWTD che formano un dominio β -elica (Springer, 1998), un singolo dominio transmembrana di ancoraggio del recettore sulla membrana plasmatica, e infine la regione citoplasmatica contenente almeno una copia della sequenza motivo NPXY per l'internalizzazione del recettore attraverso fossette rivestite (Goldstein et al, 1985. Chen W.J. et al., 1990). La VTG in circolo viene endocitata dagli ovociti dopo essere passata attraverso gli spazi tra le cellule follicolari (Telfer, 1961, 1965; Raikhel e Dhadialla, 1992). L'ormone giovanile (JH) stimola le cellule del follicolo a restringere e aprire gli spazi intercellulari attraverso cui la VTG penetra per accedere alla superficie dell'ovocita. Il restringimento è il risultato di una attivazione della pompa Na^+/K^+ -ATPasi in cui sono coinvolti il fosfatidilinositolo e la proteina chinasi C (Ilenchuk e Davey, 1987; Davey, 1993). In tutti gli insetti un segnale "diffusibile" passa attraverso le giunzioni gap dalle cellule follicolari all'ovocita, provocando l'inizio e il mantenimento attivo della endocitosi delle VTG (Anderson e Woodruff, 2001), e sistemi simili esistono per i rappresentanti di sei differenti ordini di insetti (Waksmonski e Woodruff, 2002). La molecola "segnale" è la calmodulina (CaM) (Brooks e Woodruff, 2004) che origina dalle cellule follicolari ed è necessaria per la stimolazione della fosfolipasi-C (PLC) che, a sua volta, converte PIP2 in IP3 e diacilglicerolo (DAG). IP3 causa la liberazione di Ca_{2+} che, insieme con DAG, stimola la fosfochinasi-C (PK-C) necessaria per l'assorbimento endocitotico della VTG. I VgRs dove la VTG si ancora sono localizzati sulla superficie dei componenti dell'ovocita in accrescimento. In seguito al legame, i complessi Vg/VgR si concentrano in fossette rivestite di clatrina che invaginano e si staccano via per formare le vescicole intracellulari rivestite. Queste vescicole poi trasportano la VTG a un endosoma, che dirige il successivo movimento intracellulare di entrambi Vg e VgR. L'acidificazione degli endosomi determina la dissociazione dei complessi Vg/VgR, seguita dal riciclaggio del recettore verso la superficie dell'ovocita e il trasferimento della VTG ai corpi maturi del tuorlo, dove essa è processata e depositata come vitellina per essere utilizzata durante lo sviluppo embrionale (Raikhel e Dhadialla, 1992; Sappington e Raikhel, 1998; Snigirevskaya e Raikhel, 2005).

Nei molluschi, invece, e in particolare nei bivalvi le sedi di sintesi e il pathway della VTG non sono stati ancora definiti con precisione. I ricercatori a seconda della specie su cui hanno effettuato la loro linea di ricerca sono a favore di una sintesi endogena, ovvero ovocitaria della VTG (Pipe, 1987a), altri invece sono a sostegno di una sintesi esogena ovvero extraovocitaria della VTG (Matsumoto et al., 2003; Osada et al., 2004; Matsumoto et al., 2008); tuttavia in seguito a ricerche continuate nel corso degli anni, gli stessi autori hanno finito per sostenere entrambi i tipi di sintesi. Studi ultrastrutturali su ovari e ovogenesi dei bivalvi sono stati effettuati per un numero relativamente piccolo di specie nei Pectinidae (Motavkine e Varaksine 1983; Lubet et al. 1987; Dorange e Le Penneec 1989), nei Mytilidae (Albertini 1985; Pipe 1987a, b; Herry e Le Penneec 1987) e Ostreidae (Gaulejac et al. 1995). In *Crassostrea virginica* (Eckelbarger et al., 1996), ad esempio, come per altre specie di bivalvi, il follicolo ovarico è una struttura semplice contenente solo ovociti in via di sviluppo e cellule follicolari ad essi associate. Ogni follicolo è delimitato da uno strato discontinuo di cellule mioepiteliali ed è immerso nel fluido emale che è contenuto all'interno di uno spazio emocelico. Non essendovi alcuna barriera efficace tra gli ovociti e l'emocele, quest'ultimo può servire come mezzo attraverso cui i prodotti di rifiuto e sostanze nutritive della emolinfa circolano rispettivamente da e all'ovario. Per comprendere il ruolo delle cellule follicolari nella vitellogenesi dei bivalvi è necessario fare prima una distinzione tra i distretti esogeni extraovocitari e endogeni; i primi hanno per sede di sintesi della VTG distretti quali ad esempio la ghiandola digestiva; i secondi hanno invece una sede di sintesi, sebbene extraovocitaria, tuttavia situata all'interno della gonade e data dalle cellule follicolari (intrafollicolare) e/o dalle cellule di riserva del connettivo (extrafollicolare). Gli ovari degli invertebrati spesso contengono cellule follicolari che sembrano coinvolte nella mobilitazione e/o sintesi dei precursori del vitello durante la ovogenesi (Wourms 1987). In altri invertebrati, è implicata solo una singola cellula follicolare. Al

contrario, i bivalvi contengono una varietà di cellule somatiche, sia all'interno sia all'esterno del follicolo ovarico che si ritiene giochino un ruolo importante nella nutrizione degli ovociti (Pipe 1987b; Mathieu e Lubet 1993). Gli ovari della maggior parte dei bivalvi esaminati, almeno durante l'ovogenesi iniziale, presentano diverse cellule follicolari associate ad ogni ovocita. In *Crassostrea virginica* (Eckelbarger et al., 1996), le cellule follicolari risiedono gli ovociti previtellogenici e i primi ovociti vitellogenici. Quando l'ovocita entra in vitellogenesi, in seguito all'aumento di volume, le cellule follicolari si ritirano dalla superficie dell'ovocita, mantenendo il contatto con la sola regione basale (Pipe, 1987a). Nella conchiglia dentellata *Pecten maximus*, una sola cella follicolare è associata a ciascun ovocita (Dorange e Le Penneec 1989) mentre nel pectinidae, *Patinopecten yessoensis*, e nel mitilo *Crenomytilus grayana*, le cellule follicolari circondano completamente gli ovociti che sono liberi nel lume del follicolo (Motavkine e Varaksine, 1983). Nel gamberetto *Kuruma Prawn* le analisi di ibridazione *in situ* hanno dimostrato che l'mRNA *Vtg* è localizzato nella ghiandola digestiva e nell'ovario (Tsutsui et al., 2000), mentre nel gasteropode *Haliotis discus hannai* (Matsumoto. T., et Al., 2008), il mRNA della *Vtg* è stato rilevato negli ovari, ovvero nelle cellule follicolari, ma non nella ghiandola digestiva; inoltre, analisi di microscopia elettronica hanno dimostrato che la sintesi della VTG in *Haliotis* avviene nelle cellule follicolari (Apisawetakan et al., 2001). La funzione delle cellule follicolari nell'ovario dei bivalvi non sono ancora chiare, anche se in queste specie l'ovario è considerato come la fonte unica di VTG e le cellule follicolari ne sono il sito di sintesi (Matsumoto et al., 2003; Osada et al., 2004). In *Mytilus edulis* (Pipe, 1987) durante i primi stadi di accrescimento l'ovocita è completamente circondato da un numero limitato di piccole cellule follicolari, estremamente eterogenee e pleomorfe, spesso caratterizzate dalla presenza di pseudopodi. Le cellule follicolari presentano un numero elevato di reticolo endoplasmatico rugoso (RER), numerosi mitocondri e gocce di lipidi. Tra le cellule follicolari e gli ovociti in accrescimento è possibile che si verifichi uno scambio di piccole molecole e ioni attraverso giunzioni gap. Nella conchiglia dentellata, *Patinopecten yessoensis* (Motavkine e Varaksine 1983) è stato inoltre ipotizzato che le cellule follicolari che circondano l'ovocita vitellogenico possono trasferirgli metaboliti tramite pinocitosi; nella stessa specie è stato anche rilevata la presenza del mRNA *Vtg* nelle cellule follicolari strettamente associate agli ovociti in crescita il che ha suggerito una sintesi eterosintetica della vitellogenina. Il mRNA *Vtg* è stato infatti rilevato nelle cellule follicolari all'interno del follicolo ovarico e a contatto con gli ovociti vitellogenici nella regione basale, suggerendo che nelle ostriche la VTG possa essere sintetizzata nelle cellule follicolari (Matsumoto et al., 2003) e successivamente trasferita all'ovocita senza la mediazione dell'emolinfa (Osada et al., 2003). La VTG sintetizzata nelle cellule follicolari sarebbe direttamente incorporata nell'ovocita in crescita per mezzo di fenomeni di endocitosi come evidenziato da Dorange e Le Penneec (1989) L'origine eterosintetica presuppone la presenza di giunzioni cellulari specializzate tra i due tipi cellulari che non sembrano però essere sempre presenti nei molluschi bivalvi il che suggerisce che il ruolo fisiologico delle cellule follicolari nei bivalvi possa variare da specie a specie (Eckelbarger et al., 1996). In *Loripes lucinalis*, ad esempio, le cellule del follicolo sono prive di organelli proteosintetici, ma sono ricche di lipidi e glicogeno che trasferiscono agli ovociti durante la vitellogenesi, mentre in *Pinna nobilis*, le cellule follicolari dell'ovario sono responsabili della fagocitosi e digestione intracellulare dei prodotti provenienti dagli ovociti in degenerazione, seguite dall'eventuale trasferimento dei precursori del tuorlo agli ovociti in accrescimento (Johnson e Le Penneec, 1994; Gaulejac et al. 1995). Nella conchiglia dentellata *Pecten maximus* (Dorange e Le Penneec, 1989) le cellule follicolari strettamente associate agli ovociti vitellogenici, presentano ampie cisterne di RER nel loro citoplasma, per cui potrebbero svolgere un ruolo non solo nella nutrizione degli ovociti, ma parteciperebbero anche nella formazione dell'involucro vitellino. Le cisterne di RER sono state riportate in molte cellule follicolari di bivalvi (Gaulejac et al. 1995), fatta eccezione per le cellule follicolari di *Crassostrea gigas* che contengono invece reticolo endoplasmatico liscio (Suzuki et al., 1992). Le cellule follicolari di *Crassostrea virginica* (Eckelbarger et al., 1996) non sembrano invece essere responsabili della produzione della VTG poiché rispetto ad altri bivalvi presentano un volume

piuttosto ridotto rispetto agli ovociti, sono basse di numero, presentano inoltre poca o nessuna attività endocitotica lungo l'interfaccia con l'ovocita e infine la loro associazione con gli ovociti in accrescimento è di solito limitata temporalmente (Eckelbarger et al., 1996). Nel bivalvo *Sphaerium striatinum* (Woods 1931) e nei gasteropodi *Lamellaria perspicua* (Renault 1965) e *Crepidula fornicata* (Silberzahn 1979) le cellule follicolari nelle quali si realizza la vitellogenesi sarebbero riassorbite direttamente nell'ovocita. All'ipotesi eterosintetica, si oppongono i risultati ottenuti in *Mytilus edulis* (Pipe, 1987a) e in *Crassostrea virginica* (Eckelbarger e Davis, 1996), che suggeriscono invece un'origine autosintetica per la VTG. In *Mytilus edulis* le analisi ultrastrutturali sono a favore di un'autosintesi della VTG in quanto si ritiene l'ovocita come l'unico sito responsabile della sintesi della vitellogenina; Pipe (1987a) mediante studi ultrastrutturali ha infatti evidenziato negli ovociti in via di sviluppo la formazione di un numero elevato di cisterne di reticolo endoplasmatico ruvido (RER) e di numerosi elementi di Golgi che sono a favore della formazione autosintetica di granuli proteici di vitello. In *Mytilus edulis* all'inizio dell'ovogenesi gli ovogoni primari sono situati, generalmente in piccoli gruppi, lungo la parete dei follicoli. Morfologicamente sono rappresentati da cellule strette, allungate, con un grande nucleo ovoidale. In seguito a divisione mitotica gli ovogoni primari danno origine agli ovogoni secondari che entrano nella prima divisione meiotica diventando ovociti primari. È allo stadio di diplotene della meiosi che gli ovociti iniziano a crescere e differenziarsi. È in questo stadio che si osserva il nucleolo, sottoforma di massa compatta, in stretto contatto con l'involucro della doppia membrana nucleare. Col progredire dell'accrescimento dell'ovocita, il grande nucleolo si separa dall'involucro nucleare e migra verso una posizione più centrale nella vescicola germinale. Nelle primissime fasi di crescita l'ovocita, in previtellogenesi, presenta nel suo citoplasma numerosi mitocondri e ribosomi e solo occasionali corpi di Golgi e alcuni elementi di RER che proliferano considerevolmente durante i primi stadi dell'accrescimento. La formazione dell'involucro vitellino avviene durante l'inizio della vitellogenesi dove gli organuli citoplasmatici proliferano considerevolmente; i RER, formano spire e ammassi elaborati durante gli stadi finali della vitellogenesi, spesso formando attorno ai granuli di vitello maturi i mitocondri. Ribosomi liberi, corpi di Golgi e cluster di piccoli mitocondri sono presenti estensivamente per tutto il citoplasma, e occasionalmente i peduncoli degli ovociti sono riempiti con una massa di piccoli mitocondri (Pipe, 1987a). Durante i primi stadi dello sviluppo l'ovocita è completamente circondato da un numero limitato di piccole cellule follicolari, estremamente eterogenee e pleomorfe, spesso dotate di estroflessioni simili a pseudopodi. Le cellule follicolari presentano grandi quantità di RER e numerosi mitocondri sono presenti nel citoplasma e occasionalmente le cellule sono dominate da gocce di lipidi. Tutte le ipotesi relative al coinvolgimento delle cellule follicolari nella sintesi della VTG sono state formulate in seguito ad osservazioni effettuate al TEM. Più recentemente, invece, l'eterosintesi è stata confermata grazie ad indagini biomolecolari (Matsumoto et al., 2008). Il risultato finale delle loro ricerche è stato di dover postulare in alcune specie di bivalvi entrambi i processi di autosintesi e eterosintesi. In molti invertebrati, la VTG è sintetizzata dagli ovociti mediante un processo autosintetico e/o eterosintetico dove sono coinvolte le cellule somatiche (Schechtman 1955; Wourms 1987). In *Crassostrea virginica* (Eckelbarger et al., 1996) la sintesi della vitellogenina è stata ipotizzata che si verifica attraverso entrambi i percorsi di autosintesi e eterosintesi. Gli ovociti infatti sono ricchi di organuli quali il complesso di Golgi e il RER in attiva sintesi proteica, e i materiali del tuorlo sembrano derivare dalla fusione di vescicole derivate dal Golgi in seguito alla interazione del Golgi con cisterne del RER. In *C. virginica* i precursori del tuorlo analogamente all'ovario dell'opistobranco *Spurilla neapolitana* (Eckelbarger e Blades-Eckelbarger 1989) sembra vengono trasferiti dalle cellule del tessuto vescicolare (VCT) agli ovociti attraverso l'emolinfa. La attività endocitotica nei molluschi bivalvi sembra essere minore rispetto ad altri molluschi, e l'attività è principalmente circoscritta alla regione basale dell'ovocita in cui la cellula è a contatto con l'emocele (Eckelbarger et al., 1996). Tuttavia, negli ovociti di *C. virginica* è stato osservato un numero relativamente piccolo di fossette endocitotiche, il che è sorprendente considerando il breve periodo durante il quale si verifica la vitellogenesi. In altri invertebrati in cui la vitellogenesi

avviene rapidamente, è stato osservato invece un elevato numero di quadri di endocitosi (Eckelbarger, 1994). È possibile che nelle specie come *C. virginica*, con uova ricche di vitello il trasferimento di questo materiale agli ovociti avvenga attraverso vie che coinvolgono non solo la endocitosi mediata da recettori. In *C. virginica* è dunque poco probabile ipotizzare che le cellule del follicolo ovarico fonte primaria della VTG, mentre è più probabile che le cellule VCT siano coinvolte nella sintesi della VTG; la vitellogenosi in questa specie avverrebbe dunque attraverso entrambi i processi, ovvero per autosintesi negli ovociti ed eterosintesi nelle cellule VCT. La VTG sarebbe trasferita dalle cellule VCT del connettivo che circondano i follicoli agli ovociti attraverso l'emolinfa (Eckelbarger et al., 1996). Nei bivalvi in generale la frazione di VTG non depositata negli ovociti in accrescimento generalmente si accumula nel plasma fino alla sua degradazione da parte di proteasi del plasma, con la conseguenza che i livelli di VTG possono rimanere alti nel plasma per del tempo, poiché le proteine vengono degradate lentamente (Denslow et al., 1999). Anche se non vi sono state prove dirette sulla sintesi di Vtg, l'ovocita dell'ostrica orientale, *Crassostrea virginica*, è ricca di organuli proteosinteticamente attivi e sembra incorporare in maniera eterosintetica i precursori a elevato peso molecolare nei loro ovociti dall'emocele, suggerendo che vitellogenosi possa avvenire attraverso un processo sia di autosintesi sia di eterosintesi (Eckelbarger e Davis, 1996; Osada et al, 2004). Nell'ostrica del Pacifico *Crassostrea gigas* (Matsumoto T., et Al., 2003) la sede di sintesi del mRNA VTG è stata rilevata nelle cellule follicolari strettamente associate agli ovociti in accrescimento, ma non nella ghiandola digestiva. Nella stessa specie studi di immunolocalizzazione della VTG hanno riportato una proteina femmina-specifica dall'emolinfa e una proteina ovarica ad essa strettamente correlata (Suzuki et al. 1992). La proteina simile alla VTG sembra essere sintetizzata all'interno dell'ovario e non in altri organi come i diverticoli digestivi o le cellule del tessuto connettivo. L'autosintesi della vitellogenina viene suggerita dalla presenza di organuli proteosintetici, in particolare un numero elevato di cisterne RER e di apparati di Golgi, all'interno degli ovociti. Tuttavia, la presenza della proteina simile alla vitellina nell'emolinfa contrasta l'idea dell'autosintesi suggerendo, oltre all'ovario, la possibilità che vi siano altre sedi di sintesi della vitellogenina (Suzuki et al. 1992). Nei molluschi scarse sono le informazioni relative ai meccanismi che controllano la sintesi della VTG. I dati finora raccolti indicano che la vitellogenosi è sotto il controllo sia degli estrogeni (E_2) sia di un neuropeptide (VPF) prodotto a livello del ganglio cerebrale pedale (Osada et al., 2003); E_2 , in particolare, funziona come il principale promotore della vitellogenosi in tutti i bivalvi finora analizzati quali *Crassostrea gigas* (Li et al. 1998b) e *Patinopecten yessoensis* (Osada et al, 2003), dove esercita la propria azione a livello gonadico (Li et al., 1998a; Osada et al., 2003). Esperimenti in vivo e in vitro mediante somministrazioni di E_2 hanno permesso di rilevare l'accumulo di vitellina all'interno dell'ovario, suggerendo che E_2 e l'ovario sono rispettivamente l'induttore e il luogo della regolazione di sintesi della VTG (Osada et al., 2003). Per quanto riguarda invece il neuropeptide prodotto a livello del ganglio cerebrale pedale è stato dimostrato che tale molecola è risultata stabile al calore, e resistente alla tripsina/chimotripsina, proprio come un tipico neuropeptide. Le indagini effettuate hanno, inoltre, evidenziato che questo fattore presenta analogie con un fattore che stimola la mitosi delle cellule germinali (GMSF) e ad un fattore mitogenico cerebrale (CMF) presente nei gangli cerebrali dei mitili (Mathieu et al., 1988) e delle patelle (Le Gall, et al., 1987). Tuttavia VPF sembra essere diverso dai GMSF e CMF del ganglio cerebrale perché VPF promuove la vitellogenosi nella conchiglia dentellata e non è stato dimostrato il suo effetto sulla mitosi goniale (Osada M. et al., 2003). In conclusione la vitellogenosi sembra essere sotto il controllo del sistema nervoso centrale e di altri sei steroidi E_2 prodotti dall'organismo. Negli ultimi anni notevoli sforzi sono stati fatti per comprendere i meccanismi di regolazione della vitellogenosi nei bivalvi; indagini sono state dunque condotte per caratterizzare il recettore degli estrogeni coinvolto nella vitellogenosi. Gagné et al. (2001) hanno dimostrato il legame dell'estrogeno nell'omogenato di gonade del mitilo d'acqua dolce, *Elliptio complanata*. È stato supposto che VPF potrebbe essere un regolatore che promuove la funzione di ER, poiché mostrava un aumento della sensibilità ad E_2 endogeno nell'ovario anche se sono necessarie ulteriori indagini

per capire se VPF è un regolatore che promuove la trascrizione del mRNA *Vtg* tramite i ER o la traduzione del mRNA *Vtg*. I recettori estrogeno-like sono stati recentemente caratterizzati nei gasteropodi (Thornton et al, 2003; Kajiwara et al, 2006) e cefalopodi (Keay et al., 2006) e le sequenze ER-like sono state identificate nei bivalvi (Puinean et al. , 2006). Ortologi del recettore degli estrogeni sono stati trovati anche nei rappresentanti dei principali gruppi di molluschi: *M. edulis* (Kishida et al., 2005), *C. gigas* (Matsumoto et al., 2007), *Aplysia californica* (Thornton et al., 2003) e *Octopus vulgaris* (Keay et al., 2006). Tuttavia per gli invertebrati, che rappresentano il 95% delle specie animali, le informazioni sugli effetti e i meccanismi di azione degli estrogeni sono scarsi rispetto a quelle disponibili nei vertebrati, data la complessità dei sistemi endocrini nei diversi phyla (Ohelmann et al, 2006; Porte et al., 2006). La immunoreattività ER-like è stata osservata da Dorange e Le Pennec ('89) nei nuclei sia dell'ovocita sia delle cellule follicolari di *Pecten maximus* ed è strettamente connessa con l'ovocita in vitellogenesi. Si è pensato che ER nell'ovocita media una funzione di promotore di E₂ sulla induzione del recettore della serotonina della superficie dell'ovocita (Osada et al., 1998). Gli xenoestrogeni hanno la proprietà di legarsi ai recettori degli estrogeni (ER) e di agire come fattori di trascrizione durante il legame agli ERE nel DNA, influenzando l'espressione genica (Soto et al., 2006). Tuttavia, gli estrogeni possono agire anche attraverso meccanismi di azione rapidi, 'non-genomici' che possono essere avviati sia a livello della membrana plasmatica sia nel citosol portando sia a effetti locali diretti (cambiamenti nei flussi di ioni) sia alla regolazione della trascrizione genica secondaria a favore di una attivazione di cascate di chinasi citosoliche (Levin, 2005; Vasudevan e Pfaff, 2007). I ER dei molluschi, anche se sono filogeneticamente raggruppati agli altri recettori steroidei, sembrano agire in modo diverso: si legano agli ERE, attivando così la trascrizione, ma si legano in modo diverso. In particolare, l'attività trascrizionale degli ER dei molluschi è costitutiva, e non è attivata dagli estrogeni. Poiché i ER non sembrano attivare la via genomica degli estrogeni nei molluschi, i meccanismi conservati, ovvero non genomici, che agiscono attraverso modalità di azione "alternative" sono i probabili candidati per questo ruolo (Keay et al., 2006). È stato dimostrato che l'espressione dei livelli del recettore degli estrogeni aumenta in presenza di estrogeni ambientali nei tessuti e pertanto tali recettori devono essere verosimilmente presenti in quei territori dove è stata rilevata la presenza del mRNA per la VTG. (Puinean et al., 2006).

CAPITOLO II

LA VITELLOGENINA COME BIOINDICATORE

Durante gli ultimi cinquant'anni quantità rilevanti di differenti composti chimici (xenobiotici) sono stati immessi nell'ambiente, sia sotto forma di erbicidi, insetticidi e fungicidi per aumentare la produttività agricola, sia come prodotto dei moderni processi industriali (Guillette et al., 1995; Danzo, 1997; Mosconi et al., 2002; Polzonetti-Magni et al., 2004). È stato dimostrato che alcuni xenobiotici possono alterare le normali funzioni endocrine, e conseguentemente lo sviluppo sia di individui di sesso maschile sia femminile con una diminuzione della fertilità o sterilità (Guillette et al., 1995; Danzo, 1997; Mosconi et al., 2002; Polzonetti-Magni et al., 2004). Alcuni xenobiotici sono stati identificati come estrogeni ambientali o xenoestrogeni (Ankley et al., 1998; Latonnellet al., 2002b): tali sostanze non necessariamente condividono una somiglianza strutturale con il 17 β -estradiolo, tuttavia evocano le stesse risposte probabilmente attraverso un meccanismo di azione comparabile (Zacharewski, 1997). Uno dei principali obiettivi della ricerca ecotossicologica è quello di identificare tali estrogeni presenti nell'ambiente, in particolare in quello acquatico, e di determinare i loro effetti sulla riproduzione degli animali in natura. La valutazione dello stato di stress di un determinato ambiente, per quanto riguarda la presenza di sostanze contaminanti, si può effettuare mediante svariate procedure, tra cui l'utilizzo di organismi che fungano da bioindicatori e sui quali nel tempo vengano valutati parametri biologici e biochimici (biomonitoraggio) (Focardi e Leonzio 2000). I biomarkers possono essere definiti come misurazioni dei fluidi corporei, cellule, o tessuti che indicano in termini biochimici o cellulari la presenza di contaminanti o l'ampiezza della risposta a tali contaminanti (Livingstone et al., 2000). Perciò, è plausibile distinguere tra i biomarkers di esposizione, ovvero quelli che indicano che l'organismo è stato esposto a contaminanti, e i biomarkers di effetto o biomarkers di stress, i quali indicano l'entità della risposta dell'organismo al contaminante. Una delle più importanti caratteristiche dei biomarkers è che hanno il potenziale di anticipare i cambiamenti nei più alti livelli dell'organizzazione biologica, cioè, popolazioni, comunità, ecosistemi. Perciò, i biomarkers sono definiti come rapidi indicatori degli effetti biologici, dovuti ai contaminanti chimici, che si verificano più lentamente nel corso del tempo (Ortiz-Zarragoitia et al., 2006). Fra molti tipi di biomarker si possono ricordare: il citocromo P450 come indicatore dell'esposizione a contaminanti organici PAHs, PCB, etc; alterazioni del DNA dovute a mutageni inorganici o xenobiotici organici, inibizione dell'acetilcolinesterasi (AChE) (organofosfori, carbammine, Cd, Pb, Cu, etc), sintesi delle metallothioneine a livello epatico e in altri tessuti (esposizione a metalli pesanti Zn, Cu, Cd, Hg, Fe, etc), stimolazione enzimi antiossidanti (superossidodismutasi, catalasi, glutatione-transferasi) in seguito all'esposizione a ROS, radicali liberi, perossidazione lipidica), e la vitellogenina la cui produzione viene indotta da sostanze ad attività estrogenica (Valavanidis & Vlachogianni, 2010). Grazie alla loro capacità di accumulo di quantità misurabili di xenobiotici, i molluschi bivalvi comprendono specie spesso scelte come segnalatori ambientali (organismi indicatori o sentinella). Come già detto, questi animali sono filtratori e quindi pompano grandi volumi d'acqua concentrando molti elementi chimici nei loro tessuti; tali sostanze possono poi, in alcuni casi, venire propagate e amplificate attraverso la catena alimentare. Considerando poi che, in confronto a pesci e

crostacei, i bivalvi hanno un livello molto basso di attività dei sistemi enzimatici capaci di metabolizzare i contaminanti organici, le concentrazioni di tali inquinanti nei loro tessuti riproducono l'entità della contaminazione ambientale (Widdows e Donkin 1992). Tra i bivalvi, i mitili rappresentano un modello sperimentale per il biomonitoraggio particolarmente idoneo, poiché sono organismi sessili e filtratori, mostrano un'ampia distribuzione lungo le zone costiere del mondo, e hanno un'elevato potenziale di bioaccumulazione e un basso potenziale di biotrasformazione per i contaminanti organici e inorganici (Ortiz-Zarragoitia et al., 2006). Tra le specie più utilizzate vanno ricordate: *Mytilus galloprovincialis* (Pojana et al., 2007; Al-Subiai et al., 2011; Duarte et al., 2011) e *Mytilus edulis* (Gorinstein et al., 2006; Raftopoulou et al., 2010; Danellakis et al., 2011; Garmendia et al., 2011; Serafim et al., 2011). In queste specie in particolare sono state analizzate sia i cambiamenti a livello gonadico in animali che vivono in condizioni di stress ambientale sia in animali sottoposti in modo sperimentale all'azione di xenostrogeni. Queste sostanze appartengono a un vasto, gruppo eterogeneo di contaminanti ambientali che sono riconosciuti essere in grado di indurre cambiamenti nelle funzioni endocrine, e perciò sono chiamati prodotti chimici di distruzione endocrina. Tra i composti estrogenici, gli estrogeni naturali steroidei [17 β -estradiol (E2), estrone, estriolo] e i prodotti chimici sintetici, come pesticidi, bisfenoli policlorurati (PCB) sono largamente presenti negli ecosistemi acquatici. Le maggiori fonti di contaminazione sono dovute soprattutto alle acque di scarico municipali e industriali, pratiche agricole, e acque di scolaratura di trattamento degli stabilimenti (STP). I composti estrogenici agiscono impedendo il legame ormonale con i recettori di ormone o con il legame di specifici recettori di ormone, imitando l'azione degli estrogeni endogeni (Soto et al., 1995). Nell'ultimo caso, essi possono indurre una risposta ormone-dipendente, come la sintesi di VTG che si dimostra un ottimo biomarker per lo stato di stress ambientale. I livelli di VTG generalmente aumentano in femmine sessualmente mature, ma sono più bassi nelle giovani e introvabili nei maschi. Nel caso più recente, il gene *Vtg* è normalmente silente, ma i maschi possono sintetizzare e secernere VTG in risposta a estrogeni o a sostanze simili agli estrogeni (Jackson et al., 1977; Flouriot et al., 1995; Palmer e Palmer, 1995). Perciò, la presenza di VTG per lo più nel sangue di femmine immature e dei maschi, è stata proposta come biomarker utile per determinare lo stato di contaminazione estrogenica nell'ambiente acquatico (Sumpter and Jobling, 1995; Marin et al., 2004). Alcune analisi dirette e indirette sono state sviluppate per valutare i livelli di VTG in fegato e plasma di pesce, come pure in emolinfa e gonadi di bivalvi. Analisi dirette, come ELISA, RIA, Western blot, e analisi basate su anticorpi o di espressione del gene sono generalmente riconosciute come più specifiche e sensibili degli altri metodi (Heppel et al., 1995; Gagné e Blaise, 1998; Monteverdi e Di Giulio, 1999; Solé et al., 2000b; Hemmer et al., 2002; Gagné et al., 2005b). Tuttavia, esse sono costose, richiedono tempo e livelli alti di abilità e tecnologia. Inoltre, sebbene sono disponibili anticorpi anti VTG-specifici e sequenze del gene *Vtg* per alcune specie di pesce, questo non è così per i bivalvi. Di fatti, sono stati ottenuti solo alcuni anticorpi specie-specifici nei bivalvi (Suzuki et al., 1992; Osada et al., 2003). Nei metodi diretti quali l'analisi di gel elettroforesi la VTG nei bivalvi si presenta nell'ovario come due bande principali, così determinate con gel elettroforesi denaturante (Won et al., 2005). Dal momento che analisi specifiche sono ancora mancanti in alcuni casi, nei bivalvi come in altri invertebrati la presenza dei distruttori endocrini spesso richiede l'uso di metodi indiretti che, sebbene "generici", quantizzano indirettamente la proteina d'interesse mediante la misurazione dei gruppi fosfato, carboidrato, calcio, steroidi, ubiquitinazione e contenuti lipidici aggiunti post-traduzionalmente e rilasciati in seguito a un trattamento chimico. Tra questi va ricordato l'analisi ALP (fosfati alcali-labile) nella quale i fosfati vengono rilasciati dalle proteine a cui sono legati in seguito a trattamento con alcali (Blaise et al., 1999). Nei bivalvi, almeno per loro, il numero di aminoacidi (serina e tirosina) soggetti a fosforilazione è circa 2–3 volte più alto del rapporto di base rispetto agli aminoacidi fosforilati nei tessuti che teoricamente giustificano l'uso del metodo della fosfato alcali-labile per misurare i relativi livelli di proteine di tuorlo di uovo (Byrne et al., 1989). Apparentemente, la VTG negli invertebrati manca di una parte della fosvitina, presente nei vertebrati, il che spiegherebbe non solo i loro livelli più bassi di contenuto di fosfato,

ma anche la maggiore suscettibilità al danno ossidativo delle proteine del tuorlo d'uovo negli invertebrati acquatici (Ishikawa et al., 2004). Di fatti, le analisi di risonanza di spin elettronica e degradazione di deossiribosio hanno rilevato che la fosvitina inibisce la formazione di radicali idrossilici dalla reazione di Fenton mediante la chelazione degli ioni $Fe_{(2+)}$. Perciò, la VTG degli invertebrati, priva di una parte della fosvitina, si presenta più suscettibile alle alterazioni ossidative come ad esempio la carbonilazione e forse la ubiquitinazione rispetto a quella dei vertebrati (Matozzo V., et Al., 2008). Perciò, il rilascio dei fosfati inorganici è considerato un biomarker di risposta agli estrogeni, sebbene essi non possono fornire una misura quantitativa delle concentrazioni delle VTG (Gagné et al., 2002). L'induzione di sintesi di VTG nei tessuti di maschio è stata già usata con successo come indicatore della presenza di xenoestrogeni nell'ambiente, in pesci (Hiramatsu et al., 2006; Orrego et al., 2006), bivalvi (Marin e Matozzo, 2004; Matozzo e Marin, 2005), granchi e altri crostacei (Martin-Diaz et al., 2004, 2005). IL metodo ALP è inoltre utile a dimostrare la presenza della vitellogenina in distretti diversi dall'emolinfa (Blaise et al., 1999) come la gonade (Aarab et al., 2004 e 2006) e la ghiandola digestiva (Ricciardi et al., 2008). Nella gonade bisogna tenere presente che, in accordo con l'idea che le proteine VTG-like sono femmina-specifica, nei mitili i livelli ALP dei maschi sono generalmente più bassi delle femmine (Aarab et al. 2004). Inoltre, i mitili sono più sensibili ai distruttori endocrini nei primissimi stadi di sviluppo della gonade (Ortiz-Zarragotia 2006). I mitili trattati con xenoestrogeni quando la loro gonade è all'inizio dell'accrescimento ovocitario presentano una diminuzione sia dello sviluppo delle gonadi sia dei livelli ALP al loro interno, mentre i mitili maturi sessualmente e prossimi al rilascio dei gameti, trattati con xenoestrogeni, presentano un aumento dello sviluppo della gonade insieme a livelli più elevati di ALP (Ortiz-Zarragotia 2006). È inoltre da considerare che la sensibilità e la modalità di risposta ai distruttori endocrini variano in base all'interazione tra la specie di bivalvo e il contaminante chimico in esame. Nelle femmine di *Mytilus edulis* esposte a NSO (Petrolio del Mar del Nord) i follicoli ovarici sono più grandi e più numerosi rispetto al controllo e presentano pochissime cellule del tessuto connettivo suggerendo dunque uno sviluppo più precoce della gonade. Quando gli stessi animali venivano esposti a NSO in combinazione con gli alchifenoli e PAH (Idrocarburi Policiclici Aromatici), le gonadi dei mitili mostravano numerosi follicoli ovarici in degenerazione, mentre il tessuto connettivo era molto lasso e conteneva numerosi emociti nella periferia dei follicoli. Nella gonade di entrambi i sessi livelli molto bassi di proteine simili alla VTG sono stati trovati negli animali di controllo o nei mitili esposti alla miscela NSO / alchilfenolo / PAH. Al contrario, le quantità di fosfoproteine erano significativamente (3-7 volte) più elevate nei maschi e nelle femmine esposte a NSO da solo che nella miscela NSO / alchilfenolo / PAH (Aarab et al., 2004). Nelle gonadi di *Mytilus edulis* esposti a bisfenolo, invece si osservava un aumento proteina vitellogenina-like in entrambi i sessi e una diminuzione degli ovociti. In questo caso sembra dunque che i livelli di proteina vitellogenina-like siano poco colpiti dal bisfenolo (Aarab et al., 2006). Nelle vongole *Tapes philippinarum* della laguna di Venezia, anche se il contenuto di VTG delle femmine era generalmente superiore a quello dei maschi, i livelli di VTG nell'emolinfa hanno mostrato tra maschi e femmine tendenze simili a variare. Inoltre, in *T. philippinarum* femmine, la variazione del contenuti VTG nella ghiandola digestiva era simile a quello osservato nella emolinfa, mentre nei maschi le variazioni suggerivano che le fasi di produzione VTG si alternavano a quelle di trasporto della VTG (Matozzo et al., 2007). Esposizione per 7 giorni della stessa specie a concentrazioni acquose subletali di NP causava aumenti significativi nei livelli di proteina VTG-like sia nell'emolinfa sia nella ghiandola digestiva dei maschi, mentre nessun cambiamento era osservato nelle femmine (Matozzo e Marin, 2005). La spiegazione è dovuto al fatto che *T. philippinarum* della Laguna di Venezia come altre specie di vongole raccolte nel mese di Giugno sono in una fase di pre-fecondazione (Marin et al., 2003), durante la quale i livelli più alti di VTG potrebbero presumibilmente essere rilevati nella emolinfa delle femmine (Blaise et al., 1999). Durante questa fase, i livelli di ormoni sessuali naturali, come E_2 , aumentano inducendo un aumento della concentrazione di proteina VTG-like nelle femmine. Pertanto, i livelli VTG-like normalmente superiori nelle femmine di *T. philippinarum*, rispetto ai

maschi possono nascondere gli effetti estrogenici del NP nelle femmine, diventando più evidenti nei maschi. Iniezione con NP e coprostanolo (un metabolita ridotto di colesterolo), ha anche fatto registrare un aumento significativo delle proteine VTG-like nella emolinfa della vongola sessualmente differenziata, *M. arenaria* (Blaise et al., 1999), e del mitilo sessualmente indifferenziato, *E. complanata* (Gagné et al., 2001b), mentre non è stata osservata nessuna induzione significativa di VTG nell'emolinfa di *Mytilus edulis* e di *Anodonta cygnea* dopo l'esposizione a E₂ (Riffeser e Hock, 2002). In questo ultimo studio, gli autori hanno suggerito che l'emolinfa non è il trasportatore delle proteine VTG-like nei bivalvi e che le proteine VTG-like nella emolinfa possono provenire dai prodotti di degradazione rilasciati dalle gonadi. Al contrario, altri risultati fanno pensare che l'emolinfa gioca davvero un ruolo importante nel trasporto di queste proteine nei molluschi bivalvi, come riportato per altre specie di bivalvi (Blaise et al., 1999; Gagné et al., 2001a, b). In studi di campo il mitilo d'acqua dolce *Elliptio complanata*, esposto ad acque di scarico contenenti xenoestrogeni, i livelli di proteina VTG-like aumentavano sia nell'emolinfa sia nelle gonadi dei mitili maschi e femmine, tuttavia l'intensità della risposta VTG nelle femmine era un poco più alta rispetto ai maschi, suggerendo che le femmine erano più sensibili agli estrogeni dei maschi (Gagné et al., 2001a). I *Mytilus galloprovincialis* maschi della laguna di Venezia raccolti durante il periodo riproduttivo mostravano livelli significativamente alti di proteina VTG-like nell'emolinfa, a differenza delle femmine raccolte dello stesso periodo che non mostravano aumenti significativi dei livelli di proteina VTG-like (Pampanin et al., 2005). Questo indica che gli xenoestrogeni erano presenti nell'area di studio e che i maschi erano più suscettibili ai contaminanti delle femmine in cui la vitellogenina è normalmente espressa durante la gametogenesi (Pampanin et al., 2005). In seguito a esposizione a BPA si è andati ad analizzare, mediante RT-PCR quantitativa, l'espressione delle sequenze geniche dei recettori ER₁ e ER₂ nella ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis*; per gli animali di controllo si è visto che entrambe le sequenze erano espresse costitutivamente nella ghiandola digestiva, con ER₁ mostrante una espressione basale più alta rispetto a ER₂. Nei campioni esposti, invece, il bisfenolo A (BPA) ha indotto una diminuzione significativa nella espressione di ER₁ a 15 ng/g (-54% rispetto ai controlli), mentre le altre concentrazioni sono stati inefficaci. Per ER₂ invece si è osservato un aumento di due volte della sua trascrizione a tutte le concentrazioni testate, risultando significativa ($p \leq 0,05$) alla concentrazione più bassa (3 ng/g). D'altro canto quando i mitili sono stati esposti a E₂, a concentrazioni in grado di influenzare l'espressione di altri geni nella ghiandola digestiva nelle stesse condizioni sperimentali, è stato osservato un leggero aumento nella quantità di entrambi i trascritti ER₁ e ER₂, significativo per MeER₁ a 1.35 ng/g (+27%, $p \leq 0,05$) e per ER₂ a 6,75 ng/g (+39%, $p \leq 0,05$), rispettivamente (Canesi et al., 2007a). Nel caso della gonade si è visto che l'esposizione di *Mytilus galloprovincialis* immaturi (Aprile 2008) a E₂, EE₂ ed EB risultava in un aumento significativo della espressione gonadica del mRNA ER₂ in tutte le dosi di esposizione, ad eccezione della dose più alta di E₂ (pari a 200 ng/l); inoltre, ad eccezione della dose più bassa di E₂ (5 ng/l), l'espressione del messaggero ER₂ è stata leggermente più elevata nei maschi rispetto alle femmine (Ciocan et al., 2010). Queste dosi di esposizione trovano inoltre conferma da un precedente lavoro di Puinean (2006) in cui l'estradiolo veniva assorbito dai mitili usando questo regime di esposizione. Risultati simili sono stati riportati dopo esposizione al nonifenolo in *Tapes philippinarum* (Matozzo e Marin, 2005) in cui si notava un maggiore effetto estrogenico nei maschi, mentre in *Dreissena polymorpha* esposti al trattamento delle acque reflue effluenti di lavoro sono stati osservati gravi effetti sul sistema endocrino (Quinn et al., 2004). I distruttori endocrini, oltre ad influenzare e modificare l'espressione genica come nel caso della VTG, sono inoltre in grado di determinare il differenziamento sessuale, come la femminizzazione dei gameti. In molte specie sentinella, tra cui i mitili, la femminizzazione si dimostra essere un biomarker di estrogenicità più specifico. Per esempio, quando i mitili *E. complanata* del fiume di Saint-Lawrence (Quebec, Canada) venivano esposti per lungo periodo a acque di scarico urbane ciò si traduceva in un aumento significativo del numero di femmine e di proteine Vg-like in entrambi i sessi (Blaise et al., 2003). Evidenze di mascolinizzazione sono state descritte invece nel mitilo marino *M. edulis*

raccolto in un porto in cui venivano scaricate acque reflue e in un cantiere navale. In seguito a contaminazione con idrocarburi poliaromatici, argento, coprostanolo e stagno i mitili maschi erano in sovrannumero rispetto alle femmine di due volte suggerendo un forte effetto di mascolinizzazione (Hellou et al., 2003). Questi studi suggeriscono che la proteina VTG-like può essere utilizzata come un valido biomarker (Matozzo et Al., 2008). L'esposizione continua o a lungo termine a queste sostanze chimiche estrogeniche può inoltre portare, oltre a effetti femminizzanti, addirittura a intersessualità nei bivalvi (Mori et al, 1969;. Blaise et al, 2003; Gagné et al, 2003 e 2005), con conseguenze sul mantenimento delle loro popolazioni. L'ermafroditismo nei mitili è stato segnalato con una prevalenza molto bassa, circa 1/1000 campioni. Tuttavia, a Urdaibai nel mese di marzo del 2004 durante una raccolta sono stati trovati quattro (26%) su 15 mitili complessivi che presentavano follicoli femminili contenenti gameti maschili, mentre gli altri mitili della stessa popolazione e dello stesso periodo erano chiaramente differenziati o maschi o femmine. Solo uno di quei mitili femmina contenente gameti maschili ha mostrato spermatociti e spermatidi chiaramente differenziati all'interno dei follicoli, mentre gli altri tre mitili presentavano cellule maschili nei follicoli femminili. Dunque nel corso dei campionamenti dei mitili dalle varie aree di raccolta in questione, un aumento del numero dei campioni da osservare istologicamente non può che essere utile data l'elevata prevalenza di mitili in intersesso trovata a Urdaibai. Un aumento dei campioni in intersesso può essere considerato un buon indice di esposizione dei mitili ai distruttori endocrini anti-estrogenici o androgenici (Caceres-Martinez e Figueras, 1998; Newell, 1989; Villalba, 1995; Ortiz-Zarragoitia et al., 2010).

CAPITOLO III

SCOPO DELLA TESI

Negli invertebrati così come in buona parte dei vertebrati la formazione dei granuli di vitello è una tappa rilevante nel differenziamento ovocitario. Dato negli ultimi anni il notevole interesse sugli invertebrati e sulla loro principale proteina del vitello, la VTG, nell'ambito di un progetto dipartimentale per valutare la possibilità di utilizzare i mitili quali specie sentinella per rilevare l'inquinamento nel Golfo di Napoli; ho intrapreso uno studio per caratterizzare i siti di sintesi della VTG e per valutare la possibilità di utilizzare la VTG come biomarker nel mitilo *Mytilus galloprovincialis*. Negli invertebrati e in modo particolare nei molluschi bivalvi la vitellogenesi, a differenza dei vertebrati, è un mondo in parte inesplorato e tuttora da definire. È proprio per questo che il mio lavoro di tesi è stato quello di determinare la sede di sintesi del relativo messaggero della vitellogenina e il pathway della stessa proteina in *Mytilus galloprovincialis* mediante studi eseguiti a livello biomolecolare e ultrastrutturale. Ho inoltre lavorato, sempre nella stessa specie, sui recettori degli estrogeni ed in particolare sull'espressione del loro messaggero nel tentativo di iniziare a delineare le modalità con cui gli estrogeni possono intervenire nella sintesi della VTG. Preliminarmente, ho ritenuto opportuno procedere ad analisi del ciclo riproduttivo durante l'intero arco dell'anno. L'espressione dei recettori degli estrogeni, insieme all'utilizzo di calcoli statistici mediante la misura dagli indici di condizione e gonadici, oltre che all'analisi istologica delle gonadi, sono stati inoltre utilizzati quali biomarker di inquinamento ambientale per fare un confronto tra i mitili prelevati dalla zona inquinata (Zona B) e non (Zona A).

CAPITOLO IV

IL MODELLO SPERIMENTALE: *Mytilus galloprovincialis*

Il mitilo *Mytilus galloprovincialis* è un mollusco appartenente alla famiglia dei Mytilidae e presenta una conchiglia costituita da due valve uguali in forma e grandezza, la cui chiusura è controllata da un muscolo adduttore. Da un incavo sul lato ventrale del piede viene rilasciata una secrezione viscosa che a contatto con l'acqua solidifica e origina i filamenti del bisso, costituiti da collagene e da particolari proteine di adesione che permettono al mitilo di aderire efficacemente a substrati duri. L'alimentazione e la respirazione avvengono grazie alle correnti d'acqua che attraversano l'apparato branchiale. Il cibo viene intrappolato dalle ciglia nelle branchie e poi trasportato alla bocca dove avviene un processo di selezione delle particelle alimentari, quelle non desiderate vengono eliminate all'esterno come pseudo-feci, mentre la restante parte viene ingerita.

I sessi sono separati nei mitili, ma non ci sono differenze morfologiche tra maschi e femmine. anche se spesso le gonadi femminili sono di colore arancione, e quelle maschili sono di color bianco. Tuttavia, il colore delle gonadi non può essere utilizzato per una corretta discriminazione sessuale in *M. galloprovincialis*, dato che i mantelli colorati di rosa e arancio sono stati trovati non solo nelle femmine, ma anche in circa il 30% dei maschi. Allo stesso modo circa il 30% delle femmine presenta i mantelli colorati bianco e giallo (Mikhailov et al., 1995). Nel corso la mia tesi di dottorato gli organi a cui ho rivolto attenzione per realizzare la mia linea di ricerca sulla vitellogenina sono stati la ghiandola digestiva e il mantello al cui interno si trovano le gonadi. La ghiandola digestiva dei molluschi è il centro principale per la regolazione del metabolismo poiché partecipa ai meccanismi di difesa immunitaria e di regolazione omeostatica del mezzo interno, così come ai processi di disintossicazione e eliminazione degli xenobiotici (Moore e Allen, 2002). La morfologia, struttura e funzionalità della ghiandola digestiva nei molluschi possono essere utilizzate per studiare l'attività metabolica dell'organismo. La ghiandola digestiva di *M. galloprovincialis* e di altri molluschi bivalvi marini è costituita da una serie di diverticoli che si collegano con lo stomaco tramite una sequenza di dotti. L'epitelio dei diverticoli digestivi è costituito da due principali tipi cellulari, le cellule colonnari digestive e le cellule piramidali basofile (Aarab et al., 2008; Dimitriadis et al., 2004; Owen 1972; Morton 1983). Le cellule digestive sono principalmente coinvolte nella digestione degli alimenti all'interno delle cellule; in esse è stata riscontrata l'esistenza di un sistema lisosomiale vacuolare ben sviluppato costituito prevalentemente da eterofagosomi, eterolisosomi e corpi residui, in accordo con la funzione di digestione intra-cellulari che sono chiamati a svolgere (Owen 1972, Morton 1983, Cajaraville et al. 1995, Lobo-da-Cunha 2000; Dimitriadis et al., 2004; Aarab et al., 2008). Le cellule basofile mostrano un reticolo endoplasmico altamente sviluppato e numerosi vacuoli per la produzione e la secrezione degli enzimi; si ritiene infatti che queste cellule siano responsabili della secrezione di enzimi digestivi che iniziano la digestione extracellulare delle particelle di cibo (Owen 1970, Morton 1983, Henry et al. 1991, Lobo-da-Cunha 1999; Aarab et al., 2008). Il mantello, nei molluschi bivalvi, viene definito come uno spazio anatomico laminare, di spessore variabile, circondato da un epitelio, che

comprende differenti tipi di cellule soggette a cambiamenti nella popolazione in seguito ai ritmi stagionali. Nei bivalvi marini e di acqua dolce, il tessuto del mantello è responsabile di una serie di funzioni specializzate, come la capacità sensoriale, la conservazione dei nutrienti, la direzione delle correnti di alimentazione, e la sintesi delle sostanze che partecipano alla mineralizzazione della conchiglia e la formazione della perla (Addadi e Weiner 1997; Checa 2000; Barik et al. 2004; Acosta-salmone e Southgate 2005). Inoltre, per quanto riguarda i Mytilidae il mantello funge come il mezzo principale per sostenere la gametogenesi (Lowe et al. 1981; Bayne et al. 1982). Nei mitili e in particolare in *Mytilus galloprovincialis*, il tessuto gonadico si estende infatti all'interno del tessuto connettivo del mantello (Lubet, 1959), al di sotto delle due valve, permettendo dunque una facile campionatura del tessuto. Finora, quella dei Mytilidae è l'unica famiglia di bivalvi in cui il tessuto del mantello favorisce lo sviluppo della gonade a scapito delle cellule staminali e delle riserve immagazzinate (Mourazos et al. 2001; Suacedo P.E., 2008).

Nel mantello dei Mytilidae, oltre alle cellule staminali si notano le cellule di deposito quali amebociti, le cellule connettivali vescicolari (VCT) e cellule adipogranulari (ADG) (Lozada e Reyes 1981; Peek e Gabbott 1989; Lubet e Mathieu 1990; Gabbott e Peek 1991; Mathieu e Lubet 1993; Mathieu et al. 1991; Mikhailov et al. 1996). Il mantello di *Mytilus galloprovincialis* ha due funzioni fisiologiche correlate: accumulo di sostanze di riserve nelle cellule VCT e ADG e sviluppo della gonade che invade il mantello, proliferando a spese del tessuto di riserva; Le cellule ADG sono composte principalmente da granuli di proteine, gocce di lipidi e glicogeno, mentre le cellule VCT formano una singola, larga, vescicola di deposito contenente solo glicogeno. Uno sviluppo stagionale inverso è stato descritto tra il ciclo del tessuto di riserva, specialmente del glicogeno, e il ciclo gametogenico (Pipe, 1987b; Suarez et al., 2005). I cicli delle cellule del tessuto connettivo vescicolare (VCT) e del tessuto adipogranulare (ADG) (Gabbott, 1976; Pipe, 1987b; Mathieu & Lubet, 1993) sono stati classificati in tre fasi ciascuna: Inizialmente vi sono poche cellule VCT vuote (Stadio 0) che incominciano a riempirsi di materiale e si accumulano tra i follicoli e verso l'epitelio del mantello (Stadio 1), ma non formano ancora un nastro continuo intorno ai follicoli (stadio 2) dove le cellule VCT sono riempite e circondano quasi completamente i follicoli. In maniera analoga, le cellule ADG inizialmente sono poche e si presentano prive di materiale (Stadio 0). Col procedere dell'accrescimento alcune cellule ADG sono caratterizzate dalla presenza di materiale e incominciano a formare una sorta di rete tra le cellule VCT (Stadio 1). Alla fine tutte le cellule ADG risultano caratterizzate dalla presenza di una cospicua quantità di materiale e hanno costituito una rete tra le cellule VCT (Stadio 2). Il volume occupato dai tessuti di deposito è massimale in estate e diminuisce durante l'autunno e l'inverno poiché le riserve di nutrienti sono utilizzate per sostenere lo sforzo riproduttivo (Lowe et al., 1982; Worrall e Widdows, 1984; Pipe, 1985, 1987b). Questa diminuzione continua fino alla prima emissione dei gameti in primavera. È stato proposto che gli ovociti si accrescano inizialmente a spese dei metaboliti liberati dalle cellule ADG e VCT (Lubet, 1959; Gabbott PA. 1976; Lowe et al., 1982; Pipe, 1987b; Mathieu & Lubet, 1993). Successivamente, quando questa fonte di metaboliti si è esaurita, la vitellogenesi può essere sostenuta direttamente dai metaboliti circolanti che hanno origine dalla trasformazione del cibo ingerito.

Il ciclo riproduttivo è determinato in risposta ad una serie di fattori sia endogeni sia esogeni, che possono variare in base all'area geografica ed alle differenti condizioni ambientali (Rodhouse et al., 1984, Seed & Suchanek 1992; Villalba 1995). I parametri più importanti che influenzano la riproduzione nei mitili sono la disponibilità di cibo e la temperatura (Lubet, 1981; Seed & Suchanek 1992; Pazos et al., 1997; Ceballos-Vazquez et al., 2000). La proporzione di tessuto germinale (follicolo) è variabile e dipende dalle fasi del ciclo riproduttivo (Lowe et al., 1982; Gabbott, 1983; Pipe, 1987b). Durante la crescita delle gonadi in *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*, il tessuto riproduttivo si espande e invade i tessuti molli della massa viscerale e i lobi del mantello (Field, 1922). Negli individui adulti, le cellule destinate alla riproduzione rappresentano mediamente il 59% del peso dei tessuti molli (Thompson, 1979), ma possono raggiungere il 95% del tessuto del mantello (Seed, 1969). La gametogenesi in *Mytilus galloprovincialis* è più o meno

sincrona tra i due sessi ed è stata differentemente suddivisa (Lubet 1959, Suarez et al. 2005; Duinker et al., 2008). Tra quelli proposti ho scelto di seguire quella proposta da Duinker, che ha suddiviso il ciclo oogenico in 4 stadi in cui si parte dallo Stadio 0 dove il mantello è dominato da tessuto di deposito e ha poco tessuto gonadico. Nelle prime fasi non può essere determinato il sesso. I follicoli femminili che possono essere riconosciuti hanno ovociti in fase previtellogena e i follicoli maschili hanno solo le prime fasi delle cellule spermatiche e nessun spermatozoo. Allo Stadio 1, invece, i follicoli sono riconoscibili e tutti gli individui sono più facilmente riconoscibili per il sesso. La maggior parte degli ovociti ha iniziato la vitellogenesi ed alcuni hanno già terminato l'accrescimento. Nei follicoli maschili le cellule immature occupano circa la metà del raggio del follicolo. Andando avanti nella crescita la gonade passa allo Stadio 2 dove la maggior parte degli ovociti, che sono ancora attaccati alle pareti del follicolo, sono in vitellogenesi avanzata con granuli di vitello e involucro vitellino ben visibili. Una minoranza degli ovociti sono già nel lume e hanno terminato l'accrescimento. I maschi hanno un numero elevato di spermatozoi, ma le cellule spermatiche immature, che formano almeno un quarto del raggio del follicolo, sono ancora abbondanti. La crescita va avanti fino a raggiungere lo Stadio 3 in cui la situazione della gonade è morfologicamente allo stadio 2, ma la percentuale di gameti che hanno terminato l'accrescimento nei follicoli è più alta e la percentuale di tessuto gonadico rispetto al tessuto di deposito è di solito più elevata. Nei mitili *M. galloprovincialis* del Mar Mediterraneo, lo sviluppo del tessuto della gonade inizia a Ottobre e la gametogenesi procede poi per tutto l'inverno. Alla fine dell'autunno vi è la prima deposizione dei gameti seguita da una seconda deposizione a inizio primavera. Entrambe le deposizioni sono definite parziali in quanto coinvolgono solamente una parte dei follicoli della gonade. Nel periodo tra le due emissioni nella gonade vi è dunque una emissione parziale dei gameti a cui fa seguito una rigenerazione di questi all'interno dello stesso follicolo o tra le cellule del tessuto di riserva dando così origine a nuovi follicoli in accrescimento. Verso la seconda metà del mese di Aprile nella gonade ha luogo una nuova e intensa gametogenesi che culminerà nella deposizione finale vera e propria delle uova a inizio Estate quando il mantello risulterà occupato principalmente dalle cellule dei tessuti di riserva fino alla fine di Settembre. (Crespo e Espinosa, 1990; Mancebo et al., 1992).

CAPITOLO V

MATERIALI E METODI

Animali

Circa 100 femmine nelle diverse fasi del ciclo riproduttivo (stadio 0, stadio 1, stadio 2, stadio 3, secondo Dunker et al 2008) dei mitili, *Mytilus galloprovincialis* sono stati raccolti nel Golfo di Napoli, gli ovari e le ghiandole digestive sono stati asportati con attrezzature di dissezione sterilizzate con RNasi-free. Per ciascun animale sono stati determinati la lunghezza totale della valva e quando è stato possibile il sesso la cui caratterizzazione, mediante analisi al M.O., è consistita nello schiacciamento su vetrino di un frammento di gonade a fresco. Le gonadi e le ghiandole digestive di *Mytilus galloprovincialis*, una volta prelevate, sono state in parte conservate a -80°C per le indagini di analisi di biologia molecolare, in parte fissate per indagini al microscopio ottico ed elettronico. Riguardo alla microscopia ottica, ovari e ghiandole digestive, una volta rimossi, sono stati fissati per 24 ore in soluzione Bouin e poi disidratati con una serie ascendente di etanolo. Sono stati effettuati poi due passaggi in xilene, a cui ha fatto seguito l'infiltrazione in xilene:paraffina nel rapporto 1:1, prima di includerli in cera di paraffina. Dopo il sezionamento dei blocchetti così ottenuti mediante microtomo le sezioni di 5-7 micron sono state distese su vetrini Superfrost Plus (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germania) per le indagini di ibridazione *in situ* e/o colorate con entrambe le colorazioni emallule di Mayer / eosina e tricromica di Mallory (Mazzi, 1977) per le osservazioni di routine.

RT-PCR

L'RNA totale (Tri-reagenti, Sigma) estratto da ovociti e ghiandola digestiva, è stato retrotrascritto utilizzando il kit SuperScript (Invitrogen). La reazione è stata condotta utilizzando oligo dT, secondo il protocollo della casa fornitrice. La preparazione dell'RNA è stato valutato con elettroforesi su gel di agarosio 1%.

Per amplificare il cDNA della VTG, abbiamo considerato la sequenza primer riportata da Puinean et al., (2006). Il primo filamento di cDNA (3 µl) è stato utilizzato come template nell'amplificazione di PCR (volume finale 25 µl). La miscela di reazione conteneva: 0,4 mM di ciascun primer, 1.5 unità di Taq DNA polimerasi (Invitrogen), 1x buffer PCR; 0,4 mM di dNTP e 1,5 mM buffer MgCl₂. Il settaggio termico della PCR è stato il seguente: 15 minuti a 95 °C, 40 cicli di 30 s a 95 °C, 1 min a 58 °C, 30 s a 72 °C; 7 minuti a 72 °C. Il prodotto PCR è stato corso elettroforeticamente su gel di agarosio al 2% e visualizzato mediante colorazione con bromuro etidio. La subunità ribosomiale 18S di *Mytilus* è stata utilizzata come controllo interno del cDNA.

Ibridazione in situ

Sono stati eseguiti esperimenti di ibridazione *in situ* per localizzare i messaggeri della VTG e dei recettori degli estrogeni (ER₁ e ER₂), utilizzando una sonda a RNA per rilevare il mRNA della VTG e sonde a cDNA per rilevare il mRNA dei recettori ER₁ e ER₂. Le sonde sono state ottenute come di seguito descritto:

Sintesi della sonda a RNA per la VTG

Il plasmide ricombinante, contenente la parziale sequenza codificante la VTG di *Mytilus edulis* è stato gentilmente concesso dalla professoressa Corina Ciocan. Grazie alla collaborazione delle prof.sse Rosanna del Gaudio e Serena Aceto il plasmide è stato processato fino alla linearizzazione e utilizzato come template in una reazione di trascrizione *in vitro* (DIG RNA Labelling, Roche) utilizzando RNA polimerasi SP6 e T₇ e UTP-digossigenina al fine di ottenere sonde a RNA, antisenso e senso: la sonda antisenso è complementare all'RNA, la senso ha la stessa sequenza del messaggero. L'efficienza di sintesi è stata determinata mediante Spot Test.

Sintesi delle sonde a cDNA per i recettori degli estrogeni (ER1 e ER2)

Su cDNA estratto dalla gonade di *Mytilus galloprovincialis* sono state condotte delle PCR per i recettori degli estrogeni secondo il protocollo riportato in seguito; i prodotti di amplificazione sono stati eluiti e amplificati per PCR utilizzando dNTP marcati con digossigenina (Roche). I prodotti delle PCR sono stati corsi su gel di agarosio al 2% per stimarne la concentrazione, usando come riferimento la scala quantitativa 100 bp ladder (Fermentas)

Ibridazione in situ per rilevare l'm RNA per la VTG

Le parti di gonadi e ghiandole digestive fissate e incluse per la microscopia ottica, una volta tagliate in sezioni di 7 µm di spessore, sono state sparaffinate in histolemon e idratate con una serie a gradazione decrescente di alcool etilico. Le sezioni sono state pre-fissate in 4% di paraformaldeide in PBS (NaCl 250 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 80 mM, KH₂PO₄ 15 mM, pH 7.4), lavate in PBS e digerite con proteinasi K (10 µg/ml) in Tris-HCl 20 mM e EDTA 1 mM, pH 7.2; in seguito sono state post fissate in 4% paraformaldeide in PBS, lavate in 2X SSC (NaCl 3M, Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 300 mM) e tenute per almeno 30 minuti in un tampone Tris-glicina (Tris 100 mM, Glicina 100 mM). A questo punto le sezioni sono state pre-ibridate con 40% formammide dionizzata, 5x SSC, 1x Denhard's solution, 100 µg/ml DNA di spermatozoi di salmone, 100 µg/ml di tRNA e ibridate per tutta la notte in camera umida con la miscela di ibridazione, che differisce da quella della pre-ibridazione per la presenza della sonda a RNA (1 ng/µl) senso o antisenso marcata con digossigenina. La temperatura di ibridazione utilizzata è stata di 46°C. Le sezioni sono state lavate prima in 5x SSC e poi nella soluzione di post-ibridazione (0.5x SSC; 20% formammide deionizzata) per 3 ore a 60°C. Per rimuovere la sonda a singolo filamento è stata effettuata una digestione con ribonucleasi A (10 µg/ml) diluita in NTE (NaCl 500 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.0, EDTA 5 mM) a 37°C per 15 minuti e nella soluzione di post-ibridazione a 60°C per 30 minuti. Nei passaggi successivi, necessari per la rivelazione della sonda, le sezioni sono state incubate in 2% Blocking Solution (Roche) in acido maleico 100 mM pH 7.5 per 30 minuti e poi con un anticorpo anti-digossigenina coniugato a fosfatasi alcalina (Roche), diluito 1:5000 v/v in 2% Blocking Solution (Roche) in acido maleico 100 mM, pH 7.5, 10% v/v di siero normale di pecora (Sigma-Aldrich). Le sezioni sono state poi incubate con un substrato della fosfatasi alcalina, il BM Purple (Roche) in 0.1% Tween-20 e 0.5 mg/ml Levamisole. Dopo aver bloccato la reazione in 1 mM EDTA in PBS, le sezioni sono state contrastate con Nuclear Fast Red (Vector), montate in Acquovitrex (Carlo Erba) e osservate con un microscopio Axioskop (Carl Zeiss). Le immagini sono state ottenute utilizzando una videocamera AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) e acquistate con il software AxioVision 4.7 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Ibridazione in situ con cDNA per rilevare l'mRNA dei recettori degli estrogeni (ER₁ e ER₂)

Sezioni di 7 µm di spessore di ovari e ghiandole digestive di *Mytilus galloprovincialis* sono state sparaffinate in histolemon e idratate con una serie a gradazione decrescente di alcool etilico. Le

sezioni sono state pre-fissate in 4% di paraformaldeide in PBS (NaCl 250 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 80 mM, KH₂PO₄ 15 mM, pH 7.4), lavate in PBS e digerite con proteinasi K (10 µg/ml) in Tris-HCl 20 mM e EDTA 1 mM, pH 7.2; di seguito sono state post-fissate in 4% paraformaldeide in PBS, lavate in 2X SSC (NaCl 3M, Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 300 mM) e tenute per almeno 30 minuti in un tampone Tris-glicina (Tris 100 mM, Glicina 100 mM). A questo punto le sezioni sono state pre-ibridate con 40% formammide dionizzata, 5x SSC, 1x Denhard's solution, 100 µg/ml DNA di sperma di salmone, 100 µg/ml di tRNA e ibridate per tutta la notte in camera umida con la miscela di ibridazione, che differisce da quella della pre-ibridazione per la presenza della sonda a cDNA (1 ng/µl) marcata con digossigenina. Le temperatura di ibridazione utilizzate sono state di 48°C per entrambi i recettori (ER₁ e ER₂). Le sezioni sono state lavate in 2x SSC e formammide 50% per 30 minuti; è seguito poi un lavaggio in 1x SSC e formammide 50% per 30 minuti e in 0.5x SSC e formammide 50% per 15 minuti. Le sezioni sono state poi lavate in 2x SSC. A questo punto, i passaggi successivi, necessari per la rivelazione della sonda, sono stati eseguiti come descritto per l'ibridazione *in situ* con sonda a RNA.

Microscopia elettronica

Le gonadi di *Mytilus galloprovincialis* sono state fissate in glutaraldeide (3%) e saccarosio (7,5%) in soluzione tampone fosfato (PB) 0,1 M per 3 ore a temperatura ambiente. Dopo ripetuti lavaggi in tampone fosfato 0,1 M, i frammenti di gonade sono stati post-fissati in una soluzione di tetraossido di osmio all'1% in PB per 1 h a 4°C, cui è seguita la disidratazione effettuata in una serie a gradazione crescente di alcool etilico. È stato effettuato quindi un passaggio in ossido di propilene, cui è seguita l'infiltrazione in ossido di propilene : Epon in rapporto di 2:1, e poi 1:1 e infine Epon a temperatura ambiente per tutta la notte. I campioni sono stati quindi inclusi in apposite stampi e posti in stufa a 60°C per 72 h. La localizzazione dei campioni inclusi in Embed 812 è stata effettuata utilizzando un ultramicrotomo Reichert-Jung Supernova con il quale sono state ottenute le sezioni semisottili, di 2 µm di spessore, che sono state colorate con blu di toluidina 0.1%. Una volta localizzato, il materiale di interesse è stato selezionato e tagliato in sezioni ultrasottili, di 60-70 nm di spessore, che sono state raccolte su retini di rame. I retini con le relative ultrasottili sono stati sottoposti a colorazione con acetato di uranile e citrato di piombo. L'osservazione è stata effettuata al microscopio elettronico a trasmissione Philips CM12, presso il Centro Interdipartimentale di Servizio per la Microscopia Elettronica (C.I.S.M.E.) dell'Università degli Studi Napoli Federico II.

Analisi di espressione

Ulteriori informazioni sulla regolazione della sintesi della VTG sono venute da un indagine condotta per rilevare l'espressione dei messaggeri per i recettori degli estrogeni, che nei molluschi (Puinean et al., 2006; Ciocan et al., 2010) come nei vertebrati (Polzonetti et al., 2004; Prisco et al., 2008; Verderame e Limatola, 2010), intervengono nel controllo della sintesi della VTG. A questo scopo, retrotrascrivendo la medesima quantità di RNA totale (5 µg) per tutti i campioni in esame (gonadi degli stadi 1 e 2, e stadio 3 è stato ottenuto un cDNA che è stato amplificato con due coppie di primers specifici per ER₁ e ER₂ (Puinean et al., 2006). Per normalizzare i risultati della PCR abbiamo adoperato la subunità 18S dell'rRNA.

Estrazione di RNA

L'RNA totale è stato estratto da gonadi e ghiandola digestiva di femmine di *Mytilus galloprovincialis* raccolte in due zone del Golfo di Napoli (Castel dell'Ovo) classificate in base al diverso stato di salubrità ambientale: Zona A e Zona B. In particolare, ciascun campione è stato omogeneizzato in TRI REAGENT in un omogeneizzatore sterile, centrifugato a 12.000 g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato trasferito in un tubo da microcentrifuga. Per assicurare una

completa dissociazione dei complessi nucleo proteici, il campione è stato lasciato per 5 minuti a temperatura ambiente. Sono stati poi aggiunti 200 µl di cloroformio per ogni ml di TRI REAGENT utilizzato. Il campione è stato agitato vigorosamente per 15 secondi e lasciato poi per 15 minuti a temperatura ambiente. La miscela ottenuta è stata centrifugata a 12.000 g per 15 minuti a 4°C. La centrifugazione ha separato la miscela in tre fasi: una fase organica rossa (contenente proteine) e un interfase (contenente DNA) una fase acquosa superiore incolore (contenente RNA). La fase acquosa è stata recuperata e sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo per ogni ml di TRI REAGENT. Il campione è stato lasciato per 10 minuti a temperatura ambiente. Poi è stata eseguita la centrifugazione a 12.000 g per 10 minuti a 4°C. Rimosso il surnatante, l'RNA è stato lavato con 1 ml di etanolo 75° per ogni ml di TRI REAGENT usato. Il campione è stato agitato con vortex e poi centrifugato a 7.500 g per 5 minuti a 4°C. Il surnatante è stato eliminato e il precipitato di RNA è stato lasciato asciugare all'aria per 5-10 minuti. L'RNA è stato risospeso in 20 µl di acqua DEPC. La qualità dell'RNA è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio; la concentrazione e la purezza dell'RNA sono state stimate con la lettura allo spettrofotometro a 260 e 280 nm. Il campione risultante è stato conservato a -80°C.

Retrotrascrizione

Gli RNA ottenuti sono stati retro trascritti mediante SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Per ciascuna reazione, 5 µg di RNA totale è stato incubato con 1 µl di primer oligo-dT₁₂₋₁₈ (500 µg/ml), 1 µl di dNTP (10mM) e acqua fino a 12 µl per 5 minuti a 65°C. Dopo una breve centrifugazione, sono stati aggiunti 4 µl di 5x First-Strand Buffer, 2µl di DTT 0.1 M e 1µl di acqua RNasi-free; la miscela è stata incubata a 42°C per 2 minuti. È stato aggiunto 1 µl di SuperScript II RT e incubato a 42°C per 50 minuti. La reazione è stata inattivata mediante incubazione a 70°C per 15 minuti.

PCR

Il cDNA ottenuto è stato utilizzato come template in reazioni di PCR (*Polimerasi Chain Reaction*) volte a identificare le parziali sequenze codificanti per i recettori degli estrogeni (ER1 e ER2). Tali reazioni sono state condotte nel termociclatore 2720 dell'Applied Biosystem (Applied Biosystem). I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% e visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio. L'agarosio è stato sciolto in tampone TAE all'1% (Tris, acetato, EDTA), e riscaldato fino all'ebollizione. In seguito si è fatto raffreddare ed aggiunto il bromuro di etidio, agitato, e versato nel lettino della camera elettroforetica.

PCR per ER1:

Il cDNA di gonade di *Mytilus galloprovincialis* è stato amplificato mediante PCR utilizzando i seguenti primer: MeER_{1for}, 5'-TTACGAGAAGGTGTGCGTTT-3'; MeER_{1rev}, 5'-TTTTTCACCATAGGAAGGATATGT-3' (Puinean et al., 2006). La reazione di PCR è stata eseguita usando 10 pmoli di ogni primer, 1,5 unità di *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1x PCR buffer 0.2 mM di ogni dNTP e 1.5 mM MgCl₂. Il profilo termico di PCR utilizzato è il seguente:

95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
15'	30'	1'	30''	7'	∞
	40 cicli				

PCR per ER2:

Il cDNA di gonade di *Mytilus galloprovincialis* è stato amplificato mediante PCR utilizzando i seguenti primer: MeER_{2for}, 5'-GGAACACAAAGAAAAGAAAGGAAG-3'; MeER_{2rev}, 5'-ACAAATGTGTTCTGGATGGTG-3' (Puinean et al., 2006). La reazione di PCR è stata eseguita usando 10 pmoli di ogni primer, 1,5 unità di *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1x PCR buffer 0.2 mM di ogni dNTP e 1.5 mM MgCl₂. Il profilo termico di PCR utilizzato è il seguente:

95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
15'	30'	1'	30''	7'	∞
40 cicli					

PCR per rRNA 18s:

L'rRNA 18S della sub unità minore del ribosoma di *Mytilus* è stata usata come controllo interno del cDNA 18SrRNA_{for} 5'-GTGCTCTTGACTGAGTGTCTCG-3' e 18SrRNA_{rev} 5'-5'-CGAGGTCCTATTCCATTATTCC-3' (Puinean et al., 2006). La reazione di PCR è stata eseguita usando 10 pmoli di ogni primer, 1,5 unità di *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1x PCR buffer 0.2 mM di ogni dNTP e 1.5 mM MgCl₂. Il profilo termico di PCR utilizzato è il seguente:

95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
15'	30'	1'	30''	7'	∞
40 cicli					

Saggio TUNEL

Sulle sezioni di gonade sparaffinate e idratate con concentrazione di alcoli decrescenti il saggio TUNEL è stato così applicato: le sezioni per la permeabilizzazione sono state inizialmente incubate con proteinasi K 20µg/µl in Tris HCL 10mM pH 8.0 a temperatura ambiente per 20 minuti e poi sottoposte a tre lavaggi da 5 in TBS. Un vetrino come controllo positivo è stato trattato con DNasi 1µg/µl in TBS/MgSO₄ 1mM, seguono tre lavaggi da 5 minuti in TBS, le sezioni sono state incubate con H₂O₂ 3% in metanolo a temperatura ambiente per 5 minuti, poi sono seguiti tre lavaggi da 5 minuti in TBS e sono stati trattati con TdTEquilibration Buffer 1X (mix 20µl buffer 5X con 80µl di H₂O per vetrino) a temperatura ambiente per 20 minuti. Successivamente i vetrini sono trattati con TdT Labeling Reaction Mixture, che contiene TdTLabelingReaction Mix e l'enzima TdT. I controlli negativi sono stati ottenuti incubando le sezioni solo con TdT Labeling Reaction Mixture (omettendo l'enzima TdT): Le sezioni sono state coperte con Hybri-slips e incubate in camera umida a 37°C per 1,5h e sono state sottoposte a 3 lavaggi in TBS da 5 minuti, incubate con la Stop

Solution a temperatura ambiente per 5 minuti ed in seguito effettuati tre lavaggi in TBS. Per la rivelazione il tutto è stato incubato con Blocking Buffer a temperatura ambiente per 10 minuti e poi con Coniugato Streptavidina-Perossidasi diluito in Blocking Buffer in camera umida a temperatura ambiente per 30 minuti. A questo punto le sezioni sono state lavate in TBS (3x5'). La rivelazione è stata effettuata con una soluzione contenente DAB, H₂O₂ e urea a temperatura ambiente: si verifica così la precipitazione della DAB e lo sviluppo di colore. La reazione viene bloccata in H₂O distillata quando, controllando lo sviluppo della colorazione, lo si ritiene opportuno. Per fornire un contrasto i vetrini sono stati colorati con verde metile a temperatura ambiente per 3 minuti. Si è proceduto quindi all'osservazione al microscopio ottico.

Analisi di immunocitochimica

Le indagini di immunoistochimica sono stati effettuati su sezioni di 7 µm di gonadi e ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis* fissati in Bouin e inclusi in paraffina. Le sezioni sono state sparaffinate e idratate con una serie discendente di alcoli. Lo smascheramento antigenico è stato condotto mediante incubazione in tampone sodio citrato 10 mM pH 6.0 in microonde; le perossidasi endogene sono state inattivate mediante incubazione con H₂O₂ allo 0.5% in metanolo per 40 minuti a temperatura ambiente. Per bloccare i siti aspecifici, è stata effettuata un'incubazione di un'ora in Normal Goat Serum (Pierce). Le sezioni sono state incubate con gli anticorpi primari diluiti in Normal Goat Serum over-night a 4°C. È seguita l'incubazione per un'ora a temperatura ambiente con anticorpo secondario anti-rabbitbiotinilato di capra; si è poi effettuata un'incubazione con ABC (Avidina-Biotina Perossidasi Complex) per un'ora a temperatura ambiente. La rivelazione è stata effettuata con una soluzione contenente diaminobenzidina come cromogeno, che viene attivata immediatamente prima dell'uso con H₂O₂ allo 0,03%. I controlli negativi sono stati effettuati attraverso l'omissione degli anticorpi primari. Le sezioni sono state contrastate con l'emallume di Mayer e osservate con un microscopio Axioskop (Carl Zeiss). Le immagini sono state ottenute utilizzando una videocamera AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) e acquisite con il software AxioVision 4.7 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Analisi Biometriche

Per le osservazioni biometriche sono stati raccolti esemplari di *Mytilus galloprovincialis* in due siti differenti presenti a Castel dell'Ovo, zona A e zona B, due denominazioni legislative delle acque che esprimono diverse qualità delle stesse; nella prima la qualità delle acque è superiore, tale da consentire l'immissione dei mitili direttamente sul mercato senza che la fase della stabulazione venga effettuata; nella seconda, invece, è necessario il processo di stabulazione prima della vendita. Per ogni campione è stata effettuata la misura della lunghezza della valva e del peso secco (dopo 20h in stufa a 60 °C) della gonade e dell'intero tessuto molle dell'animale. Si è quindi passati al calcolo dell' degli indici di condizione (I.C.) e gonadico (I.G.) effettuando così un confronto tra le due zone.

Indice di condizione

L'indice di condizione (I.C.) è un parametro che dà un'indicazione dello stato di salute generale dell'animale; può variare in base a differenti fattori a diversi fattori come la dimensione del corpo (Baird, 1958), alla stagione (Dix and Ferguson, 1984), e alle condizioni ambientali, specialmente la disponibilità di cibo e il grado di esposizione all'aria (Baird, 1966; Seed, 1980). L'indice di condizione è stato determinato come il rapporto tra il peso secco totale (P_T) e il cubo della lunghezza della valva (L_V):

$$I.C. = P_t / (L_v)^3$$

Indice gonadico

L'indice gonadico è largamente utilizzato nella valutazione della crescita e della riproduzione degli invertebrati marini (Grant and Tyler, 1983), ed è il modo più facile ed efficiente per fare un'approssimazione iniziale dello stato dello sviluppo sessuale in un individuo.

Tale indice è stato calcolato come il rapporto tra il peso della gonade (P_g) ed il peso totale del tessuto molle dell'animale (P_t)

$$I.G. = P_g / P_t$$

CAPITOLO VI

Risultati

I risultati saranno presentati in tre sezioni distinte, la prima riguardante la descrizione del ciclo ovogenico di *M. galloprovincialis* così come è emerso dai prelievi effettuati durante i tre anni di dottorato; la seconda gli esperimenti effettuati per caratterizzare i siti di sintesi della vitellogenina e gli elementi che possono regolarne la sintesi, la terza sulle osservazioni effettuate per verificare se la VTG può essere considerata un valido bioindicatore per rilevare nei molluschi l'azione di distruttori endocrini presenti nell'ambiente, e conseguentemente per verificare se il mio modello sperimentale, *M. galloprovincialis*, possa essere considerato una valida specie sentinella per rilevare lo stato di inquinamento ambientale presente nel golfo di Napoli.

I Parte

Il ciclo ovogenico di *M. galloprovincialis* presente nel Golfo di Napoli

Le analisi della gonade in base alla classificazione degli stadi secondo [Duinker \(2008\)](#) nei vari mesi dell'anno hanno evidenziato che la gonade è allo stadio 0 (Duinker et al., 2008) con totale assenza di tessuto gonadico dalla fine di Giugno fino alla fine di Agosto (Fig. 1A). In questo periodo si è osservata una rapida rigenerazione delle cellule di riserva ADG e VTG del connettivo e un'assenza di tessuto gonadico. Nel periodo di Settembre sebbene nella gonade è stata ancora osservata una predominanza di cellule ADG e VCT del connettivo, tuttavia, si notano i primi raggruppamenti di ovogoni iniziali che danno origine ai primordi dei follicoli che sono insolitamente stati visti anche nei mesi Maggio e Giugno; i gameti sono dunque in previtellogenesi. Nel mese di Ottobre i gameti entrano nel periodo di vitellogenesi ed è in questo periodo che si notano le cellule follicolari osservate anche a Dicembre e Marzo. A inizio Ottobre la gonade è allo stadio 1 caratterizzato dalla presenza di un numero esiguo di ovociti che sono in vitellogenesi iniziale (Fig. 1B). Infatti sebbene il connettivo sia ancora abbondante e i follicoli sono ancora primitivi per forma e caratteristiche della parete, questi si sono accresciuti e contengono al loro interno adesi alla parete ovogoni, molti ovociti previtellogenicici e alcuni ovociti vitellogenicici. Alla fine di Ottobre la porzione gonadica aumenta ulteriormente a spese delle cellule del connettivo e i follicoli si accrescono in dimensione e gli ovociti in vitellogenesi aumentano notevolmente di numero. In questo periodo si dunque allo stadio 2 in cui gli ovociti sono in piena e/o tarda vitellogenesi. In questo periodo aumenta inoltre il numero di ovociti che hanno terminato l'accrescimento (Fig. 1C, 1D). A Dicembre la gonade è ormai allo stadio 3 in cui i follicoli hanno raggiunto la massima estensione fino ad occupare l'intera gonade ormai priva del tutto o quasi delle cellule ADG e VCT del connettivo (Fig. 1E). I follicoli hanno inoltre perso il loro aspetto primitivo e sono ricoperti da uno strato di cellule connettivali; gli ovociti hanno per la maggior parte terminato l'accrescimento e riempiono i follicoli assumendo una forma poligonale a causa del loro impaccamento (Fig. 1E). Da Dicembre a Maggio la gonade va incontro a ripetute ovulazioni per cui è possibile osservare durante tutti questi mesi il ripetersi più volte del ciclo precedentemente descritto. A Giugno la gonade presenta dei follicoli in stadio 0, una condizione che permane fino alla fine di Settembre

II Parte

Siti di sintesi della vitellogenina e sua regolazione

La ricerca dei siti di probabile sintesi della VTG è stata eseguita sia mediante ibridazione in situ sia mediante osservazioni condotte al TEM. Le osservazioni sono state condotte sulle gonadi nei differenti stadi di accrescimento e sulle ghiandole digestive prelevate dagli stessi animali in cui erano state prelevate le gonadi. In particolare, le ibridazioni sono state eseguite in due differenti fasi: la fase di accrescimento dei gameti, che si verifica durante gli stadi 1-2-inizio 3 del ciclo riproduttivo (Fig. 1D-E), e la fase di stasi che si verifica negli stadi 0 e 3 finale (Fig. 1F e 1A). In seguito ai risultati della ISH, è stata poi effettuata un'indagine al TEM per evidenziare l'assetto morfo-funzionale delle cellule follicolari e degli ovociti in accrescimento ovvero per ricercare la presenza di quadri morfologici che suggerissero la formazione dei globuli di vitello.

Localizzazione del mRNA per la VTG nei follicoli ovarici e nella ghiandola digestiva

La gonade in fase di vitellogenesi è caratterizzata dalla presenza di numerosi follicoli, intervallati da un numero considerevole di cellule connettivali adipogranulari (ADG) e vescicolari (VCT) (Fig. 2A). Nei follicoli sono altresì evidenti numerosi ovogoni e ovociti in differenti stadi di accrescimento (Fig. 2A). L'ibridazione in situ è stata condotta utilizzando una sonda a RNA ottenuta da un plasmide contenente una parziale sequenza del gene della VTG di *Mytilus edulis*, e le indagini di ISH eseguite sui follicoli ovarici hanno mostrato un forte segnale nel citoplasma degli ovociti e delle cellule follicolari, così come nelle cellule del tessuto connettivo situato tra i follicoli ovarici (Fig.2B). È da notare che negli ovociti il segnale è evidente in primo luogo negli ovociti nella fase iniziale di accrescimento (stadio 1) (Fig.3A), poi negli ovociti di forma ovoidale (Fig. 3A), e a forma di pera (Fig.3B) ed infine negli ovociti che hanno assunto il tipico aspetto piriforme (Fig. 3C, 3D) (stadio 2), all'interno dei quali il segnale è localizzato preferenzialmente nella parte basale degli ovociti, che risulta collegata alle trabecole del tessuto connettivo che delimitano la superficie più esterna dei follicoli ovarici (Fig. 3 C, D).

Un segnale forte è evidente anche all'interno delle cellule follicolari (Fig. 3 A, B, D), che in tali specie sono poche per ogni ovocita e non circondano completamente l'ovocita durante il suo accrescimento (Fig. 3A'-D '). Un segnale significativo è evidente anche a livello del tessuto connettivo, in particolare a livello delle cellule adipogranulari localizzate tra i follicoli durante gli stadi 1-2 (Fig. 2A). Nessun segnale è evidente a livello degli emociti (Fig.2B e negli ovociti che hanno terminato l'accrescimento (Fig.3E) così come nel tessuto connettivo allo stadio 3 (Fig. 3E) e nel controllo eseguito utilizzando una sonda senso (Fig.3F).

Infine, nessun segnale di ibridazione è rilevato nelle ghiandole digestive dopo gli esperimenti di ISH eseguiti con entrambi i riboprobe, senso (Fig. 4C) e antisenso marcati con digossigenina (Fig. 4 A, B), indipendentemente dalla organizzazione dei follicoli ovarici presenti all'interno della gonade femminile e conseguentemente del periodo del ciclo riproduttivo (stadi 0-3) dell'animale da cui era stato effettuato il prelievo.

Microscopia elettronica (TEM)

In seguito ai risultati della ISH, è stata effettuata un'indagine al TEM per evidenziare l'assetto morfo-funzionale delle cellule follicolari e degli ovociti in accrescimento. Le osservazioni effettuate hanno permesso di rilevare che, in primo luogo, gli ovociti all'inizio della crescita (stadio 0) hanno forma rotondeggiante e sono adesi strettamente alle trabecole del tessuto connettivo; gli organuli nell'ooplasma sono scarsamente rappresentati, e non è evidente nessun granulo secretorio, ovvero granulo di vitello. Ciascun ovocita è già associato alle cellule follicolari che sono caratterizzate da pochi organuli citoplasmatici (Fig5A). Negli ovociti che hanno una forma sferica o ovoidale e sono

ancora ancorati alle trabecole del tessuto connettivo (fase 1) (Fig. 5B), l'ooplasma risulta caratterizzato da granuli con una parte centrale densa agli elettroni che probabilmente rappresentano i primi granuli di vitello. Tali granuli sono associati ai complessi di Golgi e alle cisterne di RER. Con il procedere dell'accrescimento ovocitario (Fig.5C), la forma dell'ovocita risulta sempre più ovoidale e l'ooplasma è ora caratterizzato dalla presenza di numerose cisterne RER ed estesi complessi di Golgi circondati da granuli di vitello in formazione. Un materiale con la stessa densità agli elettroni dei granuli di vitello è inoltre evidente all'interno delle cisterne del RER e delle vescicole, cisterne e vacuoli associati ai complessi di Golgi. (Fig. 5C, e nel riquadro). Il citoplasma delle cellule follicolari annesse all'ovocita ha mostrato numerosi complessi Golgi e cisterne RER (Fig.5D, E). Nessuna attività di endocitosi è evidente lungo la superficie dell'ovocita (Fig.5C) e nelle zone in cui le membrane plasmatiche delle cellule follicolari e dell'ovocita corrono parallele (fig. 5 D, inserto). Come gli ovociti diventano pedunculati con la regione basale connessa alla parete del follicolo e la zona apicale che si proietta verso il lume del follicolo (Fig. 6A, B), l'ooplasma risulta caratterizzato da un numero sempre più rilevante di cisterne RER, complessi di Golgi e granuli di vitello connesse all'apparato di sintesi (Fig.6B). In particolare, i complessi di Golgi risultano caratterizzati dalla presenza di materiale denso agli elettroni presente anche all'interno delle cisterne, vescicole e vacuoli (Fig.6C). Nessuna attività endocitotica è stata riscontrata lungo la membrana plasmatica dell'ovocita, che corre parallela con quella delle cellule follicolari (Fig. 6D). Negli ovociti in vitellogenesi avanzata (inizio stadio 3), le cellule germinali femminili presentano la tipica forma pedunculata con la regione basale ancora collegata alla parete del follicolo (Fig.7A) e la regione apicale che sporge verso il lume del follicolo. Le cellule follicolari sono ancora evidenti lungo la superficie di questi ovociti (Fig. 7A, B) e nella regione basale (Fig. 7D, E). Il citoplasma delle cellule follicolari presenti nella regione apicale dell'ovocita mostra un esteso complesso Golgi e cisterne RER circondate da vescicole e vacuoli contenenti materiale denso agli elettroni (Fig. 7B). Lo stesso materiale è presente anche lungo la superficie delle cellule follicolari dislocato al di fuori (fig. 7A, B). Nella regione corticale dell'ovocita con la tipica forma a pera si possono osservare molte vescicole, presenti anche accanto ai vacuoli contenenti un materiale moderatamente denso agli elettroni (Fig. 7C). Al contrario, le cellule follicolari situate nella regione basale presentano pochi organuli nel loro citoplasma (Fig. 7D, E). La superficie dell'ovocita in tale regione, è caratterizzata da poche vescicole di endocitosi (Fig. 7E). Infine, è interessante notare che l'ooplasma presente nella regione basale presenta cisterne del RER e complessi del Golgi circondati da globuli di vitello (Fig. 7 D, E). Il citoplasma rimanente presente nella regione apicale contiene numerose placchette di vitello, gocce lipidiche, e pochi complessi di Golgi.

Analisi di espressione del mRNA per la VTG

I prodotti di amplificazione hanno dato un frammento di circa 130 bp (Fig.8). Un'analisi della sequenza nucleotidica ottenuta mediante BLAST (NCBI Data Bank) ha rilevato che il frammento in esame costituisce una parziale sequenza del gene per la VTG di *Mytilus*. L'espressione del gene della VTG è stata riscontrata solo negli animali le cui gonadi contenevano follicoli ovarici con ovociti in vitellogenesi (stadi 1-2) (Fig. 1C, 2A); nei follicoli ovarici contenenti ovociti allo stadio 0 (Fig. 1A) o nella fase 3, cioè con ovociti completamente accresciuti (Fig.1E) non è stata riscontrata alcuna espressione del gene della VTG. Nessun prodotto di PCR è stato riscontrato nelle ghiandole digestive esaminate indipendentemente dal tipo di follicoli ovarici presenti nella gonade femminile.

Localizzazione del mRNA per i recettori ER₁ e ER₂ nei follicoli ovarici e nella ghiandola digestiva

Le indagini di ibridazione *in situ*, effettuate per localizzare la presenza dei mRNA dei recettori ER₁ e ER₂ nella gonade e nella ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis*, hanno permesso di

evidenziare una variazione nell'espressione di tali recettori tra di loro e nelle due fasi prese in considerazione. In merito al recettore ER₁ nelle gonadi con follicoli ovarici i cui ovociti sono in vitellogenesi (stadi 1-inizio 3) la positività a ER₁ è stata riscontrata a livello delle cellule ADG e VCT, nonché all'interno dei follicoli ovarici e più precisamente all'interno delle cellule follicolari e nel citoplasma degli ovociti (Fig. 9A). Differentemente, negli ovociti in stato avanzato di vitellogenesi, non è stata riscontrata alcuna positività a livello ovocitario (Fig. 9A). Diversamente, nelle gonadi che contengono ovociti al termine dell'accrescimento (stadio 3) non è stata riscontrata alcuna positività (Fig. 9B). Le analisi di ibridazione *in situ* condotte sulla ghiandola digestiva non hanno evidenziato marcatura né nella fase di accrescimento (Fig. 9C) né in quella di stasi (Fig. 9D). I controlli non hanno mostrato alcuna marcatura (Fig. 9D, inserto).

Per quanto riguarda il recettore ER₂, a differenza di ER₁, le analisi di ibridazione *in situ* hanno evidenziato per ER₂ una distribuzione più ampia e sovrapponibile nelle due fasi prese in considerazione. Infatti, sia nelle gonadi con i follicoli ovarici in fase di accrescimento sia in quelle della fase di stasi, la positività ad ER₂ è stata riscontrata nel citoplasma degli ovociti in differenti fasi di vitellogenesi, nel citoplasma delle cellule accessorie ed infine anche nelle cellule ADG e VCT (Fig. 10A-B). Le analisi di ibridazione *in situ* condotte sulla ghiandola digestiva hanno evidenziato una positività ad ER₂ sia nella fase di accrescimento (Fig. 10C) sia in quella di stasi (Fig. 10D). I controlli non hanno mostrato alcuna marcatura (Fig. 10D, inserto).

Analisi di espressione per i recettori ER₁ e ER₂

I prodotti di amplificazione relativi ER₁ e ER₂ hanno mostrato due bande di 100 e 230 bp circa (Fig. 11). Dal sequenziamento di ciascun prodotto di amplificazione, è stato rilevato che effettivamente le bande di 100 e 230 bp corrispondono ai recettori ER₁ e ER₂ noti in *Mytilus galloprovincialis*. (Puinean et al., 2006) Indagini di analisi di espressione effettuate su ovari di esemplari prelevati nei mesi in crescita ovocitario hanno dimostrato che l'mRNA per ER₁ è presente in tutto il periodo con un livello di espressione elevato. Lo stesso tipo di recettore è invece assente durante la fase in cui l'accrescimento ovocitario è terminato (stadio 0 e 3). Per quanto concerne ER₂, la sua espressione risulta essere costante nei differenti momenti del ciclo riproduttivo con un lieve decremento nella fase di stasi. Dall'analisi elettroforetica appare inoltre evidente che, indipendentemente dal periodo in esame, l'espressione di ER₂ è maggiore di ER₁ quando essi sono co-espressi.

Immunocitochimica

La positività riscontrata non è stata specifica poiché, Non disponendo di un anticorpo anti-VTG di *Mytilus*, è stato utilizzato un anticorpo anti VTG di *Sparus*, pesce teleosteo e uno di *Podarcis*, rettile squamato, confidando nel fatto che le VTG degli invertebrati e dei vertebrati presentano un tratto molto simile della proteina localizzato nella regione N-terminale (Matsumoto et al., 2003). Purtroppo i risultati ottenuti non sono stati positivi dal momento che la positività è stata rilevato in tutte le cellule (Fig. 12) quindi il risultato è da considerarsi privo di specificità.

III Parte

I mitili come possibile specie sentinella

Differenti tipi di indagine sono stati effettuati per evidenziare se i mitili possono essere utilizzati come specie sentinella per rilevare l'inquinamento ambientale, soprattutto da xenoestrogeni. Tra i differenti parametri che sono stati valutati (I.C., I.G., TUNEL, espressione recettori ER) non è stato possibile valutare la VTG quale biomarcatore. Infatti, i metodi indiretti per valutare la presenza (metodo del dosaggio dei fosfati dopo trattamento con alcali) non ha dato alcun risultato.

Confronto fra zona A e B

L'indice di condizione dà un'indicazione dello stato generale di salute dell'animale, il suo valore medio (I.C.) è stato determinato per entrambe le zone, ed è risultato di 0.007 nella zona A di Castel dell'Ovo e di 0.004 nella zona B (Fig. 13); i valori medi degli indici gonadici (I.G.) la per la zona A e B sono risultati rispettivamente di 0,264 e 0.238 (Fig. 14). Le differenze degli I.C. e I.G. e delle loro deviazioni standard registrate sono statisticamente significative, come risulta dai valori di T-student registrati ($P < 0,05$). Un esame morfologico al MO delle gonadi dei mitili ha rilevato una differenza tra gli individui della zona A rispetto quelli della zona B: nella prima è stata riscontrata la presenza di numerosi follicoli (Fig. 15) rispetto a quelli presenti nella zona B (Fig. 16). Nei mitili di entrambe le zone A e B, inoltre, le osservazioni al TEM (Fig. 17) evidenziano che alcuni degli ovociti in degenerazione presentano gli aspetti che sono tipici delle cellule in apoptosi, come la frammentazione dei nuclei, la condensazione della cromatina, la suddivisione del citoplasma (Fig. 17). Il saggio TUNEL effettuato per rilevare quadri apoptotici ha messo in evidenza che sia negli animali della zona A sia in quelli della zona B sono presenti cellule positive (Fig. 18 e 19); tali cellule risultano localizzate lungo le pareti dei follicoli e sono rappresentate soprattutto da ovogoni e ovociti in pre-vitellogenesi. Tali quadri apoptotici sono molto più frequenti negli individui della zona B (fig. 20A) dove la positività della TUNEL si estende anche alle cellule del tessuto connettivale che circonda i follicoli (Fig. 20B).

Dall'analisi di espressione dei recettori per gli estrogeni (Fig. 21), inoltre, è risultata una differenza nell'espressione del gene ER_1 tra gli individui della zona A e quelli della zona B, dove la banda relativa al ER_1 risulta fortemente più marcata negli animali della zona B. Per il gene ER_2 , invece, la banda di espressione è risultata pressoché analoga in entrambe le zone. È interessante infine ricordare che tra tutti gli esemplari raccolti in questo ultimo anno nella zona B è stato riscontrato un caso di intersesso (Fig. 22). Un'indagine ultrastrutturale sulla gonadi di questo esemplare ha dimostrato che i gameti, maschili e femminili sono correttamente organizzati (Fig. 23) e che i differenti quadri di spermatogenesi e ovogenesi (Fig. 24) osservabili all'interno di uno stesso follicolo procedono in modo corretto, come d'altra parte suggerisce una organizzazione morfologica presentata dai gameti completamente differenziati (Fig. 25).

CAPITOLO VII

Discussione

Il ciclo gametogenico annuale degli esemplari di *Mytilus galloprovincialis* del Golfo di Napoli osservato è lo stesso di quello descritto da [Duinker \(2008\)](#). È possibile infatti osservare uno stadio 0, dove la gonade è in fase di stasi con abbondanza di cellule ADG e VCT di riserva e assenza di tessuto gonadico, a cui fanno seguito lo stadio 1 di previtellogenesi e lo stadio 2 di vitellogenesi. Segue, infine, lo stadio 3 in cui l'accrescimento della gonade è ormai completo e dato da follicoli con la massima estensione e impaccati al loro interno di gameti che hanno terminato l'accrescimento; inoltre, le cellule di deposito ADG e VCT sono pressoché assenti. Inoltre, tutti i periodi di emissione dei gameti osservati sono in piena conformità con quelli descritti da [Suarez \(2005\)](#). Infine, si notano nella gonade di alcuni periodi dell'anno dei follicoli che sono in uno stadio differente da quello atteso. È il caso, ad esempio, della gonade di Maggio dove in una gonade normalmente in fase di svuotamento si è notata la presenza di raggruppamenti di ovogoni iniziali che danno origine ai follicoli iniziali. Inoltre, sempre nel periodo di svuotamento, la gonade di alcuni mitili era, atipicamente, in piena gametogenesi. Ciò indica che nel ciclo di gametogenesi di *Mytilus galloprovincialis* ([Kundtz, nessuna data](#)) del Mar Mediterraneo, sebbene a ogni stadio di crescita corrisponde un periodo dell'anno ben definito, tuttavia gli stadi atipici osservati starebbero a indicare che la gametogenesi in questa specie del Mar Mediterraneo avviene tutto l'anno.

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi contribuiscono inoltre a definire in modo significativo sia i siti di sintesi della VTG in *Mytilus galloprovincialis* sia la possibilità che in *Mytilus*, come in altre specie, possa essere utilizzata come bioindicatore. Per quanto riguarda il primo punto, ovvero la ricerca dei siti di sintesi della VTG, i dati ottenuti nel presente lavoro di tesi sono indicativi del fatto che la sintesi di questa proteina avviene all'interno della gonade, più precisamente all'interno degli ovociti in accrescimento e nelle cellule follicolari ad essi associate, così come nelle cellule del connettivo in particolare nelle cellule ADG. Infatti le ibridazioni in situ, condotte utilizzando una sonda antisense costruita sul gene della *Vtg* di *Mytilus edulis*, hanno permesso di rilevare che gli mRNA per la VTG sono presenti nei suddetti tipi cellulari. Tali messaggeri sono assenti nei follicoli ovarici in cui l'accrescimento ovocitario è terminato, così come nelle cellule connettivali e infine nella ghiandola digestiva qualsiasi sia il momento funzionale della gonade. Questi risultati, in accordo con quanto evidenziato in altre specie di molluschi ([Matsumoto et al., 2003, 2008](#)) dimostrano che la sintesi della VTG avviene all'interno della gonade e non interessa altre strutture, come la ghiandola digestiva, che in altri invertebrati è risultata coinvolta nella sintesi della VTG ([Tsutsui et al., 2000](#)). Più precisamente, la sintesi della VTG, a livello gonadico interessa l'ovocita (sintesi endogena) e le cellule accessorie e connettivali (sintesi esogena). Per le cellule connettivali la marcatura delle cellule ADG del mRNA della VTG ha evidenziato un ruolo nella vitellogenesi per queste cellule. Infatti, alle cellule ADG e VCT di *Mytilus* è sempre stato attribuito il ruolo di accumulare materiale di riserva da distribuire all'ovocita nel corso del suo accrescimento ([Lowe et al., 1982; Pipe, 1987b; Saucedo et al., 2008; Duinker et al 2008](#)). La marcatura del mRNA della *Vtg* nelle cellule ADG e la sua assenza nel periodo di stasi della gonade evidenziano una sintesi della VTG in queste cellule, sebbene minoritaria quando paragonata a quella dell'ovocita, come già precedentemente suggerito per *Crassostrea virginica* ([Eckelbarger et al., 1996](#)), dove tuttavia sono coinvolte le cellule VCT. Nell'ovocita in particolare, la sintesi inizia negli ovociti che iniziano a modificare la propria forma e finisce per ridursi con il procedere dell'accrescimento ovocitario, quando gli ovociti hanno ormai assunto la tipica forma a pera. L'origine endogena della VTG è

confermata dalle osservazioni effettuate al TEM su ovociti in differenti fasi di accrescimento. Le cellule follicolari e gli ovociti nella fase iniziale di accrescimento sono caratterizzati infatti da un apparato di sintesi molto esteso: numerose cisterne di RER e apparato di Golgi a cui sono associate numerose vescicole sia nella faccia *cis* sia in quella *trans*. L'apparato di sintesi proteica è d'altraparte circondato da numerosi vacuoli con contenuto elettron-denso simili ai globuli di vitello che verosimilmente, come descritto in altre specie di molluschi bivalvi corrispondono ai globuli di vitello in formazione (Pipe, 1985). L'origine endogena di tali formazioni è confermata dal fatto che negli ovociti in accrescimento la superficie ovocitaria è sostanzialmente priva di quadri che suggeriscono fenomeni di endocitosi, che sono invece numerosi quando l'ovocita è in vitellogenesi (Roth and Porter, 1964; Ghiara et al., 1968; Yusko and Roth, 1976; Campanile et al., 1977; Goldstein et al., 1979; Pearse and Crowther, 1987; Limatola & Filosa 1989; Shen et al., 1993; Eckelbarger, 1994; Romano & Limatola, 2000; Prisco et al., 2002). Questo tipo di organizzazione suggerisce fortemente che l'ovocita soprattutto durante la fase iniziale di accrescimento, costituisca il principale sito di sintesi della VTG. Negli ovociti in cui l'accrescimento sta terminando e l'ovocita presenta la tipica forma a pera, la sintesi della VTG è verosimilmente terminata, come testimoniano sia la mancata presenza del mRNA per la VTG sia l'assenza di un apparato di sintesi simile a quello evidente nel citoplasma degli ovociti nelle prime fasi di accrescimento. Le stesse considerazioni valgono sostanzialmente anche per l'eventuale sintesi della VTG a livello delle cellule follicolari. Significativo a questo proposito è l'osservazione che la superficie delle cellule follicolari, sia sul versante citoplasmatico sia sul versante esterno, è spesso associata a materiale, la cui elettrondensità, al TEM, è simile a quella del materiale presente all'interno dei globuli di vitello. Naturalmente, in mancanza di indagini di immunolocalizzazione per la VTG, non è possibile affermare che il materiale elettron-denso osservato al TEM sia caratterizzato dalla presenza di VTG. Per questo dovrebbe essere utilizzato un anticorpo anti-VTG omologo di *Mytilus galloprovincialis*. Sono state comunque effettuate, malgrado tutto, delle prove di immunistochemica su follicoli con ovociti in accrescimento e sulla ghiandola digestiva, utilizzando un anticorpo anti-VTG di *Sparus*, pesce teleosteo, e uno di *Podarcis*, rettile squamato, confidando nel fatto che le VTG degli invertebrati e dei vertebrati presentano una discreta identità di sequenza nella regione N-terminale (Matsumoto et al, 2003). Purtroppo i risultati ottenuti sono stati tutt'altro che incoraggianti dal momento che la positività riscontrata non è risultata specifica. Nonostante ancora gli elementi da verificare in merito ad un origine endogena della VTG, i dati ottenuti in merito all'espressione dei recettori degli estrogeni in differenti momenti del ciclo riproduttivo di *Mytilus* costituiscono un'ulteriore evidenza che la sintesi della VTG avviene all'interno dell'ovario.

È noto che nei molluschi (Puinean et al., 2006; Ciocan et al., 2010) come nei vertebrati (Polzonetti et al., 2004; Prisco et al., 2008; Verderame e Limatola, 2010) i recettori degli estrogeni intervengono nel controllo della sintesi della VTG verosimilmente attraverso la regolazione della sintesi del mRNA della VTG. Dall'analisi dell'espressione degli mRNA per ER₁ e ER₂ è risultato che l'mRNA per tali recettori è assente nella gonade nei periodi dell'anno in cui non è stata riscontrata la presenza dell'mRNA per la VTG, mentre risulta presente in quei momenti del ciclo riproduttivo in cui tale sintesi si verifica. Altrettanto significativi sono i risultati ottenuti mediante ISH. Il mRNA del recettore ER₁ presenta infatti una localizzazione a livelli ovarico che è sovrapponibile a quella dell'mRNA per la VTG; a livello della ghiandola digestiva, al contrario non è stata riscontrata alcuna presenza di tale messaggero così come della VTG. Una diversa espressione è stata registrata nel caso del ER₂: il mRNA per tale recettore è stato riscontrato in tutti i periodi del ciclo riproduttivo analizzati sia a livello gonadico sia a livello della ghiandola digestiva. Dai dati ottenuti in merito all'espressione dei recettori per gli estrogeni è possibile ipotizzare che anche in *Mytilus*, come in altri molluschi (Gagné et al. 2001; Osada et al., 2003) tali recettori siano coinvolti nella regolazione della vitellogenesi, anche se con funzioni differenti: ER₁ ha una funzione regolativa, ER₂ ha una funzione costitutiva.

Infine, per quanto concerne l'uso dei mitili quali specie sentinella da utilizzare nel monitoraggio ambientale è emerso che lo stato di salute degli animali della zona B è inferiore, in modo

statisticamente significativo, a quello registrato negli animali della zona A. Questa differenza è, probabilmente da collegare ad un minor indice gonadico registrato negli individui della zona B rispetto a quello registrato negli individui prelevati nella zona A, come indicato appunto il valore dell'indice gonadico. Un'ulteriore conferma alla suddetta ipotesi deriva dal fatto che l'assetto della gonade degli individui prelevati nella zona B sono differenti rispetto a quelli prelevati nella zona A. Nei primi, infatti, è presente un maggior numero di follicoli ovarici e una minore quantità di cellule interfollicolari un dato questo osservato in gonadi altre specie prelevati in ambienti con alta concentrazione di inquinanti (Aarab et al., 2006; Quinn et al., 2004). Tra i dati da valutare per determinare lo stato di stress ambientale, soprattutto dovuto alla presenza di xenoestrogeni, la VTG per la sua origine prevalentemente endogena in questo sistema non sembra rappresenti un valido bioindicatore, in quanto risulta difficile che i livelli di tale proteina, seppur sotto stress, possano aumentare in maniera talmente elevata da trovarla nell'emolinfa o in altri tessuti rispetto alla gonade, come invece alcuni autori vogliono suggerire (Matozzo et al., 2008). Per valutare lo stato di stress ambientale potrebbe essere invece più utile saggiare l'espressione del mRNA per il ER o la frequenza di processi apoptotici o l'indice di condizione. L'espressione dei ER varia infatti in modo significativo durante l'accrescimento ovocitario come confermato dall'analisi di espressione. Inoltre paragonando i livelli di espressione dei recettori degli (ER₁ e ER₂) in animali nello stesso periodo di accrescimento, ma di zone diverse (Zona A e Zona B) emerge chiaramente che c'è una diversa espressione nei recettori ER₁ a seconda che l'animale è prelevato dalla zona A o dalla zona B. Negli esemplari della zona B è stata registrata una maggiore frequenza di cellule apoptotiche a livello gonadico prevalentemente riconducibile ad un maggior degrado ambientale, come rilevato nei pesci (Janz et al., 1997). Le indagini effettuate hanno infine permesso di rilevare un caso d'intersesso probabilmente dovuto, come in altre specie (Palace et al., 2002; Blaise et al., 2003, 2011), a stress ambientale derivato dalla presenza di composti ad attività estrogenica. In conclusione dal presente lavoro di tesi emerge che:

- 1) I mitili sono una valida specie sentinella come si risulta anche da precedenti indagini
- 2) La vitellogenina di cui sono stati determinati i siti di sintesi, mediante metodi diretti, per i risultati finora conseguiti non sembra essere un valido biomarker in *Mytilus galloprovincialis*: ad essa sono da preferire altri biomarker come i recettori degli estrogeni.
- 3) La valutazione delle condizioni di salute di esemplari prelevati dalla zona A e zona B può essere effettuata valutando l'indice di condizione, l'indice gonadico, l'assetto morfo-funzionale delle gonadi, la presenza di quadri apoptotici e la presenza di condizioni di ermafroditismo.

TAVOLE

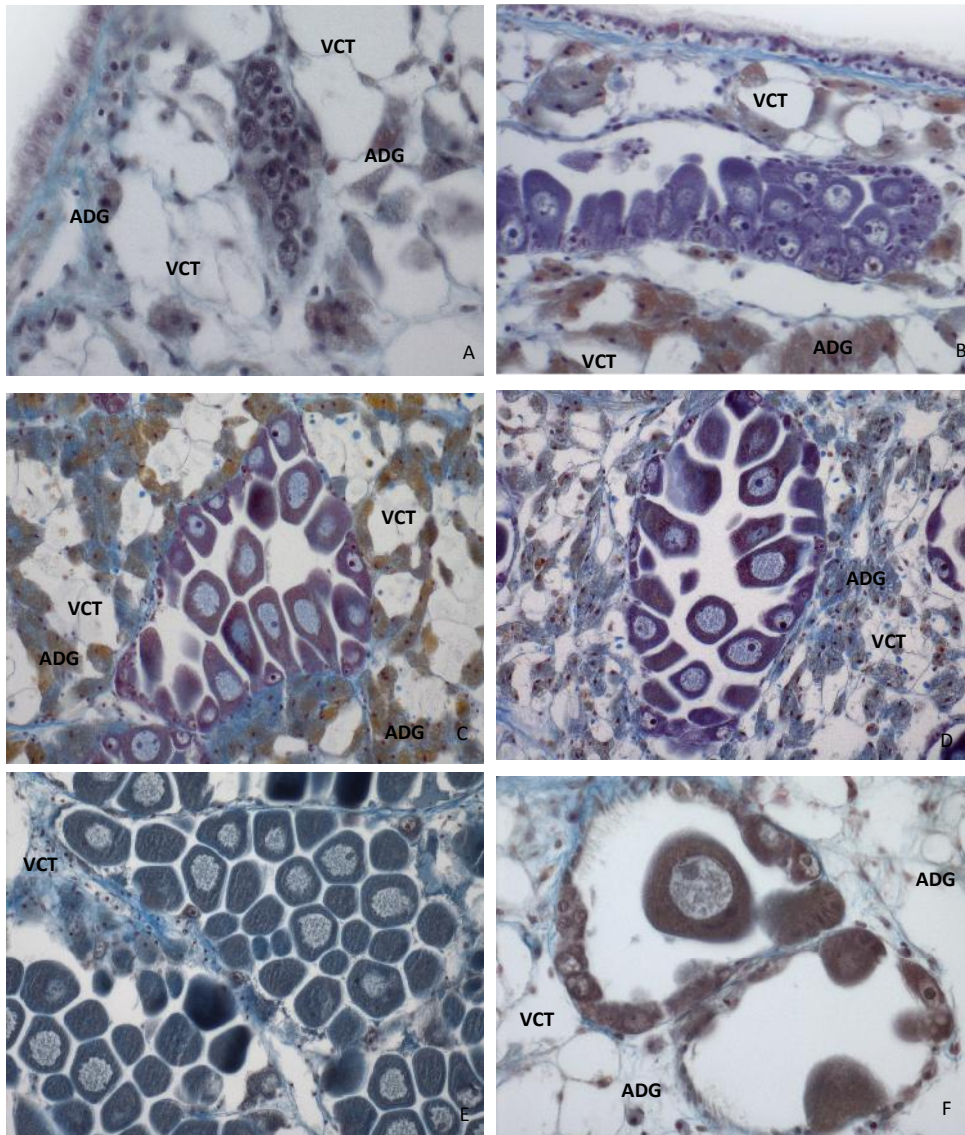


Fig. 1 Ciclo riproduttivo di *Mytilus galloprovincialis* presente nel Golfo di Napoli. **(A) Stadio 0:** Nella gonade si notano i primi follicoli nel tessuto connettivo, al cui interno sono riconoscibili ovogoni e ovociti. Notare la presenza di numerose cellule adipogranulari (ADG) e vescicolari (VCT). **(B) Stadio 1:** sono evidenti le prime fasi di accrescimento degli ovociti. All'esterno dei follicoli sono ancora presenti le cellule ADG e VCT **(C,D) Stadio 2:** Notare all'interno dei follicoli la presenza di un elevato numero di ovociti che hanno assunto la tipica forma a pera, evidenza morfologica di un avanzata vitello genesi. **(E) Stadio 3.** follicoli con all'interno i gameti che hanno completato l'accrescimento. **(F) Stadio 3:** Svuotamento dei follicoli a seguito dell'emissione dei gameti.

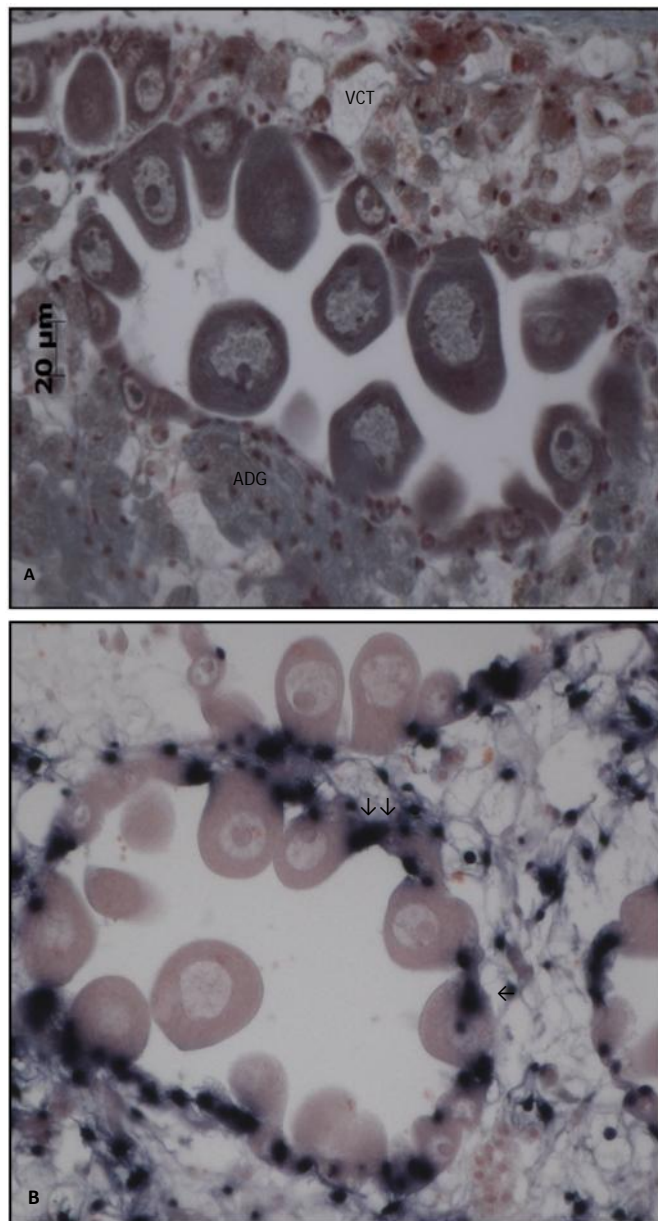


Fig.2: Localizzazione del mRNA VTG in follicolo di mitilo dopo ibridazione in situ. A) Follicolo ovarico in stadio 2 circondato da cellule adipogranulari e vescicolari. Le sezioni sono state ibridate con sonde antisenso VTG marcate con DIG-UTP per rilevare mRNA per la VTG. Il segnale di ibridazione si presenta come aree blu. **B)** Un forte segnale è evidente sulle cellule germinali femminili (freccie), cellule follicolari (doppie freccie) e sulle cellule connettivali adipogranulari (punte di freccia). Nessun segnale è stato evidente negli emociti (freccie con bar).

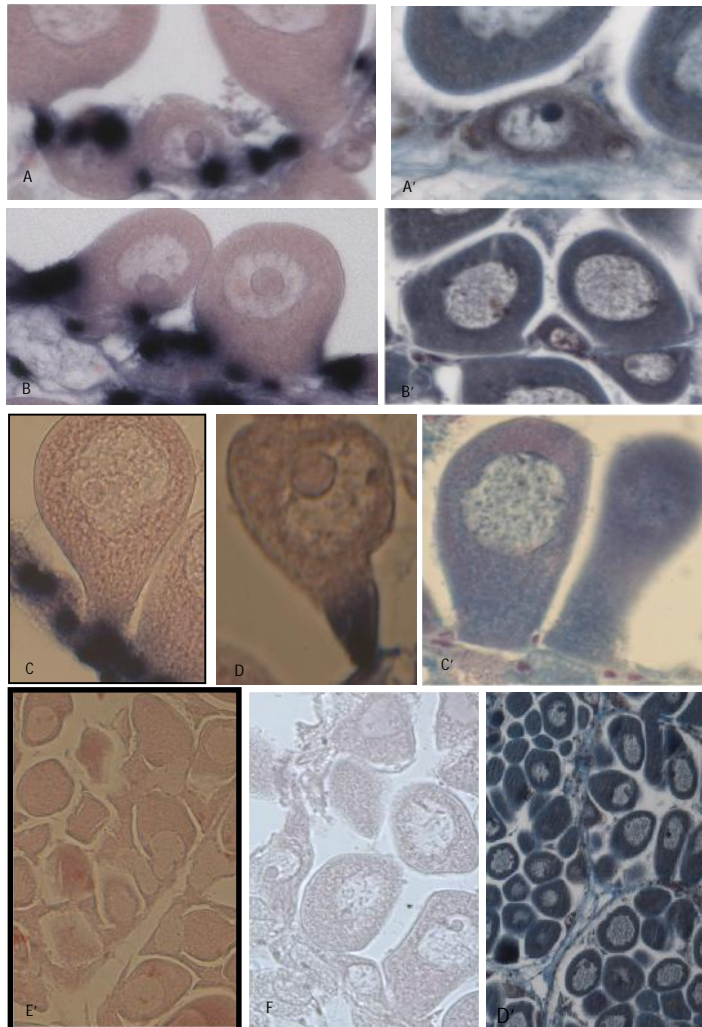


Fig. 3: Localizzazione del mRNA VTG in oociti di mitili dopo ibridazione *in situ*. Gli oociti sono stati ibridati con sonda antisenso (A-F) e senso (H) *Vtg* marcata con DIG-UTP per rilevare il mRNA *Vtg*. Il segnale di ibridazione si presenta come aree scure. Ovociti colorati con Mallory sono stati anche mostrati per mettere in evidenza la loro organizzazione durante le diverse fasi di accrescimento, e le relazioni con le cellule follicolari (A'-D'). **A)** La positività per mRNA *Vtg* è presente nel citoplasma degli oociti all'inizio della vitellogenesi (Oo) e nelle cellule follicolari (frecche). **(B, C, D)** Quando l'accrescimento dell'ovocita continua e viene progressivamente acquisita l'organizzazione a pera da parte dell'ovocita, il segnale di ibridazione è localizzato preferenzialmente nella regione basale dell'ovocita collegata alla trabecole di tessuto connettivale che delimitano il follicolo **(D, E)**. Un segnale positivo è evidente anche nelle cellule follicolari **(B, D)**. Nessun segnale è stato osservato negli oociti che hanno terminato l'accrescimento **(E)** e nelle sezioni di controllo eseguite con una sonda senso per VTG **(F)**.

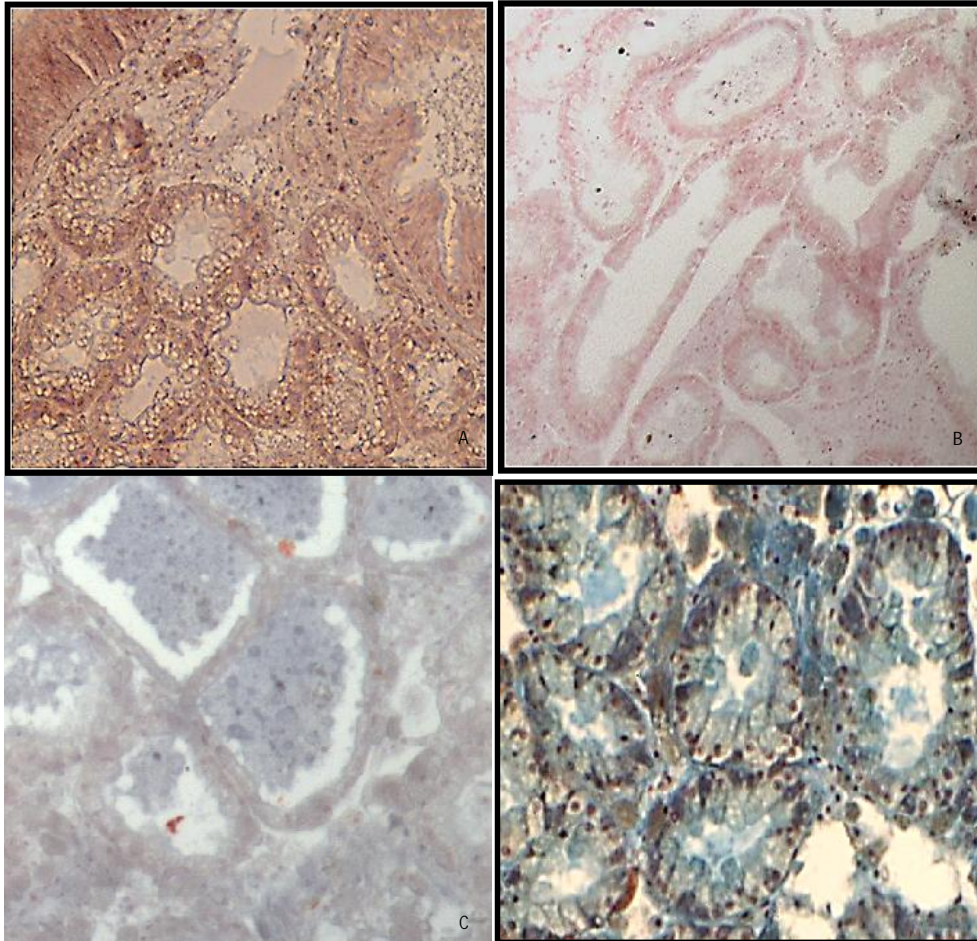


Fig.4: Localizzazione del mRNA *Vtg* in ghiandole digestive di *Mytilus galloprovincialis* dopo ibridazione *in situ*. Sezione di ghiandola digestiva ibridata con sonda *Vtg* antisenso (A-B) e senso (C) e marcata con DIG-UTP per rilevare l'mRNA *Vtg*. Il segnale di ibridazione si presenta come aree blu. Nessun segnale è evidente nella ghiandola digestiva allo stadio 0 (A), stadio 1-2 (B) e C) nel controllo effettuati utilizzando una sonda senso per l'mRNA *Vtg*. Sezioni di ghiandola digestiva colorate con Mallory sono state mostrate per mettere in evidenza la loro organizzazione.

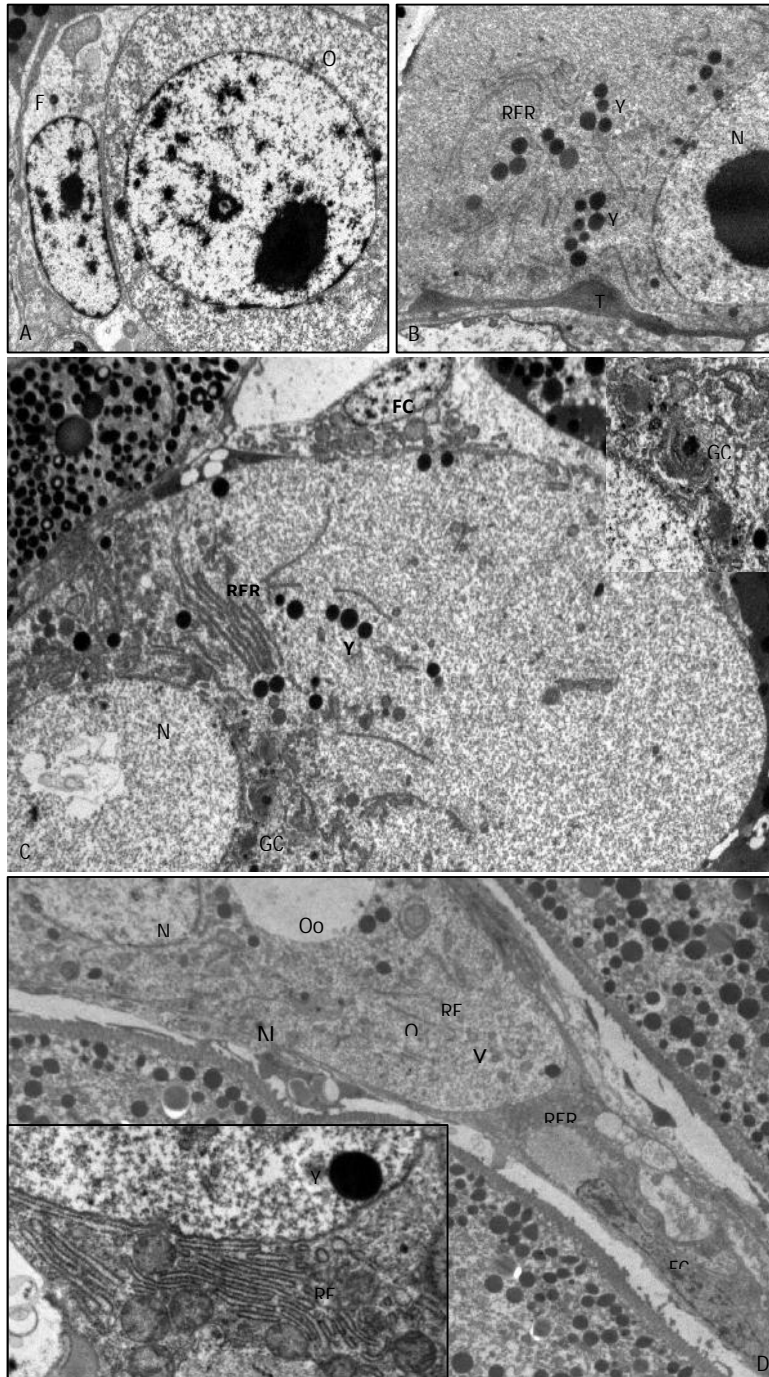


Fig.5: Ovociti in differenti stadi di accrescimento osservati al microscopio elettronico a trasmissione. A) ovocita previtellogenico collegato ad una cellula follicolare (stadio 0). Si noti la presenza di pochi organuli nel citoplasma della cellula follicolare (FC) e dell'ovocita (Oo). **B)** Un ovocita all'inizio della vitellogenesi (Oo) di forma ovoidale ancorato alla trabecola del tessuto connettivo (T) (stadio 1). Si noti la presenza dei primi granuli di vitello (V) circondati da cisterne di reticolo endoplasmatico rugoso (RER). **C)** Un ovocita ovoidale vitellogenico (Oo) collegato a una cellula follicolare (FC) (stadio 1). Il citoplasma dell'ovocita è caratterizzato da complessi di Golgi (GC), cisterne RER, e granuli di vitello (Y). Nessuna vescicola di endocitosi è evidente lungo la superficie dell'ovocita. Riquadro: maggiore ingrandimento del Golgi. Si noti la presenza di granuli di vitello in formazione (punte di freccia) nella faccia trans del complesso di Golgi. **D)** Ovocita ovoidale (Oo) collegato a una cellula follicolare (FC) (stadio 1). L'ooplasmia è ricco di RER e complessi Golgi. Gli stessi organuli sono presenti anche all'interno delle cellule follicolari. E) Maggiore ingrandimento della Fig. 5D, si noti la presenza di un esteso sistema di cisterne RER e l'assenza di vescicole endocitotiche lungo la superficie di contatto tra le cellule follicolari e l'ovocita. N = Nucleo

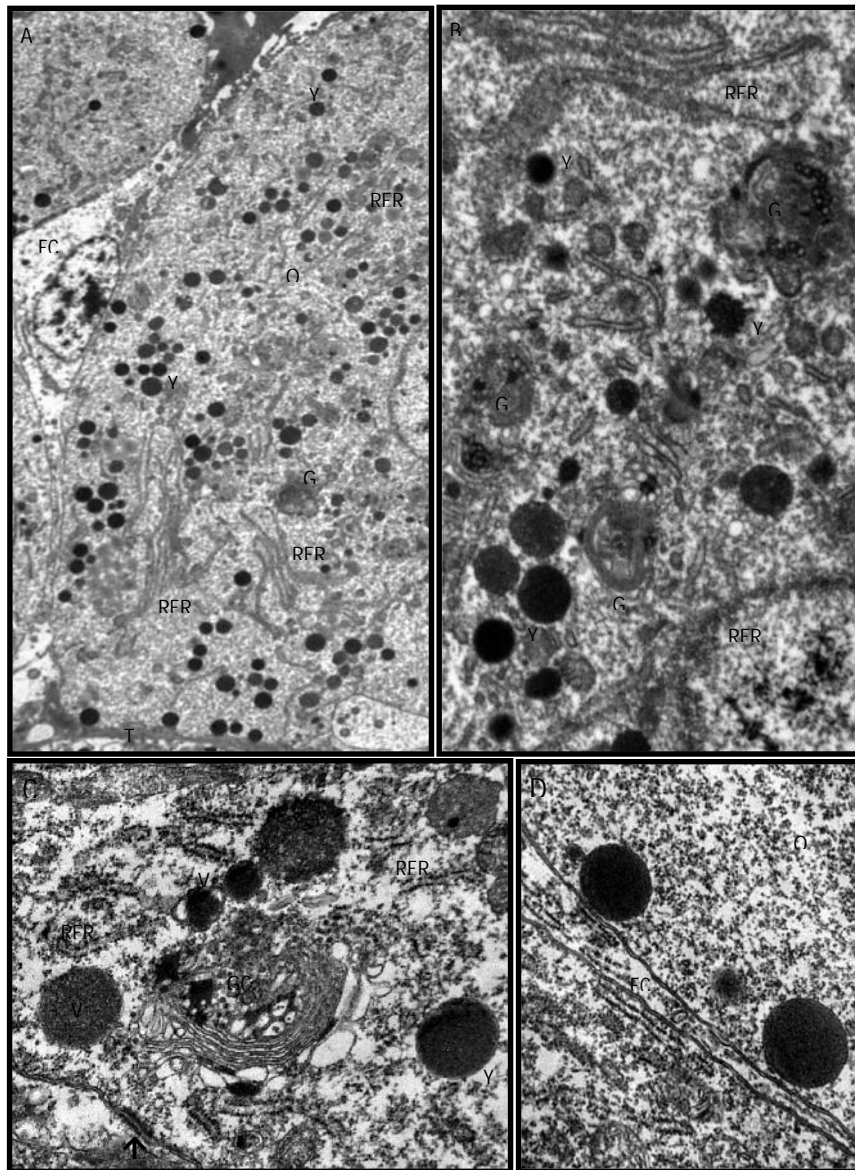


Fig.6 Ovocita vitellogenico a forma di pera (Oo) collegato alle trabecole del tessuto connettivo (T). A) Si noti l'apparato di sintesi proteica molto esteso rappresentato da cisterne RER e complessi di Golgi (GC) (stadio 2). È evidente una cellula follicolare (FC) è evidente. B) Ingrandimento della Fig.5 che mostra le cisterne RER e il complesso Golgi circondati da numerosi granuli di vitello. C) complesso Golgi circondato da numerosi vacuoli contenenti materiale denso agli elettroni. Si noti la presenza di materiale denso agli elettroni, simile a quello presente all'interno dei granuli di vitello, all'interno delle cisterne del complesso di Golgi; Vacuoli (V) di differenti dimensioni che rappresentano i granuli di vitello in formazione sono inoltre evidenti in prossimità del complesso Golgi. Una giunzione desmosoma-like (doppia freccia) è evidente tra l'ovocita e le cellule follicolari, D) Area di contatto fra un ovocita (Oo) e una cellula follicolare (FC); Si noti l'assenza di vescicole di endocitosi lungo le membrane plasmatiche. Y = granuli di vitello; RER = Reticolo Endoplasmatico Ruvido.

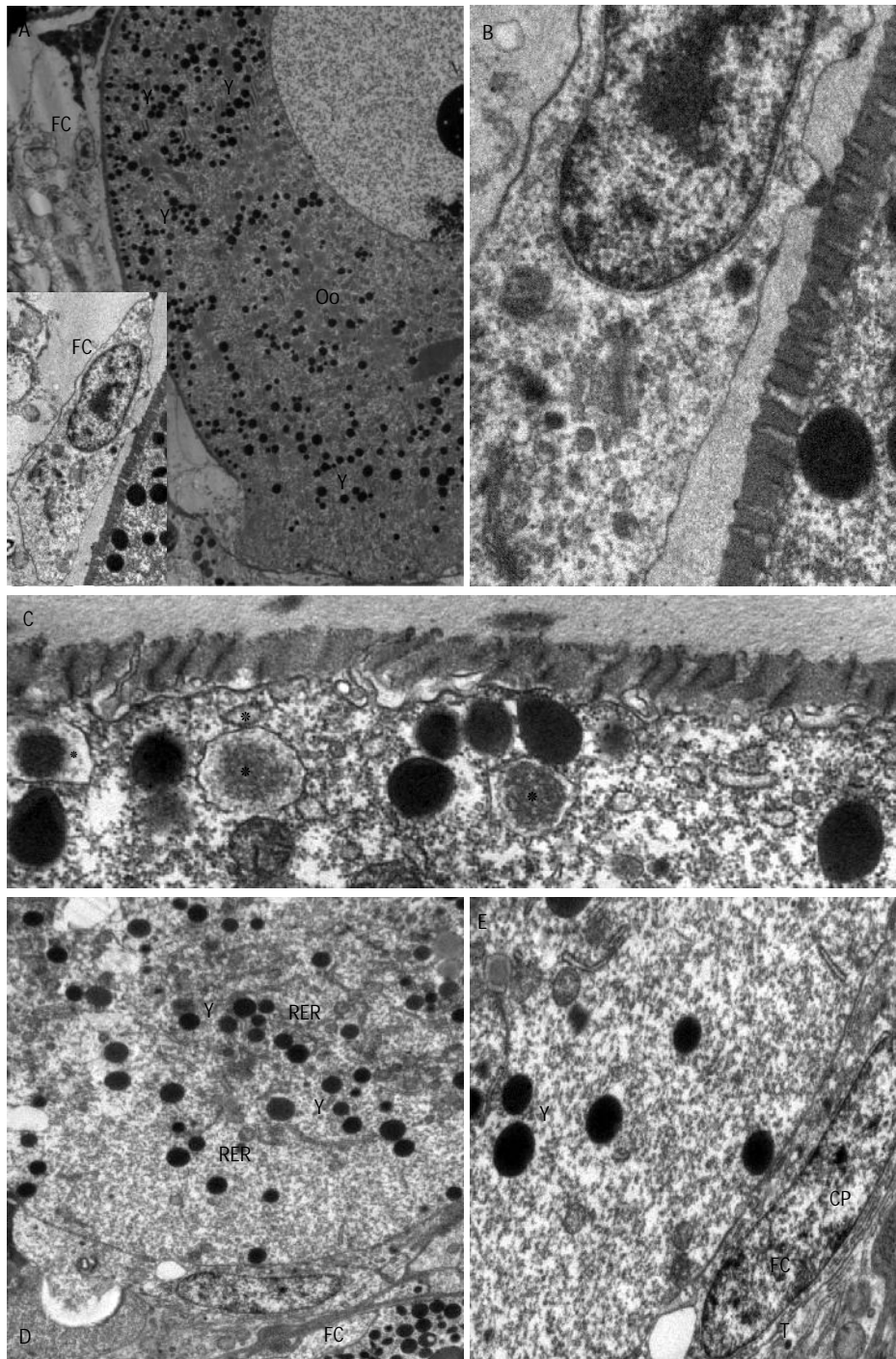


Fig. 7: Ovocita in vitellogenesi in stadio 2 **A)** ovocita vitellogenico (Oo) connesso ad una cellula follicolare (FC). È evidente in questa fase la tipica forma a pera dell'ovocita. La regione basale è ancorata alle trabecole (T) del tessuto connettivo. La regione apicale è caratterizzata da molti granuli di vitello (Y). Ingrandimento a livello della cellula follicolare (FC). **B)** Ulteriore ingrandimento della cellula follicolare in fig. A. Il citoplasma della cellula follicolare mostra un esteso apparato di sintesi caratterizzato dalla presenza di cisterne RER, complessi di Golgi, e vacuoli contenenti materiale denso agli elettroni. Lo stesso materiale è evidente accanto alla membrana plasmatica all'interno e all'esterno della cellula (punte di freccia). **C)** Superficie di un ovocita a forma di pera. La superficie mostra un numero moderato di invaginazioni (punta di freccia) e vescicole suggerendo un'attività endocitotica. Notare anche la presenza di vacuoli (*) che contengono un materiale con moderata densità elettronica e la presenza di vescicole che circondano uno di tali vacuoli (freccie) **D)** e **E)** Regione basale di un ovocita in fase avanzata di vitellogenesi in contatto con la parete

del follicolo (T). Si noti la presenza di cisterne RER e i complessi di Golgi circondati da numerosi granuli di vitello (**D**) e l'attività endocitotica (freccette) a livello della superficie dell'ovocita (**E**). Notare anche la presenza di cellule follicolari (FC) nelle quali è evidente una quantità moderata di citoplasma (CP).

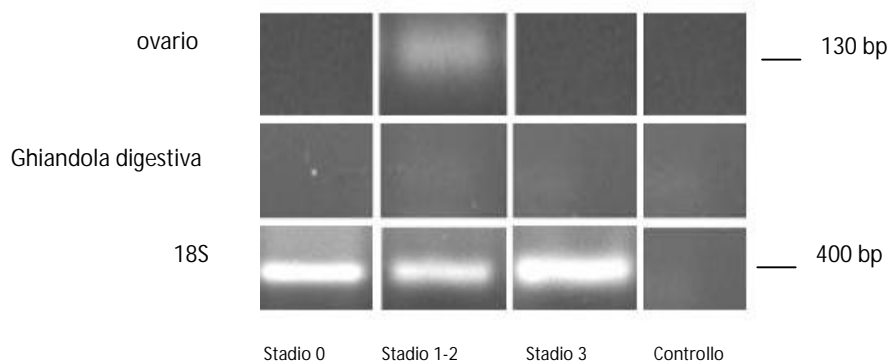


Fig.8: RT-PCR di VTG nell'ovario e ghiandola digestiva. Il prodotto di amplificazione di circa 130 bp corrispondente al gene per la VTG è evidente solo nelle gonadi allo stadio di 1-2 (vitellogenesi), nessun segnale è evidente negli stadi 0 e 3. Nella ghiandola digestiva il segnale non è evidente in nessuno stadio. La subunità 18S ribosomiale è il controllo della qualità dei cDNA. Il controllo è stato ottenuto omettendo il cDNA.

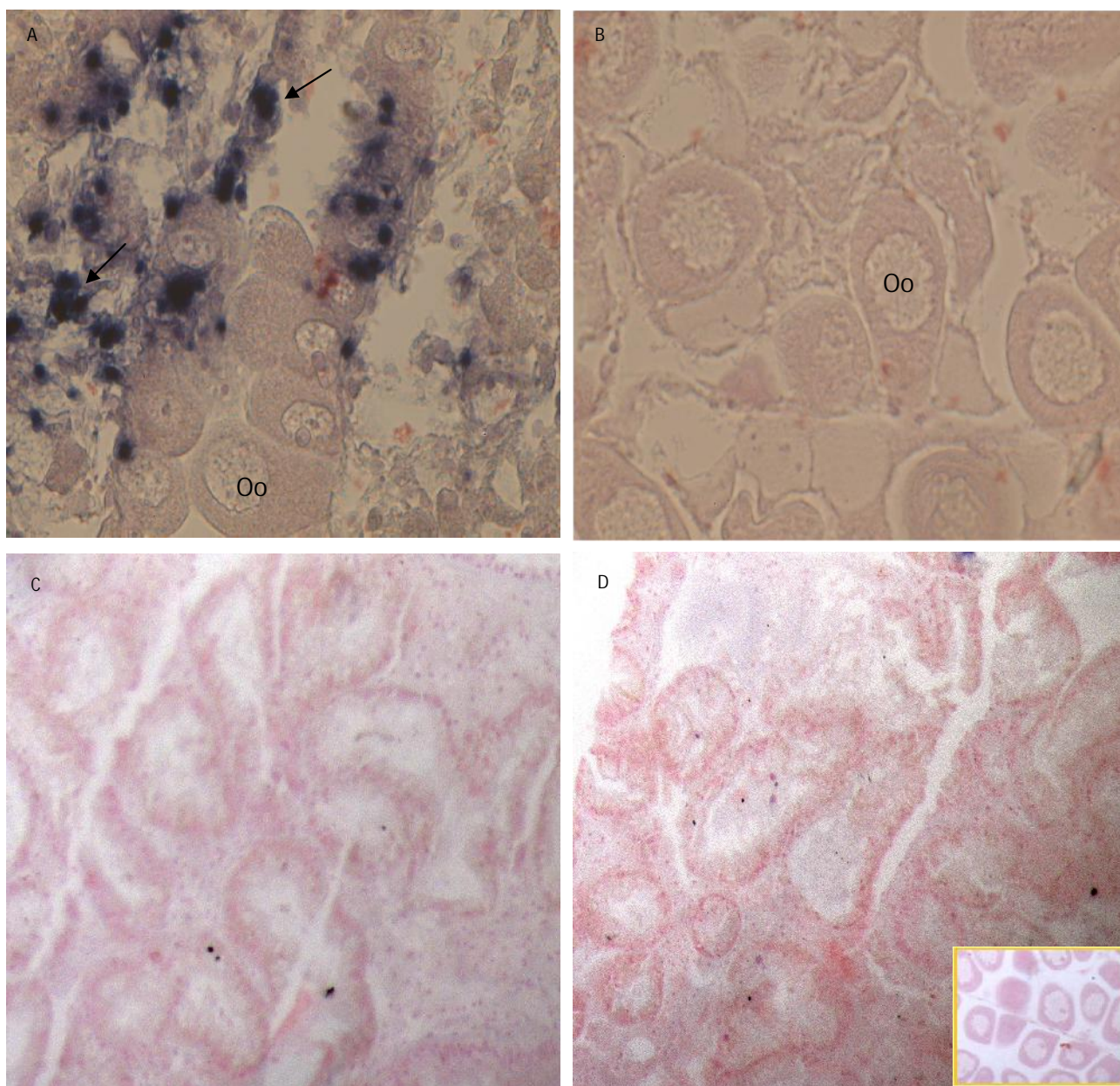


Fig. 9: Follicolo in stadio 2 ibridazione *in situ* su sezioni di gonade e ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis*, condotta con sonda a cDNA per ER₁. **A:** Follicolo in stadio 2: sono marcati gli ovociti in vitellogenesi (frecche con barra), le cellule follicolari (FC) (punta di freccia) e le cellule connettivali ADG e VCT (frecche), mentre la marcatura non è presente negli ovociti che hanno concluso la vitellogenesi (Oo). **B:** Follicoli in stadio 3: non è presente alcuna marcatura né all'interno degli ovociti (Oo) né all'interno delle cellule follicolari (non raffigurate). **C:** sezione di ghiandola digestiva in stadio 2: non è evidente alcuna marcatura. **D:** sezione di ghiandola digestiva in stadio 3: non è evidente alcuna marcatura.

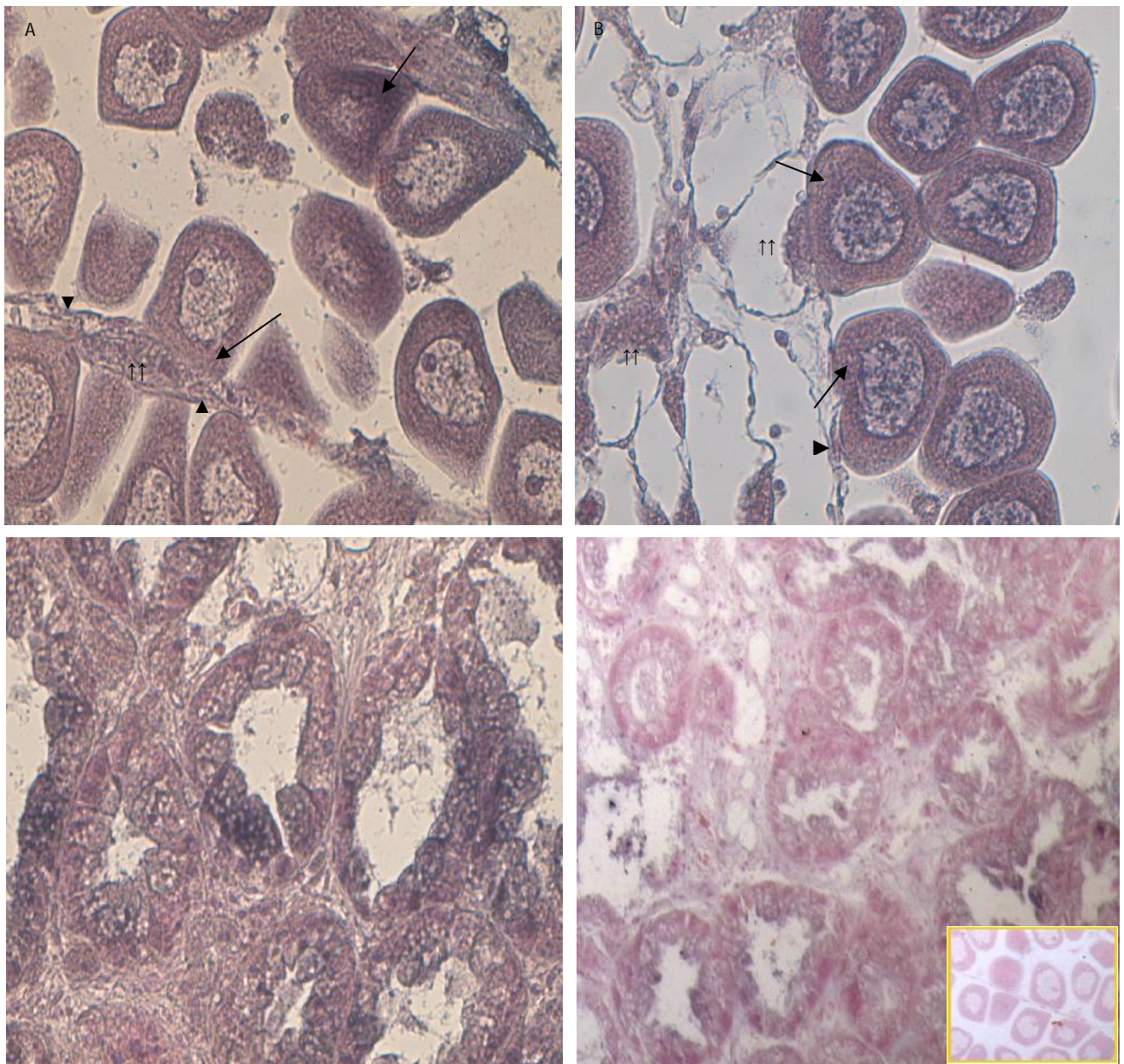


Fig. 10: Ibridazione in situ su sezione di gonade e ghiandola digestiva di *Mytilus galloprovincialis*, condotta con sonda a cDNA per ER₂. A-B: Follicolo in stadio 2 (A) e stadio 3 (B): la positività ad ER₂ è presente nel citoplasma degli ovociti (frecce), nel citoplasma delle cellule follicolari (punta di freccia) e nelle cellule ADG e VCT (doppia freccia). C-D: sezione di ghiandola digestiva in stadio 2 (C) e stadio 3 (D): la positività è evidente sia durante lo stadio 2 sia allo stadio 3. D, inserto: nessun segnale è evidente nei controlli.

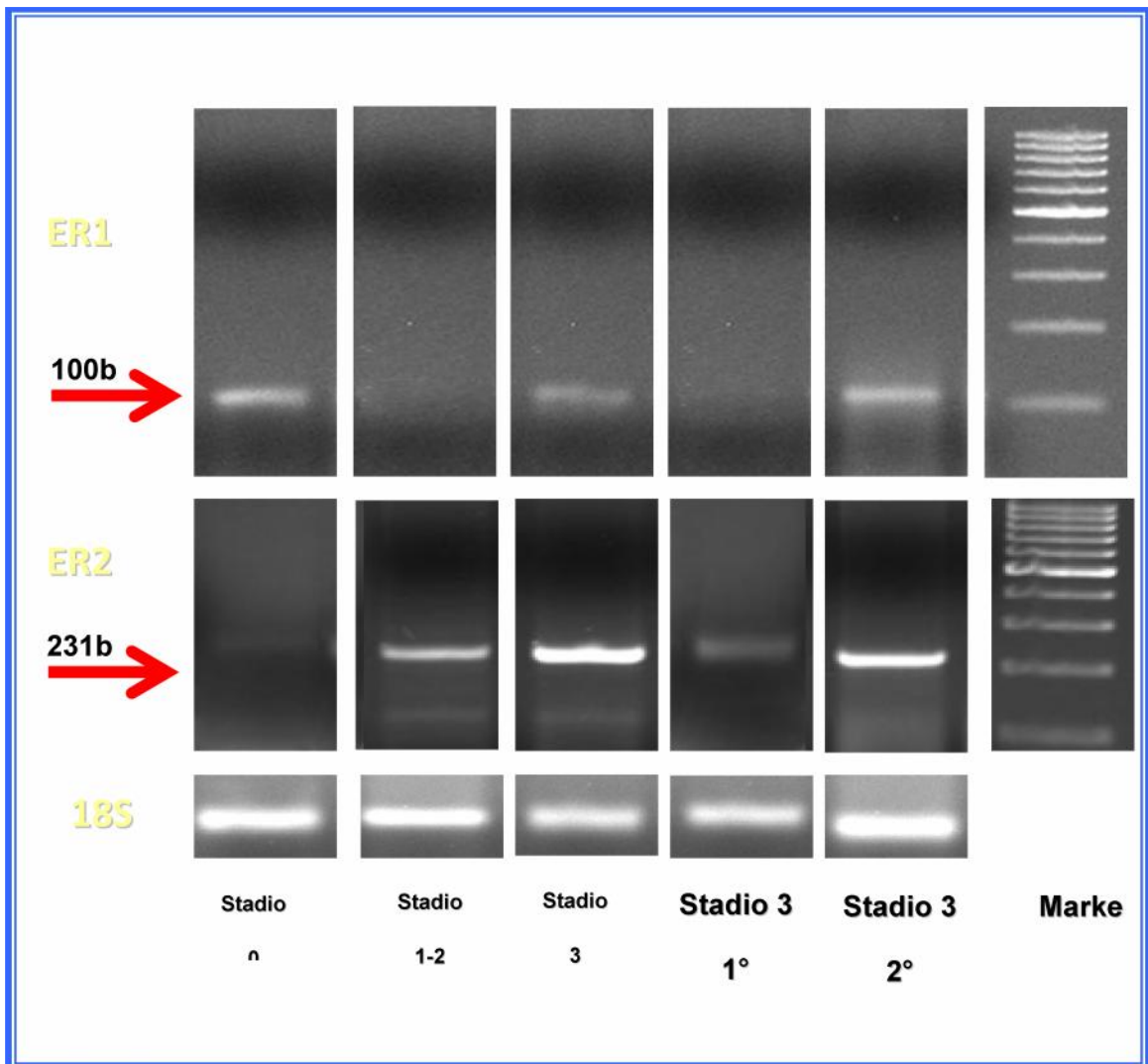


Fig.11: Analisi di espressione di ER₁ e ER₂ in campioni in diverse fasi del ciclo riproduttivo e standardizzata con l'rRNA 18S. L'mRNA per ER₁ (corrispondente alla banda di 100bp) è presente con un livello di espressione elevato in tutto il periodo di accrescimento oocitario (stadio 1-inizio 3), mentre è assente durante la fase in cui l'accrescimento oocitario è assente o terminato (stadio 0 e 3). L'mRNA per ER₂ (corrispondente a una banda di 230 bp) è espresso costantemente nei differenti stadi esaminati, con un lieve decremento nella fase di stasi. L'espressione di ER₂ è maggiore di ER₁ quando essi sono co-espressi.

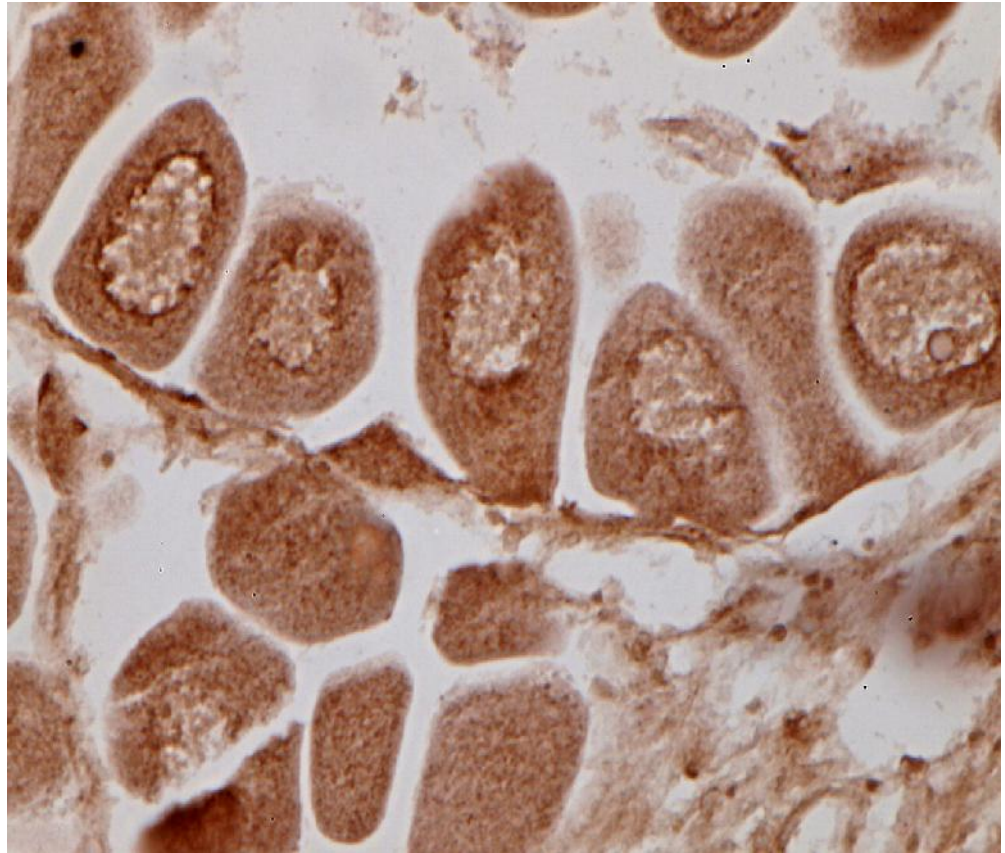


Fig. 12 Sezione di gonade con follicoli allo stadio 2 su cui è stata effettuata l'immunocitochimica. L'indagine è stata effettuata in follicoli con ovociti allo stadio 2 utilizzando un anticorpo anti-VTG di *Podarcis sicula*. La marcatura è distribuita in modo aspecifico sulle differenti strutture presenti.

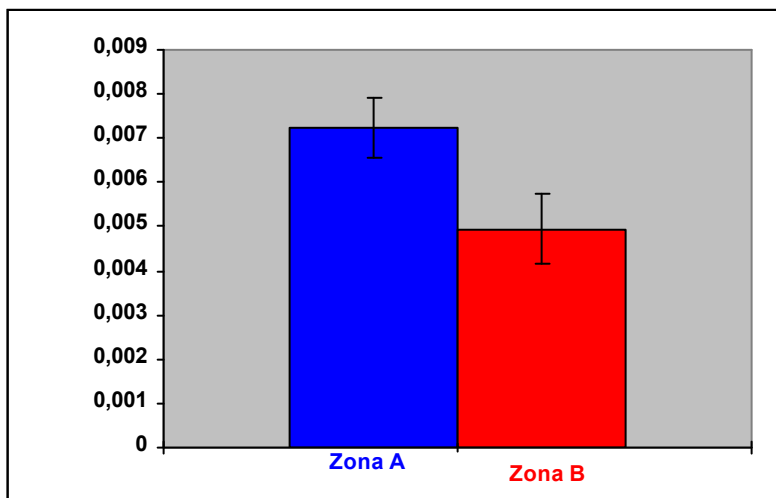


Fig.13: Indice di Condizione (I.C.) relativo alla zona A e B. Notare la differenza, statisticamente significativa, tra l'I.C. degli animali della zona A rispetto a quella degli animali della zona B ($P < 0,05$)

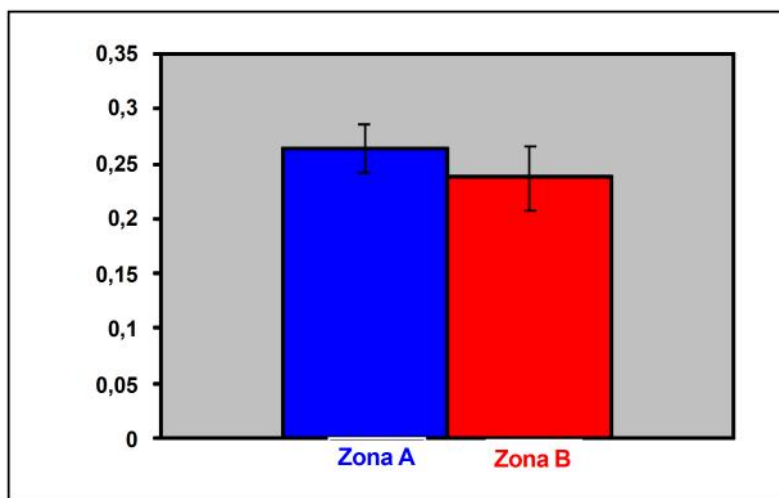


Fig.14: Indice Gonadico I.G. degli animali della zona A e B. Notare la differenza statisticamente significativa tra l'I.G. degli animali della zona A rispetto a quella degli animali della zona B ($P < 0,05$)

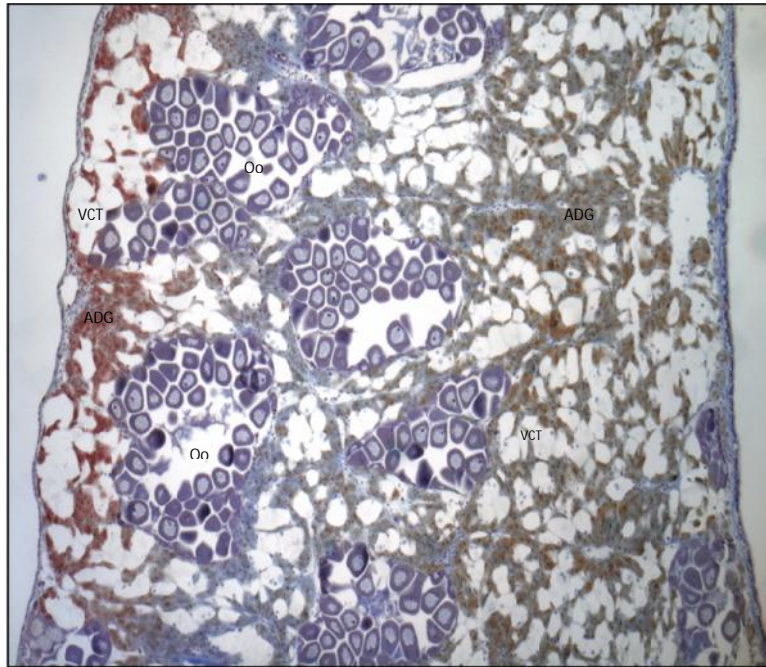


Fig. 15: Morfologia della gonade di un individuo di zona A . Sono visibili i follicoli con gli ovciti (Oo) e le cellule adipogranulari (ADG) e vescicolari (VCT) .

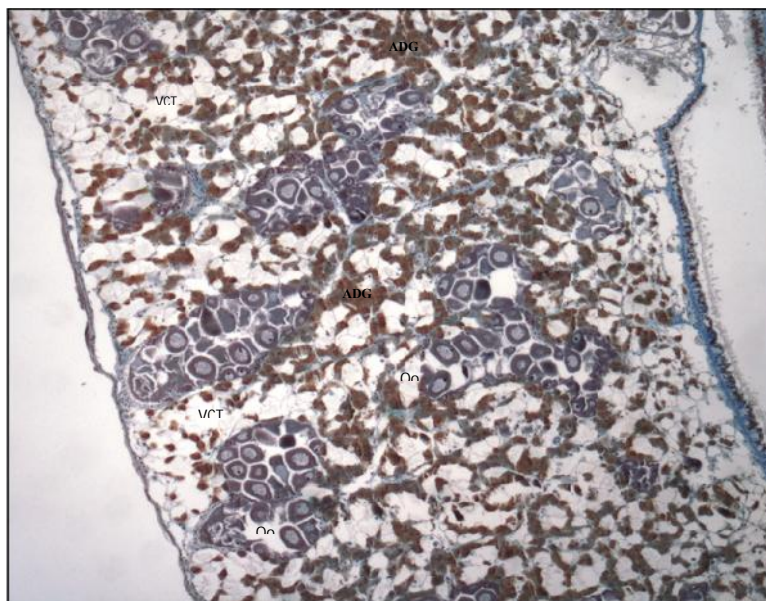


Fig. 16: Morfologia della gonade di un individuo di zona B. Il numero dei follicoli rappresentato in figura 16 è inferiore rispetto a quello della figura 15.

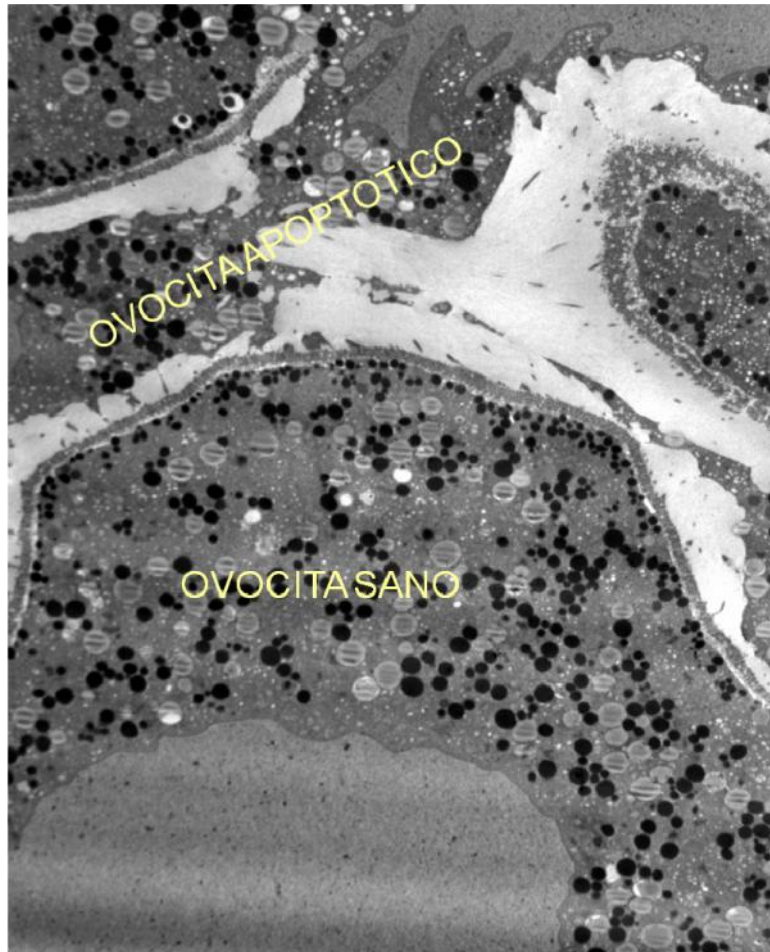


Fig.17: Ovocita sano e in apoptosi. L'immagine mostra un ovocita alla fine della vitellogenesi (ovocita sano) e un ovocita in degenerazione, probabilmente dovuta ad un processo di apoptosi, come suggerisce l'elevata irregolarità del nucleo e la frammentazione del citoplasma.

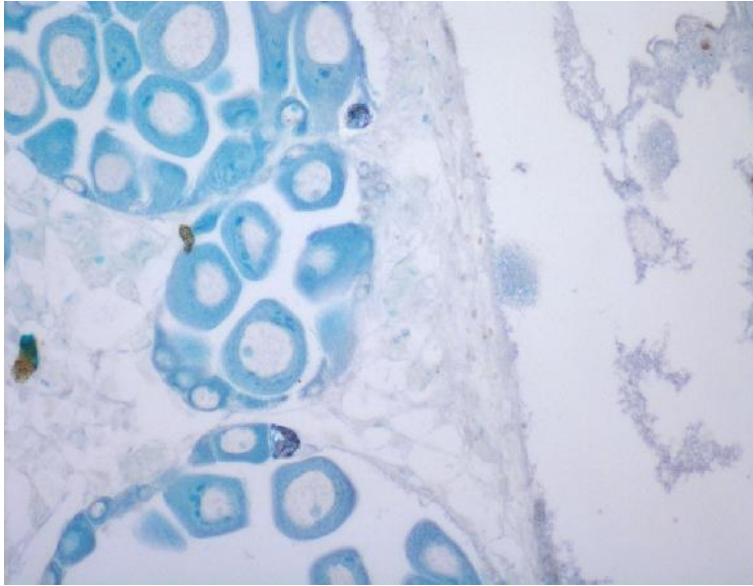


Fig.18: Saggio TUNEL in un ovario di mitilo di zona A. Sono marcati alcuni ovogoni (frecche), ovociti (Oo) (punte di frecche) e le cellule interfollicolari (CIF).

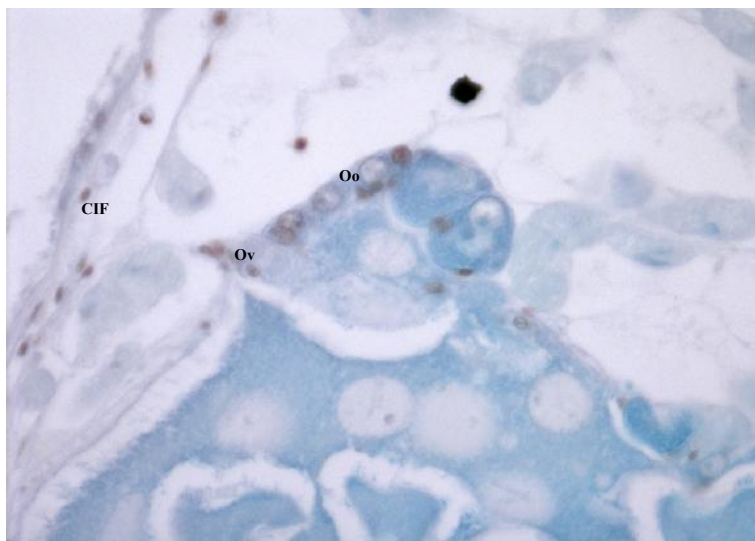


Fig.19: Saggio TUNEL in un ovario di mitilo di zona A: sono marcati alcuni ovogoni (frecche). Ovogoni (Ov), ovociti (Oo), cellule interfollicolari (CIF).

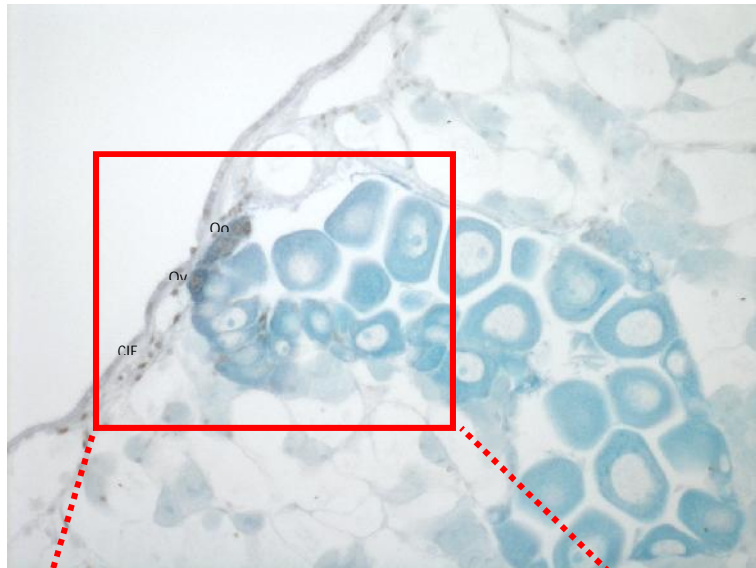


Fig.20(A): Saggio TUNEL in ovario di un mitilo della zona B. La positività è evidente in ovogoni (Ov), ovociti (Oo) e cellule interfollicolari (CIF).

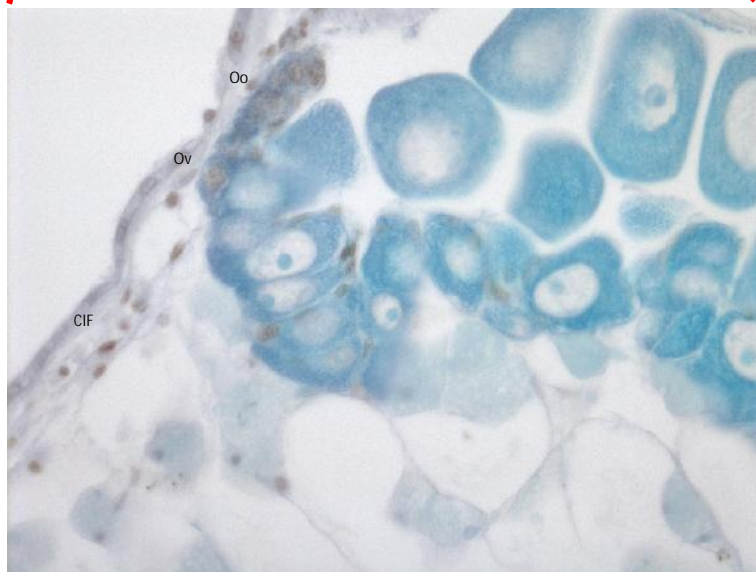


Fig.20(B): Ingrandimento della figura 20(A).

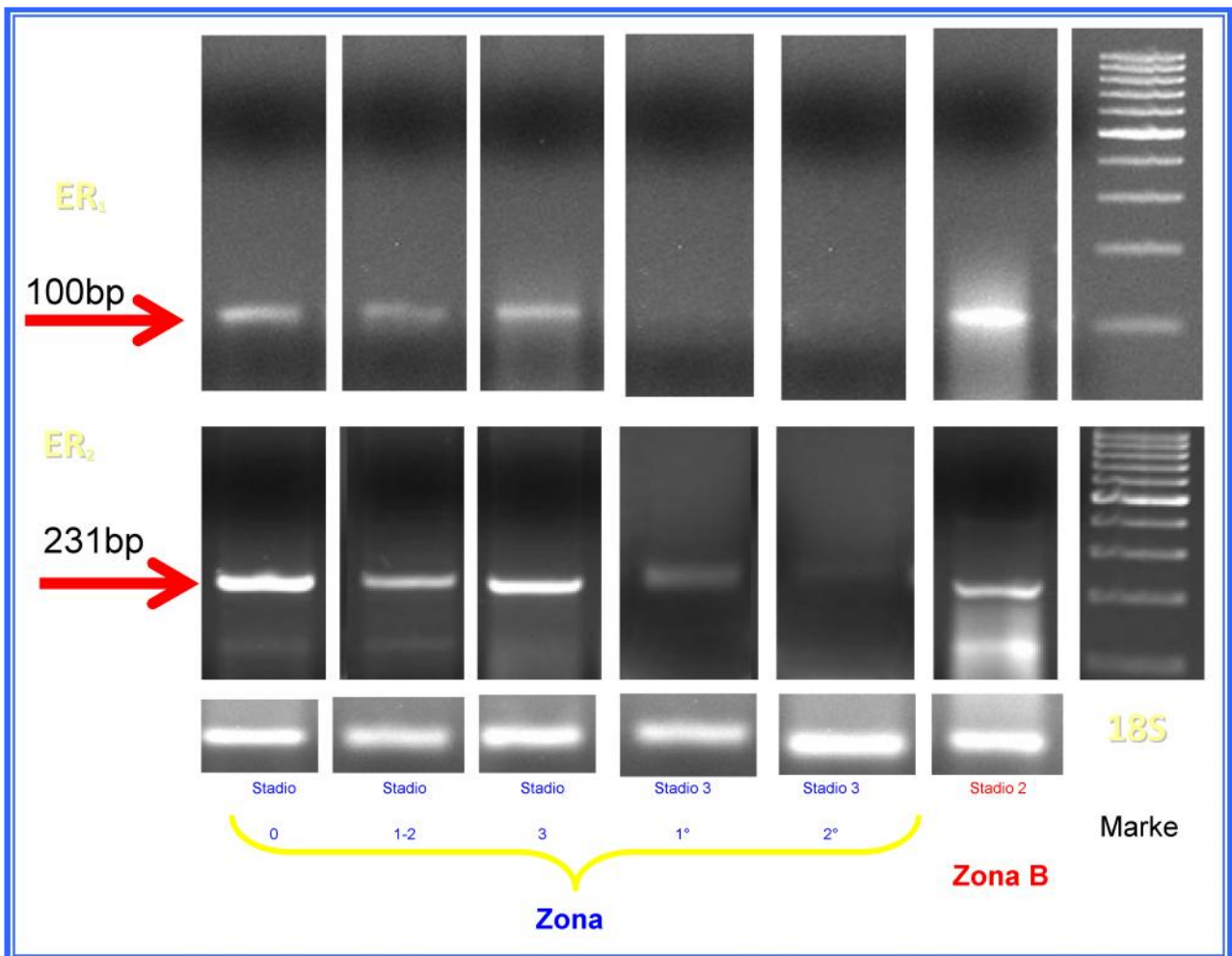


Fig.21: Analisi di espressione di ER_1 e ER_2 in campioni della zona A e zona B di Castel dell'Ovo. L'mRNA per ER_1 (corrispondente alla banda di 100bp), presente con un livello di espressione elevato in tutto il periodo di accrescimento ovcitario (stadio 1-inizio 3) e assente durante la fase in cui l'accrescimento ovcitario non è presente o terminato (stadio 0 e 3) (Marzo e Maggio), risulta sovraespresso nella zona B rispetto alla zona A. L'mRNA per ER_2 (corrispondente alla banda di 230 bp), espresso costantemente nei differenti stadi in considerazione e con un lieve decremento nella fase di stasi, mostra un'espressione analoga nelle due zone.

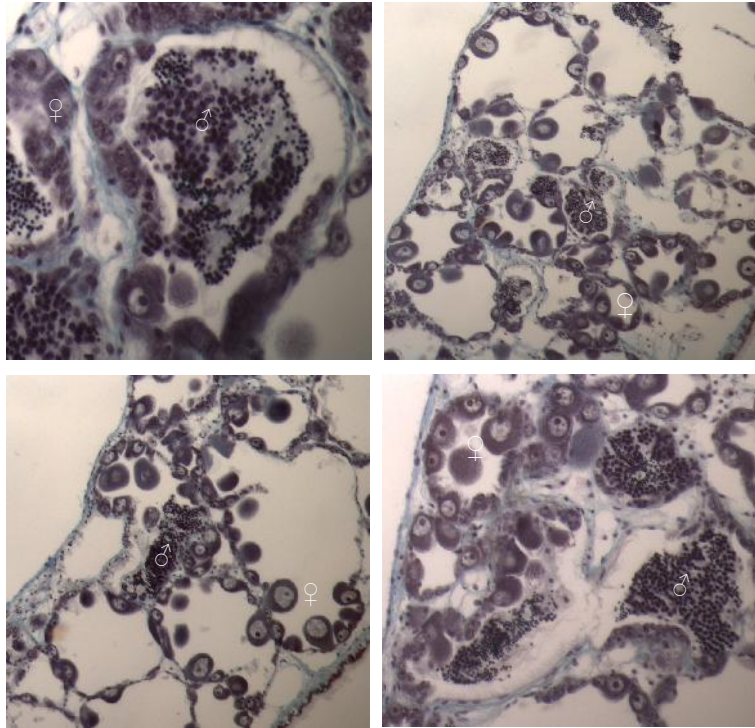


Fig.22: Sezioni di una gonade in intersesso: Sono visibili follicoli contenenti cellule germinali maschili (♂) e femminili (♀) in diversi stati di accrescimento.

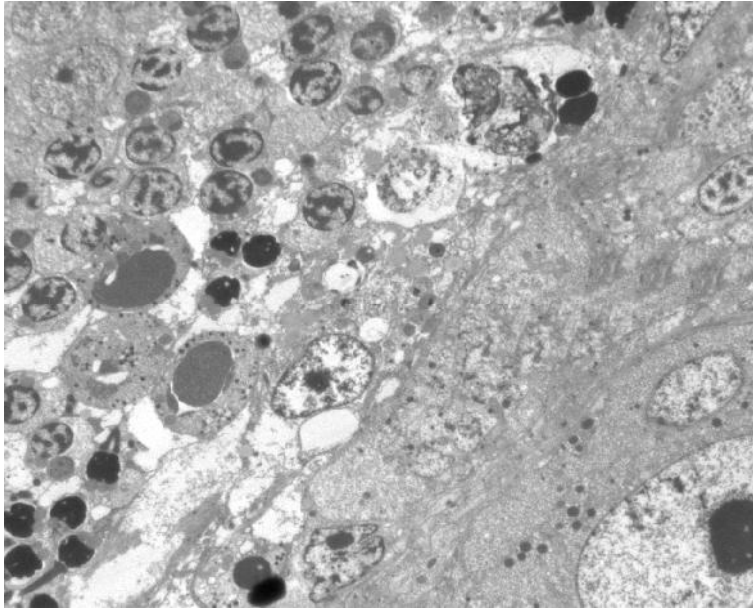


Fig.23: Immagini al TEM di un follicolo di una gonade in intersesso. I gameti maschili e femminili, sebbene presenti all'interno dello steso follicolo, sono tuttavia separati e presentano una corretta organizzazione

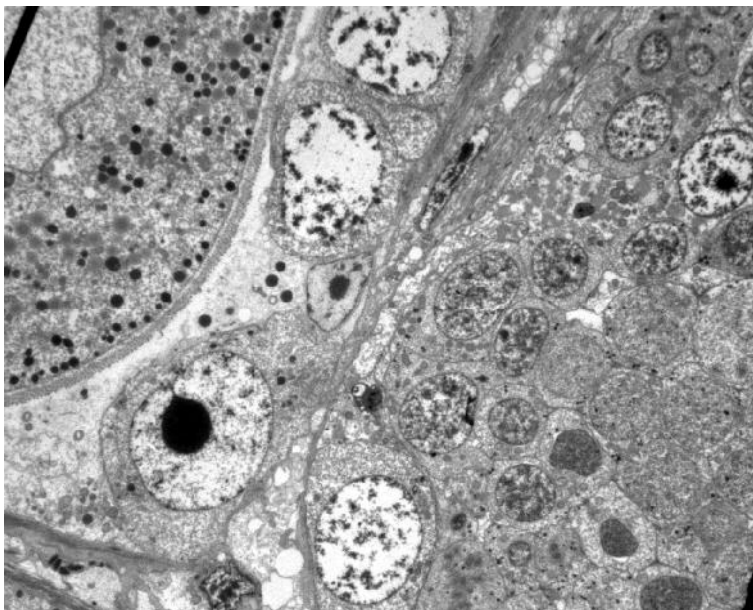


Fig.24: Immagine al TEM di una gonade in intersesso. Le immagini oltre a evidenziare una corretta organizzazione dei gameti maschili e femminili mettono in rilievo un corretto quadro di spermatogenesi e ovogenesi all'interno dello stesso follicolo.

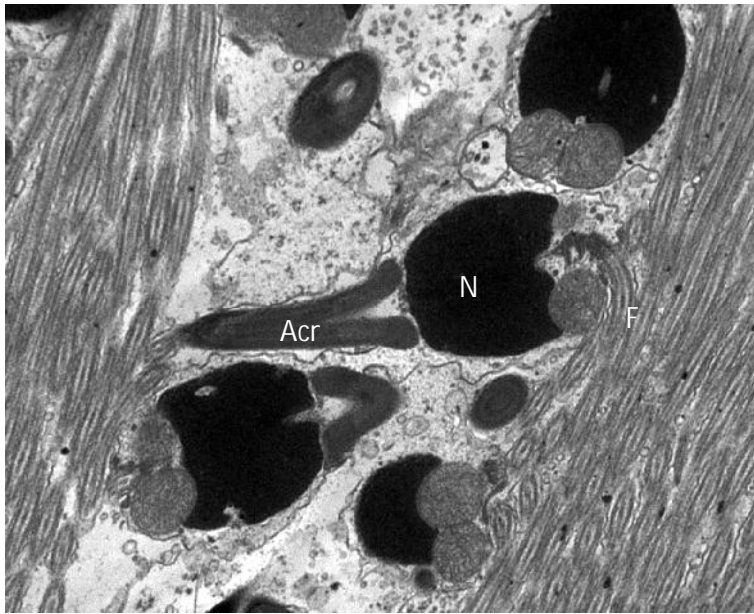


Fig.25: Immagine al TEM di spermatozoi in una gonade in intersesso. Nella immagine si notano spermatozoi con caratteristiche di crescita normale. Gli spermatozoi presentano infatti l'acrosoma (Acr.), il nucleo (N), il collo (C) e il flagello (F).

BIBLIOGRAFIA

- Aarab N, Minier C, Lemaire S, Unruh E, Hansen PD, Larsen BK, Andersen OK, Narbonne JF. 2004. Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols. *Mar Environ Res* 58:437–441
- Aarab N, Lemaire-Gony S, Unruh E, Hansen PD, Larsen BK, Andersen OK, Narbonne JF. 2006. Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. *Aquat Toxicol* 78S S86–S92
- Aarab N, Pampanin DM, Naevdal A, Øysaed KB, Gastaldi L, Bechmann RK. 2008. Histopathology alterations and histochemistry measurements in mussel, *Mytilus edulis* collected offshore from an aluminium smelter industry (Norway). *Mar Pollut Bull* 57 (6-12) 569–574
- Acosta-Salmone H, Southgate PC. 2005. Mantle regeneration in the pearl oysters *Pinctada fucata* and *Pinctada margaritifera*. – *Aquaculture* 246:447–453
- Addadi L, Weiner S. 1997. A pavement of pearl. *Nature* 389:912–914.
- Aida K, Phan-Van-Ngan P, Hibyba T. 1973. Physiological studies on gonadal maturation of fishes. Sexual differences in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. *Bull Japan Soc Sci Fish.* **39**,1091-1106.
- Albertini L. (1985). Recherches cytologiques et expérimentales sur l' ovogenèse chez la moule (*Mytilus edulis* L., mollusque bivalve).
Thèse de 3ième cycle, Université de Caen, Caen
- Al-Subiai SN, Moody AJ, Mustafa SA, Jha AN. 2011. A multiple biomarker approach to investigate the effects of copper on the marine bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 74, 1913-20.
- Amdam GV, Norberg K, Fondrk MK, Page RE. 2004. Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:11350-11355.
- Amirante GA. 1972. Immunochemical studies on rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Rich.) lipovitellin. *Acta Embryol Exp. Suppl.* pp. 373-383.
- Anderson, K.L., Woodruff, R.I., 2001. A gap junctionally transmitted epithelial cell signal regulates endocytic yolk uptake in *Oncopeltus fasciatus*. *Dev Biol* 239, 68–78.
- Ankley GA, Mihaich E, Stahl R, Tillitt D, Colborn T, McMaster S, Miller R, Bantle J, Cambell P, Denslow N, Dickerson R, Folmar L, Fry M, Giesy J, Gray LE, Guiney P, Hutchinson T, Kennedy S, Kramer V, LeBlanc G, Mayes M, Nimrod A, Patino R, Peterson R, Purdy R, Ringer R, Thomas P, Touart L, Van Der Kraak G, Zacharewski T. 1998. Overview of a workshop on screening

methods for detecting potential (anti-)estrogenic/androgenic chemicals in wildlife.
Environ Toxicol Chem. **17**,68-87.

Apisawetakan S, Linthong V, Wanichanon C, Phanasoponkul S, Meepol A, Kruatrachue M, Uphatam ES, Pumthong T, Sobhon P. 2001. Ultrastructure of female germ cells in *Haliotis asinina* Linnaeus – *Invert. Reprod. Develop.* 39:1 67-69
Invertebrate reproduction and development, 39:1 67-69

Bailey RE. 1957. The effect of oestradiol on serum calcium, phosphorus and protein of goldfish.
J Exp Zool. **136**,455-469.

Baker BS, Steven J, Tata JR. 1985. Vitellogenin gene and their products in closely and distantly related species of *Xenopus*. *Biochem Physiol* 82B, 497-505.

Barber, C., Bates, L., Taylor, K. & Patterson, B. 1991, 'Organic contamination of groundwater in an unconfined aquifer beneath an urban area: control or cleanup?' , in *Proceedings International Hydrology and Water Resources Symposium*, ed. , National Conference Publication 91/22:311-316, Institution of Engineers, Perth, Australia.

Baeuerle, PA, Huttner, WB, 1987. Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification.
J Cell Biol 105, 2655–2664.

Barr PJ. 1991. Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases.
Cell 66, 1–3.

Bayne BL, Gabbott PA, Widdows J. 1975. Some effects of stress in the adult, on the eggs and larvae of *Mytilus edulis* L. *J Mar Biol Ass U.K.*, 55:675-690

Bayne BL, Bubel A, Gabbott PA, Livingstone DR, Lowe DM, Moore MN. 1982. Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* L. *Marine Biology Letters* 3:89–105 (1982).
Mar Biol Lett 3:89–105 (1982).

Barik SK, Jena JK, Janaki KR. 2004. In vitro explant culture of mantle epithelium of freshwater pearl mussel. *Indian J Exp Biol.* 42(12):1235-8.

Blaise, C, Gagné F, Pellerin J, Hansen PD. 1999. Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): a potential biomarker for endocrine disruption. *Environ Toxicol* 14, 455–465.

Blaise C, Gagné F, Salazar M, Salazar S, Trottier S, Hansen PD. 2003. Experimentally induced feminisation of freshwater mussels after long-term exposure to a municipal effluent.
Fresenius Environ Bull 12:865–70.

Blumenthal T, Zucker-Aprison, E, 1987. Evolution and regulation of vitellogenin genes. In: Connor, J.D.O. (Ed.), *Mol. Biol. Invert. Develop.* Alan R. Liss, New York, pp. 3–19.
Molecular Biology of Invertebrate Development. Alan R. Liss, New York, pp. 3–19.

Bose SG, Raikhel, A.S., 1988. Mosquito vitellogenin subunits originate from a common precursor.
Biochem Biophys Res Commun. 155, 436–442.

- Brooks RA, Woodruff RI, 2004. Calmodulin transmitted through gap junctions stimulates endocytic incorporation of yolk precursors in insect oocytes. *Dev Biol.* 271, 339–349.
- Brock ML, Shapiro DJ. 1983. Estrogen stabilizes vitellogenin mRNA against cytoplasmatic degradation. *Cell.* 34,207-214.
- Buisine N, Trichet V, Wolff J. 2002. Complex evolution of vitellogenin genes in salmonid fishes. *Mol Genet Genomics.* 268,535-542.
- Byrne BM, Gruber M, Ab G. 1989. The evolution of egg yolk proteins. *Progress Biophys Molec Biol* 53:33–69.
- Cabrera, A.R., Donohue, K.V., Roe, R.M., 2009a. Regulation of female reproduction in mites: a unifying model for the Acari. *J Insect Physiol.* 55, 1079–1090.
- Cabrera, A.R., Donohue, K.V., Khalil, S.M.S., Sonenshine, D.E., Roe, R.M., 2009b. Characterization of vitellin protein in the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J Insect Physiol.* 55, 655–661.
- Càceres-Martínez J, Figueras A. 1998. Long-term survey on wild and cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) reproductive cycles in the Ria de Vigo (NW Spain). *Aquaculture* 162,141–156.
- Campbell CM, Idler DR. 1976. Hormonal control of vitellogenesis in hypophysectomised winter flounder. *Gen Comp Endocrinol.* 28,143-150.
- Campanile C, Limatola E, Ghiara G. 1977. Morphometric analysis of the cell surface modifications in oocytes during auxocytosis in *Lacerta sicula* Raf. *J. Submicrosc Cytol.* 10, 109.
- Canesi L, Borghi C, Ciacci C, Fabbri R, Vergani L, Gallo G. 2007. Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. *Mol Cell Endocrinol* 276, 36–44.
- Carnevali O, Carletta R, Cambi A, Vita A, Bromage N. 1999. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: involvement of two lysosomal proteinases. *Biol Reprod.* 60,140-146.
- Cato AC, Heitlinger E, Ponta H, Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Bailly A, Rauch C, Milgram E. 1988. Estrogen and progesterone receptor-binding sites on the chick vitellogenin II gene: synergism of steroid hormone action. *Mol Cell Biol.* 8,5323-5330.
- Ceballos-Vázquez BP, Arellano-Martínez M, García-Domínguez F, Villalejo-Fuerte M. 2000. Reproductive cycle of the rugose pen shell, *Pinna rugosa* Sobewey, 1835 (Mollusca: Bivalva) from Bahía Concepción, Gulf of California and its relation to temperature and photoperiod - *J Shellfish Res.* 19(1):95-99
- Ciocan CM, Cubero-Leon E, Alin M, Puinean AM, Hill EM, Minier C, Osada M, Fenlon K, Rotchell JM. 2010. Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environ Pollut.* 158, 2977-2984

- Checa A. 2000. A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue Cell*. 32:405–416.
- Chen JM, Cooper DN, Chuzhanova N, Ferec C, Patrinos GP. 2007. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. *Nat Rev Genet*. 8:762-775.
- Chen, JS, Cho WL, Raikhel AS. 1994. Analysis of mosquito vitellogenin cDNA similarity with vertebrate phosphovitins and arthropod serum proteins. *J Mol Biol* 237, 641–647.
- Chen JS, Sappington TW, Raikhel AS. 1997. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. *J Mol Evol*. 44,440-451.
- Chen S, Armistead JS, Provost-Javier KN, Sakamoto JM and Rasgon JL. 2010. Duplication, concerted evolution and purifying selection drive the evolution of mosquito vitellogenin genes. *BMC Evol Biol*. 13;10:142.
- Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS, 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*. 265, 3116–3123.
- Chung-Wai Ho F, Vanstone WE. 1961. Effect of oestradiol benzoate on some serum constituents of maturing sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *J Fish Res Bd Canad*. 18,859-864.
- Ciocan CM, Cubero-Leon E, Puinean AM, Hill EM, Minier C, Osada M, Fenlon K, Rotchell JM. 2010. Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environ Pollut*. 158, 2977-84.
- Clark NB. 1967. Influence of oestrogens upon serum calcium, phosphate and protein concentrations of freshwater turtles. *Comp Biochem Physiol*. 20,823-834.
- Craik JCA. 1978. The effects of oestrogen treatment on certain plasma constituents associated with vitellogenesis in the elasmobranch *Scyliorhinus canicula*. *Gen Comp Endocrinol*. 35,455-464.
- Crespo CA Espinosa J. 1990. Reservas Bioenergeticas en *Mytilus*. Estrategia Celular. University of Santiago de Compostela. Santiago de Compostela
- Danellakis D, Ntaikou I, Kornaros M, Dailianis S. 2011. Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*. 101, 358-66.
- Danzo BJ. 1997. Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ Health Perspect*. 105,294-301
- Davey KG, 1993. Hormonal integration of egg production in *Rhodnius prolixus*. *Americ. Zoolog*. 33, 397–402. *American Zoologist* 33, 397–402.
- Della-Cioppa G, Engelmann F. 1987. The vitellogenin of *Leucophaea maderae*:

synthesis as a large phosphorylated precursor. *Insect Biochem.* 17, 401–405.
Insect Biochemistry 17, 401–405.

De Stasio R, Borrelli L, Kille P, Parisi E, Filosa S. 1999. Isolation, characterization and molecular cloning of Cathepsin D from lizard ovary: changes in enzyme activity and mRNA expression throughout ovarian cycle. *Mol. Reprod. Dev.* **52**,126-134.

Denslow ND, Chow M, Kroll KJ, Green L. 1999. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicol.* 8, 385-398

Dhadialla, TS, Raikhel, AS. 1990. Biosynthesis of mosquito vitellogenin. *J Biol Chem.* 265, 9924–9933.

Dhadialla, TS, Hays AR, Raikhel AS. 1992. Characterization of the solubilized mosquito vitellogenin receptor. *Insect Biochem Mol Biol.* 22, 803–816.
Insect Biochemistry and Molecular Biology 22, 803–816.

Dimitriadis VK. 2001. Structure and Function of the digestive system in stylommatofora. In: Barker GM, ed. *The Biology of Terrestrial Molluscs*. New York: CABI Publishing, pp. 237–257.

Dimitriadis VK, Domouhtsidou GP, Cajaraville MP. 2004. Cytochemical and histochemical aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in relation to function. *J Mol Histol* 35: 501–509.

Dorange G, Le Pennec M. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Mar Biol.* 103:339 348

Duarte CA, Giarratano E, Amin OA, Comoglio LI. 2011. Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Mar Pollut Bull.* 62, 1895-904.

Duinker A, Haland L, Hovgaard P, Mortensen S. 2008. Gonad development and spawning in one and two year old mussels (*Mytilus edulis*) from Western Norway .
J Mar. Biol. Ass. U.K. 88(7), 1465–1473.

Eckelbarger KJ, Blades-Eckelbarger PI. 1989. Structure of the ovotestis and evidence for heterosynthetic incorporation of yolk precursors in the oocytes of the nudibranch mollusc, *Spurilla neapolitana*. *J Morph* 201:105-118

Eckelbarger KJ. 1994. Diversity of metazoan ovaries and vitellogenic mechanisms: implications for life history theory. *Proc Biol Soc Wash* 107:193-218

Eckelbarger KJ, Davis CV. 1996. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* I. Ovary and oogenesis.
Mar Biol 127:79-87

Evans MI, Silva R, Burch JB. 1988. Isolation of chicken vitellogenin I and III cDNAs and the developmental regulation of five estrogen-responsive genes in the embryonic liver. *Genes Dev.* 2, 116–124.

Focardi S. e Leonzio C., 2000. I biomarcatori nel monitoraggio costiero.
Biol. Mar. Medit. 8 (2) 136-145.

- Follett BK, Redshaw MR. 1968. The effects of oestrogen and gonadotrophins on lipid and protein metabolism in *Xenopus laevis*. *J. Endocrinol.* **40**,439-456.
- Field IA. 1922. Biology and economic value of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Bull. U. S. Burl Fish.*, 38: 127-259 (1922).
- Fleming WR, Stanley JG, Meier AH. 1964. Seasonal effects of external calcium, oestradiol and ACTH on the serum calcium and sodium levels of *Fundulus Kansae*. *Gen Comp Endocrinol.* **4**,61-67.
- Flouriot G, Pakdel F, Ducouret B, Valotaire Y. 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. [*J Mol Endocrinol.* 15\(2\):143-51.](#)
- Gabbott PA. 1976. Energy metabolism. In Bayne B.L. (ed.) Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 293–355.
- Gabbott PA. 1983. Development and seasonal changes metabolic activities in marine molluscs. The mollusca, environmental biochemistry and physiology, BK. 2. New York: Academic Press pp 165-217
- Gabbott P, Peek K. 1991. Cellular biochemistry of the mantle tissue of the mussel *Mytilus edulis* L. *Aquaculture* 94:165–176.
- Gagné, F, Blaise, C. 1998. Estrogenic properties of municipal and industrial wastewaters evaluated with a rapid and sensitive chemoluminescent in situ hybridization assay (CISH) in rainbow trout hepatocytes. *Aquat Toxicol.* **44**, 83–91.
- Gagné, F, Blaise, C, Salazar M, Salazar S, Hansen PD. 2001a. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **128(2)**, 213–225.
- Gagné, F., Blaise, C., Lachance, B., Sunahara, G.I., Sabik, H., 2001b. Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Environ Pollut.* **115**, 97–106.
- Gagné F, Blaise C, Pellerin J, Gauthier-Clerc S. 2002. Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord. *Mar Environ Res*;53:295–310.
- Gagné F, Blaise C, Pellerin J, Pelletier E, Douville M, Gauthier-Clerc S, Viglino L. 2003. Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence river (Quebec, Canada). *Comp Biochem Physiol.* **134(2)**:189-98.
- Gagné F, Blaise C, Pellerin J. 2005a. Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus* sp. collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada. *Environ Res*; 98:89–99.
- Gagné F, André C, Blaise C. 2005b. Increased vitellogenin gene expression in the mussel *Elliptio complanata* exposed to estradiol-17 β . *Fresenius Environ Bull.* **14(10)**:861–6.

- Garmendia L, Soto M, Vicario U, Kim Y, Cajaraville MP, Marigómez I. 2011. Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: tissue-level biomarkers and histopathology. *J Environ Monit.* 13, 915-32.
- Gaulejac de B, Henry M, Vicente N. 1995. An ultrastructural study of gametogenesis of the marine bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) 1. Oogenesis. *J mollusc Stud.* 61:375-392
- Geistle JF, Callard IP. 1972. Reproduction and oestrogen-induced vitellogenesis in *Dipsosaurus dorsalis*. *Comp Biochem Physiol.* 42A,791-801.
- Giorgi, F., Cecchetti, A., Falleni, A., Masetti, M., Gremigni, V., 1998. Vitellogenin is glycosylated in the fat body of the stick insect *Carausius morosus* and not further modified to the ovarian follicle. *Micron* 29, 451-460.
- Germond, JE, ten Heggeler B, Schubiger JL, Walker P, Westley B, Wahli W. 1983. Vitellogenin B2 gene in *Xenopus laevis*: isolation, in vitro transcription and relation to other vitellogenin genes. *Nucleic Acids Res.* 11, 2979-2997.
- Germond JE, Walker P, ten Heggeler B, Brown-Luedi M, de Boni E, Wahli W. 1984. Evolution of vitellogenin genes: comparative analysis of the nucleotide sequences downstream of the transcription site of four *Xenopus laevis* and one chicken gene. *Nucleic Acids Res.* 12,8595-8609.
- Gerber-Huber S, Nardelli D, Haefliger JA, Cooper DN, Givel F, Germond JE. 1987. Precursor-product relationship between vitellogenin and the yolk proteins as derived from the complete sequence of a *Xenopus* vitellogenin gene. *Nucleic Acids Res.* 15, 4737-4760.
- Ghiara G, Limatola E, Filosa S. 1968. Ultrastructural aspects of nutritive process in growing oocytes of lizard. *Electron Microsc. Roma* 2, 331-332.
- Giorgi, F., Bradley, J.T., Nordin, J.H., 1999. Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. *Micron* 30, 579-596.
- Giorgi F, Snigirevskaya ES, Raikhel AS. 2005. The cell biology of yolk protein precursor synthesis and secretion. *Reprod Biol Invert.*, 12, 33-68.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 249, 5153-5162.
- Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS. 1979. Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279, 679-685.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ, 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol.* 1, 1-39.
- Gorinstein S, Arancibia-Avila P, Moncheva S, Toledo F, Trakhtenberg S, Gorinstein A, Goshev I, Namiesnik J. 2006. Changes in mussel *Mytilus galloprovincialis* protein profile as a reaction of water pollution. *Environ Int.* 32, 95-100.

- Goulas A, Triplett EL, Tabrosky G. 1996. Oligophosphopeptides of varied structural complexity derived from the egg phosphoprotein, phosvitin. *J Pro. Chem.* 15, 1–9. *Journal of Protein Chemistry* 15, 1–9.
- Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam GV, Barchuk AR, Omholt S, Simoes ZL, Hartfelder K. 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett*, 579:4961-4965.
- Guillette LJ Jr, Crain DA, Rooney AA, Pickford DB. 1995. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ Health Perspect.* **103** Suppl 7: 157–164
- Hagedorn HH, Maddison DR, Tu Z. 1998. The evolution of vitellogenins, cyclorrhaphan yolk proteins and related molecules. *Adv Insect Physiol.* 27, 335–384. *Advances in Insect Physiology* 27, 335–384.
- Harh WE. 1967. Oestradiol-induced vitellogenesis and concomitant fat mobilisation in the lizard *Uta stansburiana*. *Comp Biochem Physiol.* **23**,83-93.
- Hellou J, Yeats P, Steller S, Gagné F. 2003. Chemical contaminants and biological indicators of mussel health during gametogenesis. *Environ Toxicol Chem*; 22:2080–7.
- Hellsten U, Khokha MK, Grammer TC, Harland RM, Richardson P, Rokhsar D.S., 2007. Accelerated gene evolution and subfunctionalization in the pseudotetraploid frog *Xenopus laevis*. *BMC Biol.* 5, 31. *BMC Biology* 5, 31.
- Hemmer MJ, Bowman CJ, Hemmer BL, Friedman SD, Marcovich D, Kroll KJ, Denslow ND. 2002. Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*), after cessation of exposure to 17-estradiol and p-nonylphenol. *Aquat Toxicol* 58, 99–112.
- Henry M, Boucaud-Camou E, Lefort Y. 1991. Functional microanatomy of the digestive gland of the scallop *Pecten maximus* (L.). *Aquat Living Resour* 4: 197–202.
- Heppel SA, Denslow ND, Folmar LC, Sullivan CV, 1995. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 103, 9–15.
- Herry A, Le Pennec M. 1987. Ultrastructure de la gonade d'un Mytilidae hydrothermal profond de la ride du Pacifique Oriental. *Haliotis, Paris* 16:295-307
- Herz J, Clouthier DE, Hammer RE. 1992. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-Pal-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71(3), 411–421.
- Hiramatsu N, Matsubara T, Fujita C, Sullivan CV, Hara A. 2006. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Mar Biol* 149, 35–47.
- Huttner WB, 1988. Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annu Rev Physiol.* 50, 363–376.
- Ilenchuk,TT, Davey KG. 1987. Effects of various compounds on Na/K-ATPase

- activity, JH I binding capacity and Patency response in follicles of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.* 17, 1085–1088.
- Imboden H, Konig R, Ott P, Lustig A, Kampfer U, Lanzrein B, 1987. Characterization of the native vitellogenin and vitellin of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*, and comparison with other species. *Insect Biochem.* 17, 353–365.
- Ishikawa SSI, Yano K, Arihara K, Iitoh M. 2004. Egg yolk phosvitin inhibits hydroxyl radical formation from the Fenton reaction. *Biosci Biotechnol Biochem*;68:1324–31.
- Janz DM, McMaster ME, Munkittrick KR, Van der Kraak G. 1997. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicol Appl Pharmacol.* 147(2):391-8.
- Jackson RL, Lin HY, Mao JT, Chan L, Means AR. 1977. Estrogen induction of plasma vitellogenin in the cockerel: studies with a phosvitin antibody. *Endocrinol*;101:849–57.
- Johnson MA, Le Pennec M (1994) The development of the female gamete in the endosymbiont-bearing bivalve *Loripes luninalis*. *J mar biol Ass UK* 74:233-242
- Kajiwara M, Kuraku S, Kurokawa T, Kato S, Hirose H, Takahashi S, Shibata Y, Iguchi, T, Matsumoto T, Miyata T, Miura T, Takahashi Y. 2006. Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, *Thais clavigera*. *Gen Comp Endocrinol* 148(3): 315-326.
- Kawooya JK, Osir EO, Law JH. 1986. Physical and chemical properties of microvitellogenin. A protein from the egg of tobacco hornmoth, *Manduca Sexta*. *J Biol Chem.* 261, 10844–10849.
- Keay, J., Bridgham, J.T., Thornton, J.W., 2006. The *Octopus vulgaris* estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: evolutionary and functional implications. *Endocrinol* 147, 3861–3869.
- Kim IC, Chang SY, Williams TD, Kim YJ, Yoon YD, Lee YS, Park EH, Lee JS. 2004. Genomic cloning and expression of vitellogenin gene from the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus*. *Mar Environ Res.* 58,687-691.
- Kishida M, Nakao R, Novillo A, Callard IP, Osada M. 2005. Molecular cloning and expression analysis of cDNA fragments related to estrogen receptor from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Proc. Jpn. Soc. Comp. Endocrinol.* 20, 75.
- Klein-Hitpass L, Schorpp N, Wagner U, Ryffel GU. 1986. An estrogenresponsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell.* 46,1053-1061.
- Klein-Hitpass L, Kaling M, Ryffel GU. 1988. Synergism of closely adjacent estrogen-responsive elements increases their regulatory potential. *J Mol Biol.* 201,537-544.
- Komazaki S, Hiruma T. 1999. Degradation of yolk platelets in the early amphibian embryo is regulated by fusion with late endosomes. *Dev Growth Differ.* 41,173-181.

- Kunduz B, Erkan M. Seasonal Changes in the Histological Profile of the Ovary of *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mytilidae) Lamarck, 1819. J. Black Sea/Mediterranean Environment Vol. 14: 183-191
- Latonnelle K, Fostier A, Le Menn F, Bennetau-Pelissero C. 2002b. Binding affinities of hepatic nuclear estrogen receptors for phytoestrogens in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Gen Comp Endocrinol.* **129**,69-79.
- LaFleur GJ, Byrne BM, Kanungo J, Nelson LD, Greenberg RM, Wallace RA. 1995a. *Fundulus heteroclitus* vitellogenin: the deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline, liquid-phase yolk protein. *J Mol Evol.* **41**,505-521.
- LaFleur GJ, Byrne BM, Haux C, Greenberg RM, Wallace RA. 1995b. liver-derived cDNAs: vitellogenins and vitelline envelope protein precursor (choriogenins). *Int Symp Reprod Physiol Fish.* **5**,336-338.
- Le Gall S, Feral C, Lengronne C, Porchet M. 1987. Partial purification of the endocrine of mitogenic factor in the mollusc *Crepidula fornicata* L. *Comp Biochem Physiol* 86B:393-396
- Levin, E.R., 2005. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol. Endocrinol.* 19, 1951–1959
- Li Q, Osada M, Suzuki T, Sato M, Mori K. 1998a. Degradation of vitellin during embryonic and larval development in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebr Reprod Dev.* 33:1–9.
- Li Q, Osada M, Suzuki T, Mori K. 1998b. Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 β on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebr Reprod Dev.* 33:87–93.
- Li WH: *Molecular Evolution*. Sinauer Assocs: Sunderland, MA; 1999.
- Limatola E, Filosa S. 1989. Exogenous vitellogenesis and micropinocytosis in the lizard *Podarcis sicula* treated with follicle-stimulating hormone. *Gen Comp Endocrinol.* **75**,165-176.
- Livingstone DR, Chipman JK, Lowe DM, Minier C, Mitchelmore CL, Moore MN, et al. 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: Recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Int J Environ Pollut* 13:56–91
- Lobo-da Cunha A. 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the basophilic cells in the hepatopancreas of *Aplysia depilans* (Mollusca, Opisthobranchia). *Tissue Cell* **31**(1): 8–16.
- Lobo-da Cunha A. 2000. The digestive cells of the hepatopancreas in *Aplysia depilans* (Mollusca, Opisthobranchia): Ultrastructural and cytochemical study. *Tissue Cell* 32(1): 49–57.
- Long M, Betran E, Thornton K, Wang W. 2003. The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nat Rev Genet*, 4:865-875.
- Lowe DM, Moore MN, Bayne BL. 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J Mar Bio Ass U.K.* 62:133–145

- Lubet P. 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilides et les pectinides. *Rev Trav Inst Pêches marit.* 23, 1959.
- Lubet P, Herlin P, Mathieu M, Collin F. 1976. Tissu de réserve et cycle sexuel chez les Lamellibranches. *Haliotis*. 7:59-62 (1976)
- Lubet P. 1981. Action de la température sur le cycle de reproduction des Lamellibranches. *Bull. Soc. Zool. France* 106:283-292 Tabo, Chile. *The Veliger* 24:147-154
- Lubet P, Mathieu M. 1990. Les régulations endocriniennes chez les mollusques bivalves. *Année Biologique* 29:235-252
- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdá J. 2010. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 36-389
- Lubet P, Besnard JY, Faveris R, Robbins R. 1987. Physiologie de la reproduction de la coquille St-Jacques (*Pecten maximus*). *Oceanis* 13:265-290
- Machado EA, Atella GC, Gondim KC, de Souza W, Masuda H. 1996. Characterization and immunocytochemical localization of lipophorin binding sites in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 31,185-196.
- Mancebo MJ, Trevino M, Ferran E, Espinosa J. 1992. Pattern of the mantle adenylate cyclase activity during the reproductive cycle of the female *Mytilus galloprovincialis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86:184-188.
- Marin MG, Moschino V, Deppieri M, Lucchetta L. 2003. Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of *T. philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquacult* 219, 859-871. *Aquaculture* 219, 859-871.
- Marin MG, Matozzo V. 2004. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Mar Pollut Bull* 48, 835-839
- Mathieu M, Lenoir F, Robbins I. 1988. A gonial mitosis-stimulating factor in cerebral ganglia and haemolymph of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Gen Comp Endocrinol* 72:257-263
- Mathieu M, Robbins I, Lubet P. 1991. The neuroendocrinology of *Mytilus edulis*. *Aquaculture* 94:213-223
- Mathieu M, Lubet P. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves: a brief review. - *Invert Reprod Dev* 23:123-129
- Matozzo V, Marin MG. 2005. Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? *Environ Res* 97 43-49
- Matozzo V, Marin MG. 2007. 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* 55 494-504
- Matozzo V, Gagné F, Marin MG, Ricciardi F, Blaise C. 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environ Int.* 34, 531-545

- Matsumoto T, Nakamura AM, Mori K, Kayano T. 2003. Molecular Characterization of cDNA Encoding Putative Vitellogenin from the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Zoolog Sci.* 20:37-42
- Matsumoto, T., Nakamura, A.M., Mori, K., Akiyama, I., Hirose, H., Takahashi, Y., 2007. Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. *Gen Comp Endocrinol.* 151, 195-201.
- Matsumoto T, Yamano K, Kitamura M, Hara A. 2008. Ovarian follicle cells are the site of vitellogenin synthesis in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 149, 293–298.
- Mazzini, M., Burrini, A., Giorgi, F., 1989. The secretory pathway of vitellogenin in the fat body of stick insect *Bacillus rossius*: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue Cell.* 21, 609–624.
- Mikhailov A.T., Torrado M., Mendez J. 1995. Sexual differentiation of reproductive tissue in bivalve molluscs: identification of male associated polypeptide in the mantle of *Mytilus galloprovincialis*. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 545-548
- Mikhailov AT, Torrado M, Méndez J, López MJ. 1996. Annual cycle of expression of connective tissue polypeptide markers in the mantle of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Biol* 126:77–89
- Miller MS, Benore PM, White HB. 1982. Dephosphorylation of chicken ribo-flavin-binding protein and phosvitin decreases their uptake by oocytes. *J Biol Chem* 257, 6818–6824. *Journal of Biological Chemistry* 257, 6818–6824.
- Monteverdi GH, Di Giulio RT. 1999. An enzyme-linked immunosorbent assay for estrogenicity using primary hepatocyte cultures from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Arch Environ Contam Toxicol*;37:62–9.
- Moore MN, Allen JI. 2002. A computational model of the digestive gland epithelial cell of the marine mussel and its simulated responses to aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Res* 54, 579–584.
- Morton BS. 1983. Feeding and digestion in bivalves. In: Saleuddin ASM, Wilburg M, eds. *The Mollusca, Physiology, Vol. 5, Part 2*. New York: Academic Press, pp. 563–586.
- Mourazos MJ, Torrado M, Mikhailov AT. 2001. Reproductive-tract formation in the mantle of post-metamorphic mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819): model system for studying gonad duct morphogenesis. *Serie Monográfica Instituto Canario de Ciencias Marinas* 4:538–543
- Mori K, Muramatsu T, Nakamura Y. 1969. Effect of steroid in oyster-III. Sex reversal from male to female in *Crassostrea gigas* by estradiol-17 β . *Bull Jap Soc Sci Fish*; 35(11):1072–6.
- Mosconi G, Carnevali O, Franzoni MF, Cottone E, Lutz I, Kloas W, Yamamoto K, Kikuyama S, Polzonetti-Magni AM. 2002. Environmental estrogens and reproductive biology in amphibians. Minireview. *Gen Comp Endocrinol.* 126,125-129.
- Mouchel, N., Trichet, V., Betz, A., Le Penec, J.P., Wolff, J., 1996. Characterization of

vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene* 174, 59–64.

Mouchel N, Trichet V, Naimi BY, Le Pennec JB, Wolff J. 1997. Structure of a fish (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin gene and its evolutionary implications. *Gene*. **197**,147-152.

Motavkine PA, Varaksine AA. 1983. Histophysiologie du systeme nerveux et regulation de la reproduction chez les mollusques bivalves. Nauka, Moscow

Nardelli D, Gerber-Huber S, Van Het Schip FD, Gruber M, AB G, Wahli W. 1987. Vertebrate and nematode genes coding for yolk proteins are derived from a common ancestor. *Biochemistry* 26,6397-6402.

Nakamura A, Yasuda K, Adachi H, Sakurai Y, Ishii N, Goto S. 1999. Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis legans*. *Biochem Biophys Res Comm*, 264:580-583.

Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE, Amdam GV. 2007. The vitellogenin gene has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol*, 5(3):e62.

Newell, R.I.E., 1989. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (North and Mid-Atlantic)—blue mussel. US Fish Wildlife Service for Biology and Reproduction 82(11.102). US Army Corps of Engineers, TR EL-82-4.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U. 2002. Molluscs as bioindicators. In: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (eds.) Bioindicators and biomonitorings. Elsevier, New York, NY, p 577

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W, Ternes TA. 2006. Bisphenol A induces superfeminisation in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: prosobranchia) at environmental relevant concentrations. *Environ. Health Perspect.* 114, 127–133.

Orrego R, Burgos A, Moraga-Cid G, Inzunza B, Gonzalez M, Valenzuela A, Barra R, Gavilan JF. 2006. Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): biomarker responses along a pollution gradient in the Biobio River, Chile. *Environ Toxicol Chem* 25, 2280–2287.

Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP. 2006. Biomarkers of Exposure and Reproduction-Related Effects in Mussels Exposed to Endocrine Disruptors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 361–369

Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP. 2010. Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Ecotoxicol Environ Saf.* 73, 693–701

Osada, M., Takamura, T., Sato, H., Mori, K., 2003. Vitellogenin synthesis in the ovary of the scallop, *Patinopekten yessoensis*: control by estradiol-17 β and the central nervous system. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 299, 172–179.

Osada M, Harata M, Kishida M, Kijima A. 2004. Molecular Cloning and Expression Analysis of Vitellogenin in Scallop, *Patinopekten yessoensis* (Bivalvia, Mollusca) *Mol Reprod Dev.* 67:273–281

- Osada M, Suzuki T, Mori K. 1998. Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 β in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invert Reprod Develop* 33:1 87-93
Invertebrate Reproduction and Development 33:1 87-93
- Owen G (1970) The fine structure of the digestive tubules of the marine bivalve *Ostrea edule*. *Philos Trans R Soc Lond B* 258:245–260.
- Owen G (1972) Lysosomes, peroxisomes and bivalves. *Sci Prog Oxf* 60: 299–318.
- Owen G (1973) The fine structure and histochemistry of the digestive diverticula of the protobranchiate bivalve *Nucula sulcata*. *Proc R Soc Lond (B)* 183: 249–264.
- Palace V, Evans RE, Wautier K, Baron C, Vandenbyllardt L, Vandersteen W, Kidd K. 2002. Induction of vitellogenin and histological effects in wild fathead minnows from a lake experimentally treated with the synthetic estrogen, ethynylestradiol. *Water Qual. Res. J. Can.* 37, 637–650.
- Palmer BD, Palmer SK. 1995. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the reared turtle and African clawed frog. *Environ Health Perspect*;103:19–25.
- Pampanin DM, Marangon I, Volpato E, Campesan G, Nasci C. 2005. Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). *Environ Pollut* 2005;136:103–7.
- Pan ML, Bell WJ, Tefler WH. 1969. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science*. **165**, 393-294
- Pazos AJ, Román G, Perez-Acosta C, Abad M, Sànche JL. 1997. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximum* L. from suspended culture in the Ria the Aurosa (Galicia N.W. Spain) in relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 26:217-230
- Pearse BMF, Crowther RA. 1987. Structure and assembly of coated vesicles. *Annu Rev Biophysiol Chem.* 16, 49 –72.
- Peek K, Gabbott PA. 1989. Adipogranular cells from the mantle tissue of *Mytilus edulis* L. I. Isolation, purification and biochemical characteristics of dispersed cells. *J Exp Mar Biol Ecol.* 126:203–216
- Pipe RK. 1985. Seasonal cycles and effects of starvation on egg development in *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 24:121-128
- Pipe RK (1987a) Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Mar Biol* 95:405-414
- Pipe RK (1987b) Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 96:519-528
- Plack PA, Pitchard DJ. 1968. Effect of oestradiol 3-benzoate on the concentrations of retinal and lipids in cod plasma. *Biochem J.* **106**,257-262.

- Plack PA, Pritchard DJ, Fraser NW. 1971. Egg proteins in cod serum: natural occurrence and induction by injections of oestradiol 3-benzoate. *Biochem J.* **121**,847-856.
- Pojana G, Gomiero A, Jonkers N, Marcomini A. 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environ Int* **33**, 929–936
- Polzonetti-Magni AM, Mosconi G, Soverchia L, Kikuyama S, Carnevali O. 2004. Multihormonal control of vitellogenesis in lower vertebrates. *Int Rev Cytol* **239**, 1-46.
- Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC, Canesi L. 2006. Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* **143C**, 303–315.
- Prisco M, Ricchiari L, Andreuccetti P. 2002a. Ultrastructural studies on developing follicles of the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Mol Reprod Dev.* **61**,78-86
- Prisco M, Andreuccetti P, Ricchiari L, Romano M, Limatola E. 2002b. An ultrastructural study on the vitellogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata*. *Gen Comp Endocrinol.* **128**,171-179.
- Prisco M, Valiante S, Romano M, Ricchiari L, Liguoro A, La Forgia V, Limatola E, Andreuccetti P. 2004. Ovarian follicle cells in *Torpedo marmorata* synthesize vitellogenin. *Mol Reprod Dev.* **67**,424-429.
- Prisco M, Valiante S, Maddalena Di Fiore M, Raucci F, Del Giudice G, Romano M, Laforgia V, Limatola E, Andreuccetti P. 2008. Effect of 17 β -estradiol and progesterone on vitellogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata* Risso 1810 (Elasmobranchii: Torpediniformes): studies on females and on estrogen-treated males. *Gen Comp Endocrinol.* **157**(2):125-32.
- Prince VE, Pickett FB. 2002. Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat Rev Genet.* **3**:827-837.
- Provost-Javier KN, Chen S, Rasgon JL. 2010. Vitellogenin gene expression in autogenous *Culex tarsalis*. *Insect Mol Biol* 2010 in press.
- Puinean AM, Rotchell JM. 2006. Vitellogenin gene expression as a biomarker of endocrine disruption in the invertebrate, *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* **62**, S211–S214
- Puinean AM, Labadie P, Hill EM, Osada M, Kishida M, Nakao R, Novillo A, Callard IP, Rotchell JM. 2006. Laboratory exposure to 17 β -estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol* **79**, 376–383
- Quinn B, Gagne, F, Costello M, McKenzie C, Wilson J, Mothersil, C. 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat Toxicol.* **66**, 279-292.
- Raftopoulou EK, Dimitriadis VK. 2010. Assessment of the health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* along Thermaikos Gulf (Northern Greece): an integrative biomarker approach using ecosystem health indices. *Ecotoxicol Environ Saf.* **73**, 1580-7.

- Raikhel AS, Dhadialla TS, 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu Rev Entomol* 37, 217–251.
- Retzek H, Steyrer E, Sanders EJ, Nimpf J, Schneider WJ. 1992. Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation. *DNA Cell Biol.* 11,661-672.
- Renault L (1965) Observations sur l'ovogénèse et sur les cellules nourricières chez *Lamellaria perspicua* (L.) (Mollusque Prosobranchie). *Bull Mus natn Hist nat*, Paris 37:282-284
- Ricciardi F, Matozzo V, Marin MG. 2008. Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction. *Mar Pollut Bull.* 57, 365–372
- Riffesser M, Hock B. 2002. Vitellogenin levels in mussel hemolymph—a suitable biomarker for the exposure to estrogens? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 132, 75–84
- Rodhouse PG, Roden CM, Burneil GM, Hensey MP, Mc Mahon T, Ottway B, Ryan TH. 1984. Food source, gametogenesis and growth of *Mytilus edulis* on the shore and in suspended culture: Killary Harbour Ireland. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 64:513:529 (1984)
- Romano M, Limatola E. 2000. Oocyte plasma membrane proteins and the appearance of vitellogenin binding protein during oocyte growth in the lizard *Podarcis sicula*. *Gen Comp Endocrinol.* 118(3):383-92.
- Roth TF, Porter KR. 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of mosquito *Aedes aegypti*. *J. Cell Biol.* 20, 313–332.
- Rouille Y, Duguay SJ, Lund K, Furuta M, Gong Q, Lipkind G. 1995. Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Frontiers in Neuroendocrinology* 16, 322–361.
- Sappington TW, Raikhel AS. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem Mol Biol* 28, 277–300.
- Sato Y, Yamashita O, 1991. Synthesis and secretion of egg-specific protein from follicle cells of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 21, 233–238.
- Saucedo PE, Gómez-Robles E. 2008. Does gametogenesis occur naturally in pearl oyster mantle tissue? SPC Pearl Oyster Information Bulletin #18 – November 2008
- Schechtman AM. 1955. Ontogeny of blood and related antigens and their significance for the theory of differentiation. In: Butler EG (ed) *Biological specificity and growth*. Princeton University Press, Princeton, N.J., pp 3-31
- Seed R. 1969. The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. I. Breeding and settlement. *Oecologia* 3: 277-316
- Seed R, Suchanek. 1992. Population and community ecology of *Mytilus*. – In E.M. Goslig editor. - *The mussel Mytilus: ecology, physiology genetics and culture* -. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. pp 87-169

- Seehuus SC, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam GV. 2006. Reproductive protein protects sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:962-967.
- Segraves WA. 1994. Steroid receptors and other transcription factors in ecdysone response. *Recent Prog Horm Res* 49, 167–195.
- Selman K, Wallace RA. 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoolog Scie.* 6: 211-231.
- Serafim A, Lopes B, Company R, Cravo A, Gomes T, Sousa V, Bebianno MJ. 2011. A multi-biomarker approach in cross-transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicol.* 20, 1959-74.
- Shen X, Steyrer E, Retzek H, Sanders E J, Schneider W J. 1993. Chicken oocyte growth: Receptor-mediated yolk deposition. *Cell Tissue Res.* 272, 459–471.
- Silberzahn N (1979) Les cellules de la lignée femelle chez un hermaphrodite protandre *Crepidula fornicata*, mollusque prosobranche. *Annls Soc fr Biot Dev*, Paris 1:17-18
- Silva R, Fischer AH, Burch JB. 1989. The major and minor chicken vitellogenin genes are each adjacent to partially deleted pseudogenes copies of the other. *Mol Cell Biol.* 9,3557-3562.
- Sire MF, Babin PJ, Vernier JM. 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic developmental in trout. *J Exp Zool.* 269, 69-83
- Smolders R, Bervoets L, Wepener V, Blust R. 2003. A conceptual framework for using mussels as biomonitors in whole effluent toxicity. *Human Ecol Risk Assess* 9:741–760.
- Suàrez MP, Alvarez C, Molist P, San Jan F. 2005. Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the estuary of Vigo. *J Shellfish Res.* Vol. 24, No 2, 531-540.
- Snigirevskaya ES, Hays AR, Raikhel AS. 1997. Secretary and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors. *Cell Tissue Res.* 290, 129–142.
- Snigirevskaya ES, Raikhel AS. 2005. Receptor-mediated endocytosis of yolk proteins in insect oocytes. In: Raikhel, A.S., Sappington, T.W. (Eds.), *Progress in Vitellogenesis. Reproduct Biol Invertebr.* 12, 199–228.
- Solé M, Porte C, Barcelò D. 2000b. Vitellogenin induction and other biochemical responses in carp, *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17 alpha-ethynylestradiol. *Arch Environ Contam Toxicol.* 38, 494–500.
- Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrao FO. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103, 113–122.

- Soto AM, Maffini MV, Schaeberle CM, Sonnenschein C, 2006. Strengths and weaknesses of in vitro assay for estrogenic and androgenic activity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20, 15–33.
- Spieth J, Denison K, Kirtland S, Cane J, Blumenthal T. 1985. The *C. elegans* vitellogenin genes: short sequence repeats in the promotor regions and homology to the vertebrate genes. *Nucleic Acids Res* 13:5283-5295.
- Springer TA. 1998. An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor and extracellular matrix components. *J Mol. Biol.* 283, 837–862.
- Sumpter JP, Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103, 173–178.
- Suzuki HK, Prosser RL. 1968. The effects of oestradiol valerate upon the serum and bone of the lizard *Sceloporus cyanogenys*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 127,4-7.
- Suzuki T, Hara A, Yamaguchi K, Mori K. 1992. Purification and immunolocalization of a vitellin-like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 113, 239-245
- Taborsky G. 1991. On the interaction of phosvitins with ferric ion: solubility of the Fe(III)-phosphoprotein complex under acid conditions is a function of the iron/ phosphate ratio and the degree of phosvitin phosphorylation. *J Inorg Biochem.* 44, 65–70. *Journal of Inorganic Biochemistry* 44, 65–70.
- Telfer WH. 1961. The route of entry and localization of blood proteins in the oocytes of saturniid moths. *J Biophys Biochem Cytol.* 9, 747–759. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9, 747–759.
- Telfer WH. 1965. The mechanism and control of yolk formation. *Annu Rev Entomol.* 10, 161–184.
- Telfer WH. 1983. Arylphorin, a new protein from *Hylophora cecropia*: comparisons with caliphorin and manducin. *Insect Biochem.* 13, 601–613.
- Teshima KM, Innan H. 2004. The effect of gene conversion on the divergence between duplicated genes. *Genetics*, 166:1553-1560.
- Thompson R J. 1979. Fecundity and reproductive the blue mussel (*Mytilus edulis*), the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* and the snow crab (*Chionoecetes opilio*) from populations in Nova Scotia Newfoundland. *J Fish Res Bd Can.* 36: 955-964
- Thornton JW, Need E, Crews D. 2003. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signalling. *Science* 301, 1714-1717.
- Trewitt, PM, Heilmann, LJ, Degrugillier, SS, Kumaran, AK. 1992. The boll weevil vitellogenin gene: nucleotide sequence, structure, and evolutionary relationship to nematode and vertebrate vitellogenin genes. *J Mol Evol* 34, 478–492.

- Trichet V, Buisine N, Mouchel N, Morán P, Pendás AM, Le Pennec JP, Wolff J. 2000. Genomic analysis of the vitellogenin locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals a complex history of gene amplification and retroposon activity. *Mol Gen Genet*, 263:828-37.
- Tsutsui N, Kawazoe I, Ohira T, Jasmani S, Yang WJ, Wilder MN, Aida K. 2000. Molecular Characterization of a cDNA Encoding Vitellogenin and Its Expression in the Hepatopancreas and Ovary during Vitellogenesis in the Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*. *Zool. Sci.* 17: 651–660
- Tufail M, Hatakeyama M, Takeda M. 2001. Molecular evidence for two vitellogenin genes and processing of vitellogenins in the American cockroach *Periplaneta americana*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 48, 72–80.
- Tufail M, Takeda M. 2002. Vitellogenin of the cockroach, *Leucophaea maderae*: nucleotide sequence, structure and analysis of processing in the fat body and oocytes. *Insect Biochem Mol Biol.* 32, 117–134.
- Tufail M, Raikhel AS, Takeda M. 2005. Biosynthesis and processing of insect vitellogenins.. *Reprod. Biol. Inverteb.*, 12, 1–32.
- Tufail M, Takeda M. 2005. Molecular cloning, characterization and regulation of the cockroach vitellogenin receptor during oogenesis. *Insect Mol Biol* 14, 389–401.
- Tufail M, Bembenek J, Elgendy AM, Takeda M. 2007. Evidence for two vitellogenin-related genes in *Leucophaea maderae*: the protein primary structure and its processing. *Arch Insect Biochem Physiol*, 66:190-203.
- Tufail M, Takeda, M. 2007. Molecular cloning and developmental expression pattern of the vitellogenin receptor from the cockroach *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem Mol Biol.* 37, 235–245.
- Tufail M, Takeda M. 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *J Insect Physiol.* 54 1447–1458. *Journal of Insect Physiology* 54 1447–1458.
- Van Antwerpen, R., Pham, D.Q.-D., Ziegler, R., 2005. Accumulation of lipids in insect oocytes. *Reprod Bio Inverteb*, 12, 265–288.
- Van het Ship FD, Samallo J, Broos J, Ophuis J, Mojet M, Gruber M, AB G. 1987. Nucleotide sequence of a chicken vitellogenin gene and derived amino acid sequence of the encoded yolk precursor protein. *J Mol Biol.* 196,245-260.
- Vanstone WE, Dale DG, Oliver WF, Common RH. 1957. Sites of formation of plasma phosphoprotein and phospholipids in the oestrogenised cockerel. *Canad J Biochem Physiol.* 35,659-665.
- Vasudevan N, Pfaff DW. 2007. Membrane-initiated actions of estrogens in neuroendocrinology: emerging principles. *Endocr. Rev.* 28, 1–19.
- Verderame M, Limatola E. 2010. Molecular identification of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) and their differential expression during VTG synthesis in the liver of lizard *Podarcis sicula*. *Gen Comp Endocrinol.* 2010 Sep 1;168(2):231-8.

- Villalba A. – Gametogenic cycle of cultured mussel *Mytilus galloprovincialis* in the bays of Galicia (N.W. Spain) - *Aquaculture* 130:269-277 (1995)
- Wahli W, Dawid IB, Wyler T, Jaggi RB, Weber R, Ryffel GU. 1979. Vitellogenin in *Xenopus laevis* is encoded in a small family of genes. *Cell*. **16**,535-549.
- Wahli W, Dawid IB, Wyler T, Ryffel GU, Weber R. 1981. Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. *Science*. 212, 298-304.
- Wahli, W., Germond, J.E., ten Heggeler, B., May, F.R., 1982. Vitellogenin genes A1 and B1 are linked in the *Xenopus laevis* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 6832–6836.
- Wallace RA. 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in non mammalian vertebrates. *Dev Biol*. 1:127-77.
- Wallace, RA, Selman K. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron. Microsc. Tech.* 16: 175-201.
- Wang H, Yan JT, Gong Z. 2000. A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosphotyrosine domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene*. **256**,303-310.
- Wang H, Tan JTT, Emelyanov A, Korzh V, Gong Z. 2005. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene*. **356**,91-100
- Waksmonski SL, Woodruff RI. 2002. For uptake of yolk precursor, epithelial cell-cell gap junctional communication is required by insects representing six different orders. *J Insect Physiol* 48, 667–675.
- Widdows J, Donkin P. 1992. Mussel and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. *Aquaculture and Fisheries Science*. 25, 383-417.
- Wilder, J.A., Diaz, T., O'Neill, R.J.W., Kenney, J., Hollocher, H. (2002). Characterization and isolation of novel microsatellites from the *Drosophila dunni* subgroup. *Genet. Res. (Camb.)* **80(3)**: 177-185.
- Wiley HS, Wallace RA. 1981. The structure of vitellogenin. Multiple vitellogenins in *Xenopus laevis* give rise to multiple forms of the yolk proteins. *J Biol Chem*. 256,8626-8634.
- Woodhead PMJ. 1968. Seasonal changes in the calcium content of the blood of arctic cod. *J Mar Biol Assoc. UK*. **48**,81-91.
- Woodhead PMJ. 1969a. Effects of oestradiol and thyroxine upon the plasma calcium content of a shark *Scyliorhinus canicula*. *Gen Comp Endocrinol*. **13**,310-312.
- Woodhead PMJ. 1969b. Influence of oestradiol 3-benzoate upon the plasma content of calcium and vitamin A aldehydes in the cod, *Gadus morhua*. *J Mar Biol Assoc. U.K.* **49**,939-944.

Woods FH. 1931. History of the germ cell in *Sphaerium striatinum* (Lam.).
J Morph. 51:545-595.

Won SJ, Novillo A, Custodia N, Rie TM, Fitzgerald K, Osada M, Callard IP. 2005. The freshwater mussel (*Elliptio complanata*) as a sentinel species: vitellogenin and steroid receptors.
Integr Comp Biol. 45:72-80.

Worral C, Widdows J. 1984. Investigations of factor influencing mortality in *Mytilus edulis* L.
Mar Biol Lett. 5:85-98.

Wourms JP. 1987. Oogenesis. *Reprod Mar invertebrates.* 9, 50-157

Yoshizaki N, Yonezawa S. 1998. Cystein proteinase plays a key role for the initiation of yolk digestion during development of *Xenopus laevis*. *Dev Growth Differ.* **25**,659-667.

Yusko SC, Roth TF. 1976. Binding to specific receptors on oocyte plasma membrane by serum phosphovitin-lipovitellin. *J Supramol Struct.* 4, 89-97.

Zacharewski T. 1997. In vitro bioassays for assessing estrogenic substances.
Environ Sci Technol. **31**,613-623.