

# NOTIZIARIO

DELLA

# SOCIETÀ ITALIANA DI PROTOZOOLOGIA

o GENNAIO - DICEMBRE 2000 o

o ANNO 5, N. 1 o

o SOCIETÀ ITALIANA DI  
PROTOZOOLOGIA o

o Anno di fondazione, 1965 o

o Affiliata dal 1983 alla Society of  
Protozoologists (U.S.A.) o

## Società Italiana di Protozoologia (S.I.P.)

### Fondazione della Società Italiana di Protozoologia

La S.I.P. è stata costituita nel 1965 grazie all'impegno pionieristico del primo nucleo di soci sostenitori, i Professori Tina Franceschi, Renzo Nobili, Elsa Bottazzi Massera, Bruno Schreiber.

### Motivo ispiratore

"Incrementare gli studi di Protozoologia, riunendo i cultori della materia e promuovendo il coordinamento delle loro attività".

### Sede legale

Museo di Storia Naturale e del Territorio, Università di Pisa, Certosa, Calci, Pisa.

### Consiglio Direttivo 1999-2000

L. Gradoni, Roma	Presidente
O. Brandonisio, Bari	Segretario - Tesoriere
M.U. Corrado, Genova	Consigliere
P.L. Fiori, Sassari	Consigliere
N. Ricci, Pisa	Consigliere

### Collegio dei Revisori dei conti 1999-2000

M. Gramiccia, Roma	Membro effettivo
C. Ortenzi, Camerino	Membro effettivo

### Segreteria

Prof.ssa Olga Brandonisio  
Istituto di Microbiologia Medica  
Policlinico  
Piazza Giulio Cesare 11  
70124 Bari  
Tel.: 080/5478491 Fax: 080/5478537  
e-mail: brandoni@cimedoc.uniba.it

### Notiziario S.I.P.

Comitato di Redazione: O. Coppellotti, M.U. Corrado, G. Dettori, M. Gramiccia, P. Luporini, P. Madoni, N. Ricci, A. Valbonesi, I. Viani

## In questo numero

Il punto (Comitato di Redazione)

Iniziative S.I.P. a favore di giovani cultori della Protozoologia

Conferimento del premio Nobili-Franceschi, per l'anno 1999, alla Dott.ssa Paola Ceccacci (Camerino)

Presentazione delle Tesi di Dottorato in Protistologia  
- Proposta, invito (M.U. Corrado, F. Dini)

- Tesi di Dottorato del Dott. Filippo Barbanera (Pisa)
- Tesi di Dottorato della Dott.ssa Barbara Di Pretoro (Camerino)
- Tesi di Dottorato della Dott.ssa Francesca Trielli (Genova)

Congressi di Protozoologia 1999-2000: impressioni, riflessioni

- XX Convegno Nazionale S.I.P., S. Margherita Ligure, Ottobre 1999 (M.U. Corrado)
- Colloque du Groupement des Protistologues de Langue Française et de la Société Française de Parasitologie, Parigi, Maggio 2000 (M.G. Chessa)
- The VIII European Multicolloquium of Parasitology, Poznan Settembre 2000 (O. Brandonisio)

Nuovi Soci

Invito ai Soci a fornire il proprio indirizzo di posta elettronica

- Indirizzi di posta elettronica dei Soci

Prossimi Convegni

Agenda - Promemoria dei Soci  
Selezione Bibliografica

# Notiziario della Società Italiana di Protozoologia

## Il Punto

Questo quinto numero del Notiziario della Società Italiana di Protozoologia si apre con una vena di profonda e commossa tristezza. Nicola Ricci non sarà più tra noi a condividere, da ricercatore appassionato quale era, i nostri incontri scientifici, con l'entusiasmo che Lo animava e che riusciva a trasmettere a colleghi ed allievi. Il compendio della Tesi di Dottorato di Ricerca in Protistologia (Biologia sperimentale su eucarioti unicellulari) del Dott. Filippo Barbanera, di cui Nicola Ricci era stato tutore, è l'omaggio alla Sua intensa e proficua attività dedicata alla docenza ed alla ricerca, interamente svolta presso l'Università degli Studi di Pisa.

A seguire la sintesi del Dott. Barbanera, vengono presentati i compedi della Tesi di Dottorato di Ricerca in Protistologia della Dott.ssa Barbara Di Pretoro (Camerino) e della Dott.ssa Francesca Trielli (Genova). Viene riproposto l'invito ai docenti tutori a far preparare ai dottorandi del XIII ciclo un breve compendio della loro Tesi di Dottorato da presentare nel prossimo numero del Notiziario.

Nell'ambito delle iniziative promosse dalla Società Italiana di Protozoologia a favore di giovani cultori della disciplina, nel corso dell'ultimo Convegno della S.I.P., è stato conferito alla Dott.ssa Paola Ceccacci (Camerino), il premio di L.1.000.000, istituito in onore dei Proff. Renzo Nobili e Tina Crippa Franceschi, due dei fondatori della Società, per la migliore tesi di laurea in Protozoologia discussa nel periodo intercorso tra l'a.a. 1997/1998 e luglio 1999.

Come ormai di consueto, alcuni Soci riferiscono circa i lavori di recenti Congressi di Protozoologia cui hanno partecipato. In ordine cronologico: il XX Convegno della S.I.P., S. Margherita Ligure, Ottobre 2000, il Colloque du Groupement des Protistologues de Langue Française et de la Société Française de Parasitologie, Parigi, Maggio 2000, The VIII European Multicollloquium of Parasitology, Poznan, Settembre 2000, di cui ci danno notizia, rispettivamente, Maria Umberta Corrado, Maria Giovanna Chessa ed Olga Brandonisio.

Anche quest'anno, la nostra Società si arricchisce di nuovi Soci, ammessi nel 1999, ai quali va il benvenuto da parte del Comitato di Redazione.

Nelle ultime pagine del Notiziario figura un ulteriore elenco degli e-mail dei Soci insieme con l'invito, a chi ancora non l'avesse fatto, a comunicare l'indirizzo di posta elettronica, in modo da rendere più agevole lo scambio di informazioni.

Infine, la segnalazione dei prossimi Congressi di interesse per i Protozoologi, l'agenda-promemoria ed una breve selezione bibliografica chiudono questa edizione 2000 del Notiziario.

A tutti, l'augurio di un sereno e proficuo lavoro

Per il Comitato di Redazione

Maria Umberta Corrado

# Iniziativa della Società Italiana di Protozoologia a favore di Giovani Studiosi Cultori della Disciplina

---

Nel corso del XX Convegno della Società Italiana di Protozoologia, tenutosi a S. Margherita Ligure, 8-9 Ottobre 1999, è stato conferito il premio Nobili – Franceschi, istituito in onore dei Proff. Renzo Nobili (Pisa) e Tina Crippa Franceschi (Genova), due dei fondatori della Società. Il premio di L. 1.000.000 per la migliore tesi di laurea di argomento protozoologico, discussa nel periodo tra l'a.a. 1997/1998 e luglio 1999, è stato assegnato dalla Commissione esaminatrice costituita dal Consiglio Direttivo della S.I.P., alla Dott.ssa Paola Ceccacci che ha conseguito la Laurea in Scienze Biologiche nell'a.a. 1997/1998, presso l'Università degli Studi di Camerino, presentando la tesi dal titolo: "Processo endocitotico stimolato dall'interazione tra segnale feromonale e recettore in *Euplotes raikovi*". Relatori, la Prof. Cristina Miceli e la Dott.ssa Patrizia Ballarini. Un compendio del lavoro di tesi svolto dalla Dott.ssa Paola Ceccacci verrà presentato nel prossimo numero del Notiziario.

## **Dottorato di Ricerca in Protistologia (Biologia sperimentale su organismi unicellulari)**

### **Proposta, invito**

I docenti tutori dei dottorandi del XIII ciclo sono invitati a far preparare dai propri dottorandi un breve compendio della loro Tesi di Dottorato che dovrà essere inviato insieme con i dati essenziali (nome del candidato, titolo e data di discussione della tesi) alla Segreteria della S.I.P.: Prof.ssa Olga Brandonisio, Istituto di Microbiologia Medica, Piazza Giulio Cesare 11, 70124 Bari.

Tel.: 080/5478491 Fax: 080/5478537  
e-mail: brandoni@cimedoc.uniba.it

Maria Umberta Corrado, Fernando Dini

---

All'iniziativa hanno quest'anno aderito il Dott. Filippo Barbanera (Pisa), la Dott.ssa Barbara Di Pretoro (Camerino) e la Dott.ssa Francesca Trielli (Genova) che hanno preparato un breve compendio delle rispettive Tesi di Dottorato.

---

## **Dottorato di Ricerca in Protistologia XII ciclo (Biologia sperimentale su organismi unicellulari)**

### **Tesi di Dottorato**

**L'etologia di *Oxytricha bifaria*, Stokes 1887 (Ciliophora, Hypotrichida).**

**Risposta comportamentale alla temperatura e biologia adattativa.**

(Tesi di Dottorato discussa il 21 Febbraio 2000)

**Filippo Barbanera**

Dipartimento di Etologia, Ecologia ed Evoluzione, Università degli Studi di Pisa

## INTRODUZIONE

La temperatura rappresenta uno dei parametri ambientali fondamentali per la regolazione della biologia generale degli organismi, e, pertanto, anche un importante fattore di selezione naturale. Già dalla fine del XIX secolo alcuni ricercatori si sono interessati alla determinazione dei limiti di tolleranza dei protozoi nei confronti della temperatura (Davenport, 1897; Jacobs, 1919). Tuttavia sono stati gli studi di Mendelssohn (1895) e Jennings (1906) ad aver creato i presupposti culturali delle ricerche che sono seguite nei decenni successivi sul tema “Temperatura & comportamento dei protozoi”. Inoltre, nelle ultime due decadi, lo studio della locomozione si è rivelato prezioso per la comprensione di numerosi tratti della biologia adattativa di questi organismi (Ricci, 1996). Pertanto, nel corso del Dottorato di Ricerca, lo studio degli effetti della temperatura sul comportamento dei protozoi ciliati ha avuto per obiettivo non solo quello di riprendere in chiave moderna i lavori pionieristici sopra ricordati, ma soprattutto quello di offrire un contributo significativo alla conoscenza della biologia adattativa della specie *Oxytricha bifaria*.

Il seguente piano sperimentale è stato così messo a punto:

→ variazioni di temperatura applicate alle popolazioni sperimentali in modo uniforme (condizioni isotrope di temperatura). Sono state indagate sia le basse (19, 14 e 9°C) che le alte temperature (29, 34 e 39°C) in un *range* di valori simmetrico rispetto alla temperatura di allevamento delle colture (24°C) secondo una cinetica *standard* ( $\pm 0.16^\circ\text{C}/\text{min}$  per 30 min alternati con 30 min di valore costante della temperatura). E' stata inoltre valutata la capacità di recupero dei ciliati dallo *stress* termico imposto, investigando il comportamento locomotorio al ritorno della temperatura a 24°C;

→ realizzazione di microgradienti termici di tipo caldo e freddo alle temperature estreme dell'intervallo precedentemente indagato (condizioni anisotrope di temperatura). Diversamente da altri studi simili, i gradienti sono introdotti in un ambiente in cui già si trovano gli organismi, così che i ciliati sperimentano ognuno di essi come stimolo agente, dapprima, come un fronte d'onda in movimento (la temperatura cambia sia nel tempo che nello spazio: condizioni dinamiche del gradiente), e successivamente come un gradiente stabilizzato (la temperatura cambia solo nello spazio: condizioni statiche del gradiente).

## RISULTATI e DISCUSSIONE

L'analisi delle tracce del *creeping* ha dimostrato che il moto dei ciliati non è significativamente orientato a tutte le temperature indagate in condizioni isotrope (Rayleigh *non-parametric test*: 9, 14, 19, 24, 29, 32 e 34°C).

Le popolazioni sottoposte a condizioni di raffreddamento mostrano una progressiva e marcata riduzione della mobilità, evidente sia come diminuzione della velocità che come aumento della durata degli eventi di arresto del *creeping*. Pertanto, a 9°C i ciliati appaiono del tutto inerti sul substrato. Gli organismi in movimento ( $\cong 10\%$ ) si spostano a bassa velocità ( $\cong 50 \mu\text{m/s}$ ), principalmente in retromarcia e lungo traiettorie circolari. Il valore molto basso del tasso di dislocazione ( $R_d$ :  $\cong 10 \mu\text{m/s}$  a 9°C *versus*  $\cong 300 \mu\text{m/s}$  a 24°C) sintetizza la riduzione della capacità di dispersione dei ciliati sul substrato (Ricci et al., 1998b). Tutti i cambiamenti del comportamento osservati, inclusa la comparsa degli archi destrorsi spesso percorsi da individui in chiaro scivolamento sul substrato, sono reversibilmente indotti: essi scompaiono entro 90 min dal ritorno a 24°C (Ricci et al., 1998a).

Le popolazioni isotropicamente riscaldate non mostrano un significativo incremento della velocità rispetto al controllo, sebbene, a partire da 32°C, una crescente percentuale di oxytriche diventi immobile ( $\cong 60\%$ ), e gli eventi di arresto del *creeping* e la SSR più frequenti. Al ritorno della temperatura al valore di controllo (da 34 a 24°C:  $\Delta T = 10^\circ\text{C}$ ), il recupero della mobilità generale non è accompagnato da quello di nessuno degli altri numerosi e più specifici parametri della locomozione, diversamente da quanto accade per le popolazioni raffreddate da 24 a 9°C ( $\Delta T = 15^\circ\text{C}$ ): pertanto, il riscaldamento ha colpito la fisiologia di *O. bifaria* più del raffreddamento (seguendo il nostro protocollo i ciliati non sopravvivono oltre 37°C). Inoltre, in accordo con gli studi di tipo elettrofisiologico condotti su *Paramecium* (Machemer, 1974; Hildebrand, 1978; Connolly et al., 1985), l'analisi degli effetti della temperatura sul comportamento ha rivelato un andamento non lineare ed asimmetrico delle modificazioni indotte in condizioni di raffreddamento e di riscaldamento isotropo (comportamento uniforme esclusivamente nel *range*  $24\pm 5^\circ\text{C}$ ). Infine, a bassa temperatura, è risultata evidente la riduzione dell'eccitabilità elettrica delle cellule contrapposta allo stato di forte eccitabilità mostrato dai ciliati ad alta temperatura

(Ricci et al., 1998a; Barbanera et al., *Can. J. Zool.*, in stampa).

Successivamente, con lo scopo di valutare il reale stato funzionale delle popolazioni sperimentali caratterizzate da evidente inerzia locomotoria, una condizione del tutto anomala per la biologia dei protozoi (Jennings, 1906; Fenchel, 1987), sono state investigate le risposte motorie dei ciliati all'insorgere di microgradienti sia caldi che freddi a 9°C ed a 34°C.

A 9°C, all'arrivo del fronte d'onda caldo (condizioni dinamiche), (1) i ciliati si muovono verso la sorgente riscaldante. Le oxytriche (2) reagiscono immediatamente allo stimolo termico positivo, (3) spostandosi con marcia in avanti (4) ad alta velocità (5) lungo traiettorie ininterrotte ed in accordo a (6) precisi meccanismi di ortocinesi (positiva/negativa), orientandosi così verso l'*optimum* ambientale. In condizioni statiche del gradiente, i ciliati completano il termoaccumulo nel *patch* a temperatura favorevole, all'interno del quale si mantengono eseguendo specifici *patterns* locomotori (SSR come *thermal avoidance reaction*: Barbanera et al., 1999). Similmente, all'arrivo del fronte d'onda del microgradiente freddo, cioè in condizioni di ulteriore sottrazione di energia all'ambiente, le oxytriche (1) reagiscono immediatamente allo stimolo termico negativo svolgendo (2) il *creeping* in retromarcia (3) ad alta velocità e (4) lungo traiettorie ininterrotte, (5) orientandosi via dalla sorgente del gradiente. Questi risultati dimostrano che la specie *O. bifaria* a 9°C, a dispetto della marcata inerzia locomotoria esibita, è in grado di reagire prontamente ed adattativamente non solo ad una minima variazione della temperatura (0.2 °C/s), ma, soprattutto, al segno di tale variazione (+/-). L'immediatezza delle risposte comportamentali osservate dimostra che la macchina metabolica dei ciliati a 9°C è ancora perfettamente funzionante. Pertanto, l'inerzia locomotoria a 9°C non è una mera conseguenza della bassa temperatura e della cinetica sperimentale di raffreddamento, bensì dell'isotropia termica dell'apparato sperimentale. L'impossibilità per gli organismi di reperire informazioni termiche direzionali nell'ambiente uniformemente raffreddato, infatti, determina il così detto comportamento "neutro" che, esprimendo, per così dire, il disaccoppiamento tra il "motore" ancora ben funzionante e gli organi "propulsori" dell'organismo, è caratterizzato da virtuale assenza di locomozione. Tale comportamento si protrae fintanto che deboli stimoli termici di natura vettoriale inducono l'espressione immediata delle reali potenzialità fisiologiche e del comportamento adattativo dei ciliati (Barbanera et al., *J. Eukaryot. Microbiol.*, in stampa).

A 34°C le popolazioni sperimentali sono state similmente esposte a microgradienti caldi e freddi: nessuna risposta locomotoria è stata osservata da parte né dei ciliati ancora in movimento, né di quelli immobili sul substrato. Al contrario a 32°C, la temperatura più elevata alla quale le popolazioni sperimentali sono ancora composte dal 100% di organismi mobili, i ciliati mostrano un chiaro comportamento adattativo in risposta sia a microgradienti freddi (termoaccumulo alla sorgente del gradiente) che caldi (allontanamento dalla sorgente del gradiente). Tali risposte motorie non sono caratterizzate da significative variazioni della velocità media del *creeping* (già al massimo valore possibile), bensì dall'aumento (gradiente caldo) o dalla diminuzione (gradiente freddo) della frequenza delle SSR (clinocinesi positiva/negativa). Pertanto, ad alta temperatura, la locomozione esprime sempre il pieno accoppiamento tra "motore" ed organi "propulsori" dell'organismo, con il ciliato che si muove alla massima velocità finché le condizioni sperimentali non si avvicinano al limite di tolleranza degli organismi. A 34°C, infatti, il comportamento dei ciliati diviene patologico, essendo quest'ultimi incapaci di fornire risposte motorie adeguate per la loro sopravvivenza (i.e. non adattative: Tinbergen, 1951; Csermely, 1992), ed il loro crescente stato di immobilità è il risultato di un mero, progressivo danneggiamento cellulare piuttosto che il prodotto dell'isotropia termica, come dimostrato per le popolazioni raffreddate a 9°C.

#### CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati qui riportati e brevemente discussi, è possibile concludere che isotropia ed anisotropia termica dell'ambiente rappresentano due condizioni sperimentali chiaramente differenti per i ciliati che ne fanno esperienza. L'ambiente termoisotropo, infatti, pur permettendo lo studio efficace delle potenzialità locomotorie di una data specie, non fornisce alcuna indicazione sul significato adattativo del suo comportamento. Questo tipo di indagine, viceversa, è risolvibile in ambiente anisotropo, cioè in presenza di stimoli termici direzionali in grado di fornire agli organismi informazioni spaziali utili per la loro sopravvivenza. Inoltre, il significato ed il rapporto esistente tra i diversi tipi di comportamento individuati per il ciliato *O. bifaria*, quali il comportamento neutro, il comportamento adattativo ed il comportamento patologico, concetti che trovano generale applicabilità nel più vasto campo dell'etologia, sottolineano l'importanza della ricerca di base nei protozoi ciliati come studio *in nuce* di ciò che il modello eucariote ha realizzato nei più complessi organismi metazoi.

### Riferimenti bibliografici

- Barbanera, F., Erra, F. & Ricci, N. 1999. *J. Euk. Microbiol.*, 46:532--541.
- Barbanera, F., Erra, F. & Ricci, N. (in stampa). *Can. J. Zool.*
- Barbanera, F., Erra, F. & Ricci, N. (in stampa). *J. Euk. Microbiol.*
- Connolly, J. G., Brown, I. D., Lee, A. G. & Kerkut, G. A. 1985. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81A:293--302.
- Csermely, D. 1992. *In: Mainardi, D. (ed.)*, Dizionario di Etologia, Einaudi, Torino. Pp. 180--181.
- Davenport, C. B. 1897. *Experimental Morphology*. New York, Vol. I. Pp. 1--280.
- Fenchel, T. 1987. *Ecology of Protozoa. The Biology of Free-Living Phagotrophic Protists*. Science Tech. Publishers, Madison, Wisconsin. Pp. 1--193.
- Hildebrand, E. 1978. *J. Comp. Physiol.*, 127:39--44.
- Jacobs, M. H. 1919. *J. Exp. Zool.*, 27:427--442.
- Jennings, H. S. 1906. Indiana University Press, Bloomington, London. Pp. 1--366.
- Machemer, H. 1974. *J. Comp. Physiol.*, 92:293--316.
- Mendelssohn, M. 1895. *Pflüger's Arch. Ges. Physiol.*, 60:1--27.
- Ricci, N. 1996. Ethology in Ciliates. *In: Hausmann, K. & Bradbury, P. C. (ed.)*, Ciliates: Cells as Organisms, Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm. Pp. 403--416.
- Ricci, N., Barbanera, F. & Erra, F. 1998a. *J. Euk. Microbiol.*, 45:381--391.
- Ricci, N., Barbanera, F. & Erra, F. 1998b. *J. Euk. Microbiol.*, 45:606--611.
- Tinbergen, N. 1951. *In: Tinbergen, N. (ed.)*, The study of instinct, Oxford University Press, Ely house, London. Pp. 151--184.

## Dottorato di Ricerca in Protistologia XII ciclo (Biologia sperimentale su organismi unicellulari)

### Tesi di Dottorato

#### Trasduzione nel "loop" autocrino feromone-recettore nel ciliato *Euplotes raikovi*

(Tesi di Dottorato discussa il 21 Febbraio 2000)

#### Barbara Di Pretoro

Dipartimento di Biologia Molecolare, Cellulare e Animale, Università degli Studi di Camerino

I feromoni del ciliato marino *Euplotes raikovi* hanno la capacità di promuovere l'attività proliferativa delle stesse cellule che li secernono, funzionando da fattori di crescita (1). Ciò ha fatto supporre che anche il loro meccanismo di attivazione cellulare abbia proprietà in comune con quelli ben noti nelle cellule animali.

In conformità a questa ipotesi, è stato iniziato uno studio, nel quale si è poi inserito il mio lavoro di Dottorato, volto ad identificare le molecole coinvolte nel meccanismo di trasduzione innescato dall'interazione autocrina dei feromoni con i loro recettori. In particolare, ho condotto una serie di esperimenti per analizzare l'esistenza di proteine associate al dominio citoplasmatico dei recettori dei feromoni e per verificare il ruolo di queste proteine nel meccanismo di trasduzione.

I dati sperimentali che ho ottenuto suggeriscono che la risposta cellulare allo stimolo indotto dalle

interazioni feromone-recettore coinvolge proteine leganti GTP (proteine G). Infatti, il GTP- $\gamma$ -S, attivatore persistente delle proteine G, causa una netta diminuzione del legame feromone-recettore e ciò indica la presenza di un complesso funzionale tra recettore e proteina G (2).

Utilizzando, sia in vivo che in vitro, le tossine prodotte dai batteri *Vibrio cholerae* e *Bordetella pertussis*, che possiedono la caratteristica di ADP-ribosilare specificamente le proteine G modificando il ruolo che esse hanno nella trasduzione, ho avuto la conferma che una o più proteine G sono direttamente coinvolte nel processo di trasduzione generato dal legame del feromone Er-1 alla propria cellula di origine. Infatti, l'aggiunta della tossina ad una coltura di cellule ha provocato una significativa stimolazione della sintesi di DNA (misurata come incorporazione di timidina triziata) e della moltiplicazione cellulare.

La tossina della pertosse non si è dimostrata altrettanto efficace.

La proteina G identificata, probabilmente non ricade nel gruppo delle proteine G<sub>s</sub> “classiche” su cui agisce la tossina del colera, in quanto l’ADP-ribosilazione da parte della tossina non causa un aumento dell’attività dell’adenilato ciclasi, enzima “target” di questa classe di proteine G. Infatti, un aumento di AMP ciclico intracellulare, indotto da analoghi o da inibitori dell’enzima degradativo fosfodiesterasi, non potenzia l’effetto mitogenico del feromone, ma al contrario inibisce la sintesi del DNA (3).

Per verificare se la proteina legante GTP di *E. raikovi* fosse simile a quelle di tipo eterotrimerico presenti nelle cellule animali, ho allestito degli esperimenti di Western blot con preparazioni di membrane particolate, utilizzando alcuni anticorpi policlonali commerciali. Solo l’anticorpo denominato anti-GA/1, la cui sequenza aminoacidica corrisponde ad uno dei siti più conservati della sequenza della subunità  $\alpha$  delle proteine G trimeriche (4), ha riconosciuto una proteina con una massa molecolare di circa 55 kDa.

Per determinare la localizzazione della proteina riconosciuta dall’anticorpo anti-GA/1 nelle cellule di *E. raikovi* intatte, ho condotto analisi di immunofluorescenza facendo uso della microscopia confocale. Queste analisi hanno rivelato che le componenti specificamente riconosciute dall’anti-GA/1 sono localizzate sulla superficie cellulare, avvalorando l’ipotesi di una loro associazione con le isoforme di membrana dei feromoni (recettori).

A queste prime evidenze ha fatto seguito l’identificazione di una proteina di 55 kDa che coeluisce con il recettore dei feromoni in cromatografie d’affinità allestite legando covalentemente una preparazione di feromone puro alla resina CH-Sepharose 4B ed incubando preparazioni di membrane cellulari solubilizzate con questa matrice. Il materiale proteico, eluito con GTP da questa affinità e saggiato con l’anticorpo anti GA/1, ha rivelato la presenza di una sola banda in corrispondenza di 55 kDa. La capacità di questa proteina di legare GTP è stata ottenuta eluendo la cromatografia d’affinità con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$  ed esponendo il materiale ottenuto agli UV prima di frazionarlo in elettroforesi e di trasferirlo su una membrana PVDF. L’analisi autoradiografica di questa membrana ha evidenziato una banda principale a 55 kDa indicativa di un avvenuto legame tra la proteina di 55 kDa e  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ .

Per dimostrare in maniera conclusiva che la proteina di 55 kDa ha la proprietà di interagire specificamente e reversibilmente con il dominio citoplasmatico del recettore dei feromoni, ho costruito una proteina ricombinante corrispondente a questo dominio e l’ho usata (legata ad un supporto di chitina) per purificare

la proteina di 55 kDa direttamente dalle membrane cellulari. Questa costruzione è stata resa possibile dalla conoscenza della sequenza aminoacidica completa del recettore del feromone Er-1, dedotta dalla sequenza nucleotidica codificante (5). La proteina ricombinante, denominata p3/10, è stata espressa in *Escherichia coli*.

La proteina purificata mediante l’utilizzo della proteina di fusione p3/10 (contenente il dominio citoplasmatico del recettore) è stata specificamente riconosciuta dall’anticorpo anti-GA/1. Tuttavia altri anticorpi commerciali diretti contro regioni molto conservate di tutte le proteine G finora note non hanno rivelato alcun immunoriconoscimento in questa proteina di 55 kDa. E’ quindi probabile che essa, per quanto sia funzionalmente simile alla subunità  $\alpha$  delle proteine G trimeriche, se ne distingua sostanzialmente sulla base della sequenza aminoacidica.

Solo la completa caratterizzazione strutturale della proteina di 55 kDa, che come ho descritto si può ottenere in forma omogenea purificandola con sistemi cromatografici di affinità basati sull’utilizzo della proteina ricombinante p3/10, potrà chiarire se essa è effettivamente omologa alla subunità  $\alpha$  delle proteine G di tipo eterotrimerico delle cellule animali e se, in un contesto più generale, anche recettori a singolo dominio transmembrana possono attivare meccanismi di trasduzione mediante interazione con proteine G. E’ comunque da considerarsi anche la possibilità che la proteina di 55 kDa appartenga ad una classe di proteine recentemente caratterizzate in *Dictyostelium* (6), costituite da un dominio terminale amminico omologo alla subunità  $\alpha$  delle proteine G (e quindi capace di legare GTP) e da un terminale carbossilico dotato di attività fosfatase.

Un approccio sperimentale ormai correntemente utilizzato nello studio delle funzioni e degli effetti delle componenti che intervengono nella trasduzione del segnale nelle cellule animali, prevede l’utilizzo di tecniche di “gene knock out” e di trasformazione. Purtroppo queste tecniche non possono ancora essere applicate in *E. raikovi* a causa del suo assetto genomico che prevede l’attività di un nucleo somatico (macronucleo) contenente geni, ciascuno dei quali è amplificato in migliaia di copie.

**Nota:** Parte dei risultati di questa tesi di Dottorato sono stati pubblicati nell’articolo “The autocrine mitogenic loop of the ciliate *Euplotes raikovi*: the pheromone membrane-bound forms are the cell binding sites and potential signaling receptors for soluble pheromones”. Ortenzi C., Alimenti C., Vallesi A., Di Pretoro B., La Terza A., Luporini P. (2000). *Mol. Biol. of the Cell*, **11**:1445-1455.

## Riferimenti Bibliografici

- (1) Vallesi A., Giuli G., Bradshaw R.A. & Luporini P. (1995). *Nature*, **376**: 522-524.
- (2) Graeser D. & Neubig R.R. (1992). *IRL Press, Oxford*, 1-30.
- (3) Apone F. (1998). Tesi di Dottorato di Ricerca in Protistologia: Università degli Studi di Camerino.
- (4) Simon M.I., Strathmann M.P. & Gautam M. (1991). *Science*, **252**: 802-808.
- (5) Miceli C., La Terza A., Bradshaw R.A. & Luporini P. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **89**: 1988-1992.
- (6) Aubry L. & Firtel R.A. (1998). *Dev. Genet.*, **12**: 1525-1538.

## Dottorato di Ricerca in Protistologia XII ciclo (Biologia sperimentale su organismi unicellulari)

### Tesi di Dottorato

#### “Effetti dell’euplotina C in ciliati marini: citotossicità mediata da alterazioni della concentrazione del $Ca^{2+}$ citosolico”

(Tesi di Dottorato discussa il 21 Febbraio 2000)

**Francesca Trielli**

Dipartimento per lo Studio del Territorio e delle sue Risorse, Università degli Studi di Genova

Lo studio svolto in questi tre anni di Dottorato di Ricerca ha avuto come oggetto l’effetto di metaboliti secondari, prodotti dal ciliato *Euplotes*, su ciliati marini.

Il lavoro prende spunto dall’osservazione che nei campionamenti in natura, la presenza di organismi riconosciuti come *Euplotes crassus* generalmente escludeva la copresenza di popolazioni classificate come *E. vannus* ed *E. minuta*, nonostante le tre specie vivano nell’ambiente interstiziale e presentino caratteristiche morfologiche e biologiche simili (Nobili et al., 1978; Valbonesi et al., 1988; Dini et al., 1985). Questo fatto è stato spiegato in un primo tempo in chiave di una maggiore capacità di adattamento alle condizioni ambientali da parte di *E. crassus* rispetto alle altre due specie (Dini, 1984). In seguito sono stati isolati e purificati quattro metaboliti secondari di natura sesquiterpenoide, l’euplotina A, B, C e la preuplotina D (Dini et al., 1993), prodotti da *E. crassus* e tossici per alcune specie di ciliati non produttori tra cui *E. vannus* e *E. minuta*.

In questa tesi ho studiato l’azione dell’euplotina C, prodotta in maggiore quantità e biologicamente più attiva delle euplotine A, B e della preuplotina, su *E. vannus* ceppo TB6. Dapprima ne ho preso in esame l’effetto sulla vitalità cellulare e sul ritmo riproduttivo. Successivamente, ne ho studiato l’azione sull’omeostasi ionica, relativamente agli ioni  $Ca^{2+}$  e  $Na^+$ , essendo nota l’importanza del mantenimento di un corretto equilibrio ionico, in particolare del calcio, in quanto catione che regola numerosi processi fisiologici e gioca un ruolo critico sulla motilità e sul comportamento cellulare. Sotto questo profilo, ho studiato gli effetti dell’euplotina C

sull’attività di fagocitosi e sulla stabilità della membrana lisosomiale, in quanto tali aspetti funzionali sembrano essere influenzati da variazioni della concentrazione di  $Ca^{2+}$  citosolico.

Infine, alla luce dell’osservazione che le euplotine sono tossiche per numerose specie di ciliati marini, è sembrato interessante studiare l’effetto dell’euplotina C su *Litonotus lamella*, al fine di indagare l’azione di questo metabolita sull’organismo predatore specifico di *Euplotes*.

In questo contesto i principali risultati conseguiti possono essere brevemente illustrati e discussi secondo quanto riportato di seguito.

- Alle concentrazioni utilizzate (0,5 – 7  $\mu\text{g/ml}$ ), l’euplotina C determina un incremento del tasso di mortalità dose-dipendente e induce un rallentamento del ritmo riproduttivo. L’alterazione a livello subcellulare del comportamento motorio, in seguito a progressiva immobilizzazione dei cirri e delle ciglia, nonché la variazione della forma del corpo cellulare e la comparsa di grossi vacuoli nel citoplasma, possono essere ricondotti a variazioni dell’omeostasi del calcio (Jewell et al., 1992) e, più in generale, dell’omeostasi ionica che, impedendo l’eliminazione degli ioni e del liquido in eccesso, potrebbe essere la causa del rigonfiamento cellulare.

- Il trattamento con euplotina C produce alterazione dell’omeostasi del  $Ca^{2+}$  ed aumento della  $[Ca^{2+}]_i$  dose-dipendente. Cellule di *E. vannus* trattate con euplotina C in assenza di calcio dal mezzo extracellulare presentano un aumento della  $[Ca^{2+}]_i$  ridotto rispetto a quello osservato nel caso del trattamento con euplotina C in presenza di calcio nel mezzo esterno. Questi risultati indicano che in *E. vannus* l’incremento



della  $[Ca^{2+}]_i$ , indotto dall'euplotina C, sembra essere dovuto ad un afflusso di ioni calcio dal mezzo esterno, piuttosto che da rilascio di calcio dai compartimenti endocellulari. L'elevato aumento della  $[Ca^{2+}]_i$ , dovuto ad alterazioni a livello della plasmamembrana dei meccanismi che regolano l'omeostasi del calcio, appare simile a quello prodotto in *E. crassus* dai metalli pesanti  $Cu^{2+}$  e  $Hg^{2+}$ , di cui è nota la tossicità (Viarengo et al., 1996).

- L'euplotina C produce un aumento dose-dipendente della concentrazione di  $Na^+$  citosolico, probabilmente dovuto ad una parziale inibizione della  $Na^+/K^+$  ATPasi. Tale eventualità spiegherebbe, almeno in parte, l'aumento di  $Ca^{2+}$  citosolico prodotto dall'euplotina C: infatti un'inibizione della  $Na^+/K^+$ -ATPasi comporta un decremento dell'attività dell'antiporto  $Na^+/Ca^{2+}$ , elemento importante nella regolazione della  $[Ca^{2+}]_i$  nei protozoi ciliati (Burlando et al., 1999a).

- Cellule pretrattate con un inibitore dei canali calcio voltaggio-dipendenti, presentano un incremento della  $[Ca^{2+}]_i$  inferiore a quello osservato nel caso di cellule non pretrattate, e ciò dimostra un diretto coinvolgimento di tali canali nell'afflusso di calcio esterno. Effetto simile è stato osservato anche per altri sesquiterpenoidi quali il T-cadinolo isolato dalla pianta *Commiphora guidotti* (Bursaceae), dove il terpene ha mostrato proprietà calcio-antagoniste per interazione con i siti diidropiridinici presenti su tali canali (Zygmunt et al., 1993).

- Gli esperimenti di elettrofisiologia hanno messo in luce che l'euplotina C altera non solo le proprietà chimico-fisiche della plasmamembrana, ma anche le sue proprietà elettriche, in quanto aumenta l'ampiezza del potenziale d'azione graduato. Tale incremento sembra dipendere da un maggiore afflusso di  $Ca^{2+}$  e in parte dalla riduzione della corrente veloce di  $K^+$  in uscita. Poiché la maggior parte dei parametri che controllano la motilità cigliare dipende dal calcio (Machemer, 1988), l'elevato aumento della  $[Ca^{2+}]_i$  e dell'ampiezza del potenziale possono spiegare le alterazioni a livello di motilità cigliare.

- Allo scopo di individuare eventuali alterazioni prodotte dall'euplotina C sul metabolismo cellulare, ne è stata studiata l'azione sul sistema fagolisosomiale. Anche in questo caso l'euplotina C ha un effetto dose-dipendente sulla destabilizzazione della membrana lisosomiale. È noto che i lisosomi giocano un ruolo chiave nel catabolismo intracellulare di macromolecole e nel "sequestro" di inquinanti inorganici ed organici e dei loro metaboliti. La compartimentalizzazione di tali sostanze xenobiotiche tossiche può essere interpretata come un vero e proprio meccanismo protettivo messo in atto dalla cellula per isolarle dagli altri componenti cellulari che, in tal modo, sfuggono alla loro azione (Moore, 1990). È tuttavia rilevante il fatto che l'accumulo di sostanze xenobiotiche può produrre modificazioni a carico dei lisosomi e determinare in

ultima analisi un danno alla membrana lisosomiale con rilascio di enzimi idrolitici nel citosol o alterare la funzionalità dei lisosomi stessi (Köhler, 1991; Moore et al., 1982). I risultati relativi alla stabilità della membrana lisosomiale sono stati messi in relazione con le variazioni della concentrazione del  $Ca^{2+}$  libero citosolico, allo scopo di evidenziare un possibile ruolo del calcio nell'alterazione delle membrane lisosomiali, dovuta al trattamento con euplotina C, e per individuare eventuali relazioni causa-effetto. In assenza di calcio nel mezzo esterno, veniva inibito l'effetto destabilizzante sulle membrane lisosomiali. Sembra, quindi, che il calcio giochi un ruolo nel mediare la tossicità dell'euplotina C a livello dei lisosomi. È probabile che tale effetto sia indiretto, in quanto il calcio può attivare fosfolipasi (Tepperman & Soper, 1999) che a loro volta danneggiano le membrane (Shier & Du Bordieu, 1983). Studi recenti hanno infatti indicato che in emociti di mitilo, esposti a concentrazioni  $\mu M$  di metalli pesanti, la destabilizzazione delle membrane lisosomiali è conseguente, almeno in parte, all'attivazione della fosfolipasi  $A_2$  calcio-dipendente (Burlando et al., 1999b). L'euplotina C altera, inoltre, l'attività metabolica dei lisosomi inducendo una diminuzione del pH lisosomiale, da cui dipende la funzionalità dell'organello, che viene mantenuto acido dall'attività di una pompa protonica presente sulla membrana.

- Nell'ambito delle indagini relative agli effetti dell'euplotina C sul metabolismo cellulare di *E. vannus*, l'attenzione è stata rivolta anche alla fagocitosi, poiché la plasmamembrana coinvolta in questo processo rappresenta il primo bersaglio da parte di inquinanti ambientali. È stato evidenziato che l'euplotina C inibisce la capacità di internalizzare le particelle alimentari, probabilmente a causa dell'aumento della  $[Ca^{2+}]_i$ , come riportato in *Paramecium* (Plattner et al., 1997).

- I risultati relativi all'effetto dell'euplotina C su *L. lamella*, predatore specifico di *Euplotes*, mostrano come questo ciliato sia più resistente di *E. vannus* agli effetti dell'euplotina. Anche in questo caso, come già osservato in *E. vannus*, l'effetto tossico dell'euplotina C sembra essere mediato da variazioni nella  $[Ca^{2+}]_i$ , alterando i meccanismi che regolano l'omeostasi del calcio a livello della plasmamembrana. L'euplotina C induce un aumento elevato e permanente del calcio, che inizia nella regione apicale e si propaga a tutto il corpo cellulare. Tale particolare andamento potrebbe essere messo in rapporto con la presenza di tossicisti, organelli estrusivi che permettono a *L. lamella* di immobilizzare la preda.

#### CONCLUSIONI

L'euplotina C altera l'omeostasi del calcio modificando le proprietà omeostatiche ed elettriche della plasmamembrana, quindi il calcio sembra mediarne la tossicità. L'azione dell'euplotina C appare assai interessante per le sue implicazioni

interspecifiche. La sua produzione da parte di *E. crassus* infatti, sostiene l'ipotesi di una separazione di specie all'interno della morfospécie *E. crassus-minuta-vannus*. La sua azione su specie non produttrici sembra rivestire particolare rilievo

nell'ambito della competizione per lo stesso microhabitat, sia favorendo *E. crassus* nei confronti di altri ciliati marini dell'ambiente interstiziale, sia agendo come deterrente nei confronti del predatore specifico.

### Riferimenti bibliografici

- Burlando B., Marchi B., Krüppel T., Orunesu M., Viarengo A. 1999a. *Cell Calcium*, 25 (2): 153-160.  
Burlando B., Panfoli I., Marchi B., Ceratto N., Dondero F., Viarengo A. 1999b. *Comp. Biochem. Physiol.* 124(A) Suppl.: S11.  
Dini F. 1984. *Am. Nat.*, 123: 151-161.  
Dini F. 1985. *Mar. Ecol. Prog. Series*, 4: 195-202.  
Dini F., Guella G., Giubilini P., Mancini I., Pietra F. 1993. *Naturwissenschaften*, 80: 84-86.  
Köhler A. 1991. *Comp. Biochem Physiol.*, 100(C): 123-127.  
Jewell S.A., Bellomo G., Thor H., Orrenius S. 1982. *Science*, 217: 1257-1259.  
Moore M.N., Pipe R.K., Farrar S.V. 1982. *Mar. Pollut. Bull.*, 13: 340-345.  
Moore M.N. 1990. *Histochem. J.*, 22: 189-191.  
Nobili R., Luporini P., Dini F. 1978. In: *Marine Organisms*, B. Battaglia, J. Beardmore (eds.), New York, Plenum, 25: 591-616.  
Plattner H., Braun C., Hentschel J. 1997. *J. Membr. Biol.*, 158 (3): 197-208.  
Shier W.T., Du Bordieu D.T. 1983. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 110: 758-763.  
Tepperman B.L., Soper B.D. 1999. *Dig. Dis. Sci.*, 44(3): 494-502.  
Valbonesi A., Ortenzi C., Luporini P. 1988. *J. Protozool.*, 35: 38-45.  
Viarengo A., Accomando R., Ferrando I., Beltrame F., Fato M., Marcenaro G. 1996. *Comp. Biochem. Physiol.*,  
Zygmunt P.M., Larsson B., Sterner O., Vinge E., Hogestatt E.D. 1993. *Pharmacol. & Toxicol.*, 73: 3-9.

## Congressi di Protozoologia 1999-2000: impressioni, riflessioni

### XX Convegno Nazionale della Società Italiana di Protozoologia

**S. Margherita Ligure, 8-9 ottobre, 1999**

Nella splendida cornice di Villa Durazzo, concessa a titolo gratuito dal Comune e con il patrocinio dell'Università degli Studi di Genova, della Provincia di Genova e del Comune di S. Margherita Ligure, si è tenuto il consueto appuntamento annuale dei Soci della Società Italiana di Protozoologia. I lavori del Convegno, organizzato dai Soci genovesi afferenti al Dipartimento per lo Studio del Territorio e delle sue Risorse, sono stati inaugurati dal Preside della Facoltà di Scienze MFN, Prof. Stani Giammarino, e si sono articolati in un Simposio e quattro sessioni di comunicazioni. Al Simposio: 'Signalling, trafficking, and cell-to-cell communications' hanno presentato una relazione ad invito il Prof. Jean Massoulié (Parigi), il Prof. Antonio De Flora, (Genova), la Prof.ssa Olga Brandonisio (Bari) e la Prof.ssa Linda Sperling (Gif-sur-Yvette). Nelle comunicazioni sono state trattate varie tematiche della biologia molecolare, cellulare e dell'ecologia che hanno coinvolto l'interesse degli studiosi di protozoi parassiti e di protozoi a vita libera. Al Convegno ha partecipato un numero rilevante di Soci, tra i quali molti giovani e validi ricercatori.

Maria Umberta Corrado

## **Colloque du Groupement des Protistologues de Langue Française et de la Société Française de Parasitologie**

**Parigi, 23-26 maggio, 1999**

Dal 23 al 26 Maggio 2000 si è svolta, a Parigi, presso l'Auditorium della "Grande Galerie de l'Evolution" del Museo Nazionale di Storia Naturale, la 38° Riunione del "Groupement des Protistologues de Langue Française", congiuntamente al Convegno annuale della "Société Française de Parasitologie". Il Congresso, dal titolo "Protistes et interactions hôtes-parasites: nouvelles perspectives pour le XXI<sup>e</sup> siècle", articolato in 5 simposi e in comunicazioni su poster, ha avuto, quale ospite d'onore, Miklos Müller che, nella conferenza plenaria: "Protist diversity-The hydrogen hypothesis and beyond", ha proposto argomenti a sostegno dell'ipotesi formulata con Martin, nel 1998.

Il simposio di apertura è stato dedicato ad André Lwoff, nel 1965 premio Nobel per la Fisiologia, che, all'inizio della sua carriera, ha studiato alcuni aspetti della riproduzione e della morfogenesi nei protozoi ciliati, rivolgendo successivamente il suo interesse allo studio dei batteri. Tra i diversi contributi presentati riguardo alla struttura ed al ruolo dei centrosomi nella morfogenesi dei protisti e delle cellule animali ed umane, grande rilievo ha avuto l'intervento di Janine Beisson (CNRS, Gif sur Yvette), sul ruolo morfogenetico dei corpi basali, evidenziato dal disassemblaggio delle strutture corticali di *Paramecium*, in seguito all'inattivazione dei geni delle centrine ICL1a e ICL1b, e sulla reversibilità del fenomeno, alla riattivazione dei geni stessi.

Nel simposio sui differenti meccanismi molecolari della motilità cellulare, hanno destato, tra gli altri, vivo interesse sia l'intervento di Marie-France Carlier (CNRS, Gif sur Yvette) sui meccanismi della motilità cellulare generati dalla polimerizzazione dell'actina e sulla loro ricostruzione *in vitro*, sia l'intervento di Victor Nussenzweig (New York) sulla motilità per scivolamento e la capacità di invasione delle cellule dell'ospite da parte degli sporozoitidi di *Plasmodium*.

Negli ultimi tre simposi sono stati trattati argomenti strettamente relativi agli organismi parassiti ed alle loro interazioni con gli ospiti. Nel simposio dedicato all'organizzazione sopramolecolare dei *Kinetoplastidae*, responsabili di malattie parassitarie umane ed animali quali le tripanosomiasi e le leishmaniosi (organizzatore Miklos Müller, Rockefeller Institute, New York), Gull (Manchester) e Opperdoes (Bruxelles) hanno presentato due interessanti contributi allo studio di *Trypanosoma*; Blum (Durham, USA) ha presentato i risultati degli studi sulla risposta di *Leishmania major* e *L. donovani* allo stress osmotico. Il simposio nel quale sono stati trattati i nuovi approcci allo studio di vaccini contro malattie parassitarie ancora largamente diffuse, in particolare malaria e scistostomiasi, è stato organizzato da Ruth Nussenzweig (New York); quello sull'apporto del sequenziamento del genoma dei protozoi e l'impatto del polimorfismo genetico degli ospiti e dei vettori sulla sensibilità/resistenza alle infezioni parassitarie è stato organizzato da Christian Vivares, (CNRS-Université Blaise Pascale, Aubière).

Durante il Congresso è stata inaugurata una mostra, ospitata all'interno del Museo stesso, che raccoglie 20 tavole disegnate ad uso didattico da Edouard Chatton, insigne protozoologo della metà del novecento. L'autore, unendo le sue capacità di fine osservatore a doti di artista, evidenzia con mirabile precisione differenti aspetti della riproduzione e della morfogenesi di numerosi protisti.

Maria Giovanna Chessa

## **The VIII European Multicolloquium of Parasitology**

**Poznan, 10-14 settembre, 2000**

Dal 10 al 14 settembre 2000 si è tenuto a Poznan, Polonia, l'EMOP VIII. Tra le tantissime relazioni di elevato valore scientifico, ne segnalo alcune inerenti i protozoi, a mio parere interessanti per chi si occupa di parassitologia medica.

Nel simposio sulla toxoplasmosi congenita, Stray-Pedersen (Toulouse, France) ha parlato dell'impatto della chemioterapia nella madre sulla evoluzione dell'infezione nel bambino. Uno studio multicentrico

europeo ha dimostrato che il trattamento prenatale riduce significativamente le sequele nei neonati infetti ed in particolare le sequele severe ad un anno di età. Inoltre tanto più precocemente viene iniziata la terapia dopo la diagnosi di infezione materna, tanto più rare sono le sequele nel bambino. Petersen (Copenhagen, Denmark) ha riferito invece sulle strategie diagnostiche nella toxoplasmosi congenita. Durante la gravidanza, il mezzo più affidabile per la diagnosi nella madre è la dimostrazione della sierconversione, in quanto la presenza di IgM specifiche si riscontra nel 3-6% della popolazione generale e non è un criterio sufficiente per la diagnosi di infezione acuta. In presenza di sierconversione, confermata con incremento del titolo anticorpale al *dye test* e bassa affinità delle IgG, si procede generalmente all'amniocentesi, per la ricerca diretta del parassita nel liquido amniotico, mediante inoculazione nel topolino e/o PCR. Solo in caso di positività di almeno una di queste due prove si può parlare di infezione fetale. Nel neonato la presenza di IgM e/o IgA è segno di infezione congenita in quanto queste due sottoclassi non attraversano la placenta. IgM e/o IgA specifiche si trovano in circa il 90% dei neonati con infezione congenita non trattati. Nei neonati con assenza di IgM e IgA specifiche la persistenza delle IgG specifiche dopo 12 mesi consente la diagnosi dell'infezione. Promettente per la diagnosi nel neonato, in aggiunta ai metodi tradizionali, appare un nuovo kit per IgG-IgM mediante Western blotting (Franck *et al.*, Marseille, France). Questo test è stato anche impiegato con buoni risultati per la diagnosi postnatale mediante analisi comparata del profilo immunitario della madre e del bambino (Paul, Poznan, Poland).

Nel Simposio *Food-borne parasites* Slifko e Rose (St. Petersburg, USA) hanno riferito sulla messa a punto di un metodo basato su colture cellulari per la valutazione della vitalità ed infettività di ceppi di *Cryptosporidium parvum* isolati dalle acque, senza ricorrere al metodo classico di inoculazione in animali di laboratorio. Questo appare particolarmente utile per il genotipo 1 di *Cryptosporidium parvum*, che può essere propagato in coltura, ma non in modelli animali diversi dall'uomo. Nella sessione si è parlato anche molto di *Cyclospora cayetanensis*, un altro coccidio intestinale parassita dell'uomo trasmissibile attraverso cibi o acqua, che ha causato recentemente diverse epidemie negli Stati Uniti. Hanes *et al.*, (Laurel, USA) hanno riferito sulla possibilità di coltivare questo protozoo in cellule Caco-2 e di utilizzare i cani *beagle* come primo modello sperimentale animale per l'infezione.

Nella Sessione *Molecular biology* Pieniazek ha svolto una relazione sull'impiego della PCR in campo diagnostico per i protozoi parassiti dell'uomo. Al CDC (Atlanta, USA), dove questo ricercatore lavora, la PCR viene usata comunemente per confermare e completare la diagnosi microscopica di *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Iso spor a*, microsporidi, plasmodi e *Pneumocystis*. Per la malaria in particolare, la PCR esibisce una maggiore sensibilità rispetto ai metodi microscopici ed appare particolarmente utile nei casi di bassa parassitemia o in casi di infezioni miste. Peraltro la clearance del DNA parassitario dopo la chemioterapia è rapida, per cui la PCR indicherebbe infezione attiva (Myjak *et al.*, Atlanta, USA).

Di varianti genetiche di *Cryptosporidium parvum* hanno riferito Homan (Bilthoven, The Netherlands) e Caccio (ISS, Roma). L'analisi della sequenza di un locus contenente sequenze ripetute GAG ha rivelato in un centinaio di isolati, provenienti da infezioni umane ed animali, la presenza di 6 differenti subgenotipi. In particolare nell'ambito del genotipo H, associato solo con infezioni umane, sono stati identificati 2 differenti subgenotipi, mentre nel genotipo C, associato sia con infezioni umane che con infezioni del bestiame, sono stati identificati 4 subgenotipi. L'importanza di questa ricerca deriva dal fatto che si tratta del primo dato relativo alla eterogeneità nell'ambito dei genotipi H e C, finora considerati omogenei sulla base di altri marcatori genetici. Anche nell'ambito del microsporidio *Enterocytozoon bieneusi* sono stati distinti differenti genotipi, in base all'analisi dell'rDNA internal transcribed spacer (ITS) mediante RFLP o sequenziamento. Nello studio presentato da Mathis *et al.* (Zurich, Switzerland) i genotipi studiati con questa metodica presentavano una caratteristica specificità d'ospite.

Nella sessione *Immunology and vaccines* Brenier-Pinchart *et al.* (La Tronche, France) hanno riferito sulla produzione di chemochine, recentemente descritte come importanti mediatori nell'immunità verso i microrganismi patogeni, in cellule infettate con toxoplasmi. Una linea di fibroblasti umani è stata infettata in vitro con tachizoiti di *T.gondii* e stimolata con TNF- $\alpha$ . Le cellule 24 h dopo l'infezione e la stimolazione erano in grado di esprimere l'mRNA per la chemochina *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), che poteva inoltre essere dosata mediante ELISA nei sovrantanti cellulari. Solo i tachizoiti vivi, e non quelli uccisi con il calore erano in grado di indurre l'espressione e la secrezione della chemochina che potrebbe svolgere un ruolo nel controllo e nella patogenesi dell'infezione.

Nell'ambito di parassitosi nell'ospite immunocompromesso, sono state oggetto di relazioni la microsporidiosi e la leishmaniosi viscerale. Derouin (Paris, France) ha fatto il punto sulla epidemiologia della microsporidiosi umana. Delle più di 1000 specie di microsporidi esistenti, 12 sono state riportate come causa di infezioni umane. La specie più frequente nell'uomo è *Enterocytozoon bieneusi*, che oltre

agli HIV+ può occasionalmente infettare i trapiantati ed anche individui immunocompetenti. Benchè le altre specie siano ritenute più rare nell'uomo, è da tenere presente che anticorpi specifici anti-*Encephalitozoon cuniculi* sono stati rinvenuti frequentemente in donatori di sangue apparentemente sani. Le fonti dell'infezione umana non sono sufficientemente chiarite, anche se ci sono indicazioni a favore di una trasmissione zoonotica ed è stata descritta una epidemia trasmessa per via idrica in Francia. L'albendazolo è efficace contro *Encephalitozoon*, mentre verso *Enterocytozoon bieneusi* si è dimostrata efficace la fumagillina, pur con possibilità di ricadute dopo la cessazione del trattamento. Interessante la segnalazione (del Aguila *et al.*) della frequente presenza di *Enterocytozoon bieneusi* nelle feci di pazienti immunocompetenti (5/97) ed anziani (8/60) in Spagna.

Gradoni (ISS, Roma) ha presentato dati relativi alle co-infezioni *Leishmania*-HIV nell'Europa meridionale, dove dal 1990 al 1998 sono stati descritti 1400 casi di coinfezione. Fattori di rischio sono risultati essere il sesso maschile (83%) e la condizione di tossico-dipendente (71%). Da tenere presente ai fini diagnostici l'elevata (43%) negatività della sierologia nei pazienti immunodepressi. La frequente presenza di parassitemia in questi pazienti suggerisce inoltre la possibilità di trasmissione tramite siringhe infette.

A proposito di amebe *free-living* Khan *et al.* (Boston, USA) hanno presentato dati sulla possibilità di differenziare dal punto di vista morfologico e ultrastrutturale ceppi di *Acanthamoeba* patogeni e non patogeni. In particolare i ceppi patogeni presentano un numero di acantopodi superiore a 1000, mentre quelli non patogeni inferiore a 100. Inoltre, coltivati in presenza monostrati di cellule corneali, i ceppi patogeni presentano strutture associate con la fagocitosi (amebastomi) e aderiscono strettamente alle cellule epiteliali. Ancora, i ceppi virulenti inducono la secrezione di proteasi contatto-dipendenti. Inoltre Walochnik *et al.*, (Vienna, Austria) hanno studiato la correlazione fra provenienza dei ceppi (da casi clinici o ambientali) e markers genetici (sequenza dell'rDNA 18S). I risultati suggeriscono che la maggior parte dei ceppi patogeni appartengano ad un unico genotipo (T4) che è anche il genotipo di *Acanthamoeba* in generale più frequente. I ceppi non patogeni all'interno di questo genotipo presentavano differenze di sequenza minime fra loro e maggiori con gli isolati da materiale clinico.

Infine, nella sessione *Waterborne parasitic infection*, Graczyk *et al.* hanno riferito sulla efficienza di un metodo semplice e poco costoso per la ricerca di cisti di *Giardia* ed oocisti di *Cryptosporidium* nelle acque potabili e superficiali, basato sulla filtrazione attraverso membrane di acetato di cellulosa che vengono poi disciolte mediante trattamento con etanolo ed acetone. Questo metodo, oltre a garantire elevate percentuali di recupero dei parassiti, consente di poter effettuare prove di vitalità ed infettività sulle cisti ed oocisti identificate.

Olga Brandonisio

## Nuovi Soci

Durante il XX Convegno Nazionale della S.I.P., S. Margherita Ligure, 8-9 ottobre 1999, l'Assemblea dei Soci ha approvato la proposta di ammissione nella S.I.P. dei seguenti dottori: Dott.ssa Anna Maria Bolzern, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Milano; Dott.ssa Elisabetta Navarra, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova; Dott.ssa Letizia Modeo, Dipartimento di Etologia, Ecologia ed Evoluzione, Università degli Studi di Pisa. Ai nuovi soci, un caloroso augurio di benvenuto e di buon lavoro da parte della Redazione di questo Notiziario.

## Invito ai Soci a fornire il proprio indirizzo di Posta elettronica

E' questo un invito ai Soci a fornire alla Segreteria della nostra Società i propri indirizzi di posta elettronica in modo da garantire uno scambio di informazioni tra gli Associati più efficace, rapido e meno costoso se paragonato a quelli tradizionali.

Qui di seguito, è inserito un quarto parziale elenco di indirizzi di posta elettronica dei Soci S.I.P. Gli indirizzi sono stati in parte tratti dalla home page della Società americana di Protozoologia (indirizzo: <http://www.uga.edu/protozoa/>) e in parte provengono da scambi informali interpersonali.

## Indirizzi di Posta elettronica dei Soci: quarto elenco parziale

Cognome	Nome	Indirizzo e-mail personale	Indirizzo e-mail Istituzione	
Albergoni	Vincenzo	biopod09@bio.unipd.it		Padova
Angelici	M. Cristina	angelici@iss.it		Roma
Brandonisio	Olga	brandoni@cimedoc.uniba.it		Bari
Calderaro	Adriana		micromed@ipruniv.cce.unipr.it	Parma
Cappuccinelli	Piero		microb@ssmain.uuiss.it	Sassari
Chessa	M. Giovanna	gchessa@dipteris.unige.it		Genova
Coppellotti	Olimpia	olimpiak@civ.bio.unipd.it		Padova
Corrado	M. Umberta	corrado@dipteris.unige.it		Genova
Dettori	Giuseppe	gdettori@ipruniv.cce.unipr.it	micromed@ipruniv.cce.unipr.it	Parma
Dini	Fernando	f.dini@discat.unipi.it		Pisa
Fiori	Luigi	fioripl@ssmain.uniss.it		Sassari
Frontali	Clara	frontali@iss.infn.it		Roma
Galati	Lucia		micromed@ipruniv.cce.unipr.it	Parma
Gradoni	Luigi	gradoni@iss.it		Roma
Gramiccia	Marina	gramicci@iss.it		Roma
Guidolin	Laura	guidolin@civ.bio.unipd.it		Padova
Irato	Paola	pirato@ux1.unipd.it		Padova
La Rosa	Giuseppe	larosa@iss.it		Roma
Luporini	Pierangelo	luporini@cambio.unicam.it		Camerino
Madoni	Paolo	madoni@dsa.unipr.it		Parma
Majori	Giancarlo	majori@iss.it		Roma
Mattana	Antonella		dsfanto@ssmain.uniss.it	Sassari
Miceli	Cristina	miceli@cambio.unicam.it		Camerino
Paleari	Laura	paleari@ermes.cba.unige.it		Genova
Piccinni	Ester	piccinni@civ.bio.unipd.it		Padova
Politi	Huguette	huguettep.@hotmail.com		Genova
Pozio	Edoardo	pozio@.iss.it		Roma
Ramoino	Paola	ramoino@diperis.unige.it		Genova
Ricci	Nicola	n.ricci@discat.unipi.it	zool@icnucevm.cnuce.cnr.it	Pisa
Rossi	Patrizia	rossi@iss.it		Roma
Severini	Carlo	severini@iss.it		Roma
Tagliafierro	Grazia	tgfgra@unige.it	anaco@unige.it	Genova
Trielli	Francesca	frabarb@hotmail.com	zoologia@unige.it	Genova
Valbonesi	Alessandro	valbo@cambio.unicam.it		Camerino
Verni	Franco	f.verni@discat.unipi.it		Pisa
Viani	Isabella		micromed@ipruniv.cce.unipr.it	Parma
Viarengo	Aldo	viarengo@al.unipmn.it		Genova

## Prossimi Convegni

27-30 Novembre 2000 - The 14<sup>th</sup> Seminar on Amebiasis, El Colegio Nacional, Mexico City, Mexico

25-28 Marzo 2001 - International Conference on *Paramecium*, Honolulu, Hawaii, e-mail: .  
www.pbrc.hawaii.edu/membio/paramecium/

1-4 Aprile 2001 - 11<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Istanbul, Turkey, e-mail: info@akm.ch

Maggio 2001 - 39<sup>o</sup> Réunion Annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française, Barcellona, e-mail: gplf@cicsun.univ-bpclermont.fr

20-24 Maggio 2001 - WORLDleish 2, Creta, Grecia

22-27 Luglio 2001 - XI International Congress of Protozoology, Gerusalemme, e-mail:  
www.kenes.com/protozoology

7-12 Ottobre 2001 - *Cryptosporidium*: From Molecules to Disease, Fremantle, Western Australia, Australia, e-mail: elisa@congresswest.com.au

## Agenda

ANNO	MESE	Promemoria dei Soci
2001	2	I Soci sono tenuti a versare la quota sociale entro il primo bimestre di ogni esercizio finanziario. Termine ultimo: 28-2.
	10	XXII Convegno Nazionale SIP.
	12	31 - Chiusura Esercizio Finanziario 2001 - Preparazione Bilancio Consuntivo 2001 - Preparazione Bilancio Preventivo 2002

## Selezione Bibliografica

Hoffmann G.L., 1999. *Parasites of North American Freshwater Fishes*. With a foreword by Ernest H. Williams, Jr. 2<sup>nd</sup> ed. Comstock Publishing Associates, a division of Cornell University Press, Ithaca & London. ISBN 0-8014-3409-2., (hard cover). 539 pp., 485 figures, 4 color plates. US \$90.00.

Oliver R.P., Schweizer M., 1999. *Fungal Molecular Biology*. Cambridge University Press, CB2 2RU, UK. ISBN 0 521561167 (hb), ISBN 0521 56784 X 8 (pb). 377 US \$80.00 (hardback), US \$34.95 (paperback).

Vickerman K., Sleigh M.A., Leadbeater B.S.C., McCreedy S., 2000. *A Century of Protozoology in Britain*. British Section of the Society of Protozoologists, Totton, Hampshire, U.K. Paperback, 198 pp., 103 figures; price 20 British pounds (= ca. \$30.00 USA, to which \$3.00 more should be added for postage).

*Parasitology Today, Molecular Approaches to malaria*. October 2000. Vol. 16 No.10 (184) pp. 407-454.