

Test in vitro di fagocitosi in cellule immunitarie del bivalve a rischio di estinzione *Pinna nobilis*



LIFE20-NAT/ES/001265

Francesca Carella¹, Patricia Prado^{2,3}, José Rafael García-March³, José Tena-Medialdea³, Emilio Cortés Melendreras⁴, Francisca Giménez Casaldueros⁵, 6 Antonia Feola¹, Antonio Porcellini¹

1. Department of Biology, University of Naples Federico II, Via Cinthia Complesso di Monte Sant Angelo, Naples, Italy; 2. IRTA-La Ràpita, Ctra. Poble Nou Km 5.5, 43540 Tarragona, Spain; 3. IMEDMAR-UCV; 3. Instituto de Investigación en Medio Ambiente y Ciencia Marina, Universidad Católica de Valencia, 03710 Calpe, Alicante, Spain; 4. Murcia University Aquarium, University of Murcia, 30002 Murcia; 5. CIMAR, University of Alicante, 03690 Alicante, Spain; 6. Department of Marine Science and Applied Biology, University of Alicante, 03690 Alicante, Spain

BACKGROUND

A partire dal 2016 eventi di mortalità di massa (MMEs) sono stati riportati nel mollusco bivalve endemico del mediterraneo *Pinna nobilis*. Ad oggi, circa il 98% della popolazione risulta scomparsa in mare aperto e solo poche popolazioni residue sono presenti solo in baie e lagune costiere.

SCOPO DEL LAVORO

valutare in campo la capacità di fagocitosi delle cellule immunitarie di *Pinna nobilis* in popolazioni naturali e in mantenute in cattività, nel contesto del progetto LIFE PINNARCA (LIFE20-NAT/ES/001265).

METODO

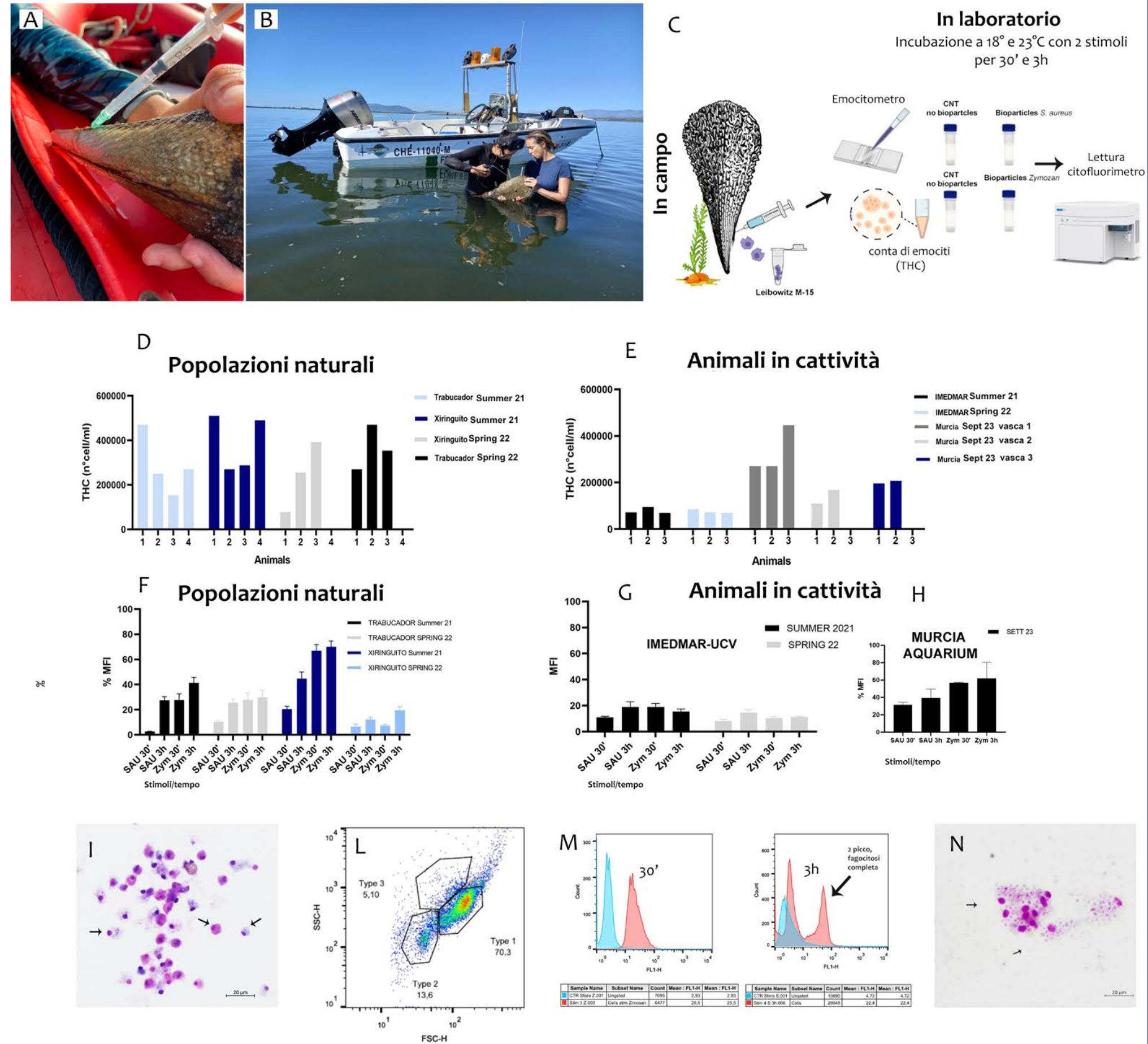
Lo studio è stato condotto nel Luglio 2021 e nel Maggio 2022 in **due popolazioni naturali** della Baia di Alfacs (Catalogna, Spagna) e in **animali mantenuti in cattività** presso l'istituto IMEDMAR-UCV e l'Acquario di Murcia. Campioni di emolinfa sono stati prelevati con campionamenti non distruttivi: dopo la procedura, gli animali sono stati nuovamente posti nel substrato marino o in vasca e monitorati nei giorni successivi al prelievo (Figura A-B). Per ogni individuo, è stata valutato il numero totale di cellule per ml di emolinfa (THC); le cellule emocitarie sono state incubate con bio-particelle PHrodo green (Invitrogen) coniugate con *S. aureus* e Zymosano A e mantenute per 30 min e 3 h a 18 e 23°C. Dopo la stimolazione, le cellule sono state analizzate al citofluorimetro (FACScalibus Becton Dickinson) valutando la percentuale di cellule capaci di effettuare fagocitosi -intensità di fluorescenza media (MFI)- accanto all'efficienza di fusione del sistema fago lisosomiale (Figura C).

RISULTATI

Gli animali in cattività presentano un THC significativamente più basso rispetto alle popolazioni naturali (numero medio di 7-9 x 10⁴ vs 2-5 x 10⁵ cellule/mL, rispettivamente) sebbene con marcate variazioni tra gli individui (Figura D-E). Nelle popolazioni naturali della Primavera 2022, l'MFI ha mostrato valori bassi per entrambi gli stimoli (10-30%) dopo 30 minuti di incubazione e ha raggiunto il 30-50% dopo 3 ore. Nell'esate del 2021, le cellule hanno mostrato un aumento dell'attività fagocitaria raggiungendo il 70% dopo 3 ore in un solo individuo mentre negli altri è rimasto intorno al 50%. In entrambe le stagioni gli animali in cattività presentavano scarsa o assente capacità fagocitica (Figura F-H). Il test di correlazione di Pearson di THC e MFI è risultato positivo e forte (p-value = 0,7) in tutte le condizioni sperimentali. Al citofluorimetro sono state individuate 3 popolazioni emocitarie e poche hanno mostrato la capacità di un processo completo di fagocitosi dopo 3h (Figura I-N).

CONCLUSIONI

Questo rappresenta il primo studio in vitro su emociti di *P. nobilis* durante gli MME. I nostri risultati rivelano una forte immunodepressione degli animali in cattività e una scarsa capacità della popolazione naturale di rispondere agli stimoli patogeni. Condizioni fisiopatologiche correlate allo stato riproduttivo e nutrizionale e stati di malattia possono influenzare l'abbondanza di emociti, determinando una profonda emocitopenia. La mortalità osservata e il declino della capacità immunitaria possono mettere nuova luce sull'immunocompetenza di questi animali.



Acknowledgments: LIFE PINNARCA: grant number LIFE20 NAT/ES/001265

