



# **Chemistry, pharmacology and bioactivity of a novel apoptotic compound - a sex regulator in decapod crustaceans with promising environmental and medical applications**



GIUSEPPE REVERBERI

Direttore dell'Istituto di Zoologia della Università di Palermo

Boll Zool. 4-6: 91-94 (1950)



## La situazione sessuale di *Hippolyte viridis* e le condizioni che la reggono.

Continuando le ricerche sul problema della castrazione parassitaria, ho rivolto la mia attenzione a un piccolo decapode delle praterie di Posidonia, l'*Hippolyte viridis*, che può ospitare o la *Bopyrina virbii* o il *Phrixus virbii*: la prima che vive sotto il branchiostegite, il secondo sulla porzione ventrale dell'addome. Una notazione che ebbi modo di fare fin dalle prime raccolte e che confer-



4° Per spiegare come, col cambiare delle condizioni somatiche (accrescimento) lo stato sessuale si inverta, e per restare nella teoria della determinazione genetica del sesso - sebbene in *Hippolyte* non ci siano cromosomi sessuali evidenti - può supporci che delle due componenti geniche l'una, quella maschile, si esprima solo a bassi livelli di energia di sviluppo l'altra, quella femminile, ad alti livelli.

*Hippolyte inermis* Leach (adult female)



## Strategies of sexual inversion in *Hippolyte inermis* Leach (Crustacea, Decapoda) from a Mediterranean seagrass meadow

Valerio Zupo\*

Stazione Zoologica "A. Dohrn", Laboratorio di Ecologia del Benthos, Punta S. Pietro, 80077 Ischia (Napoli)  
Italy

(Received 14 May 1993; revision received 1 December 1993; accepted 11 January 1994)

---

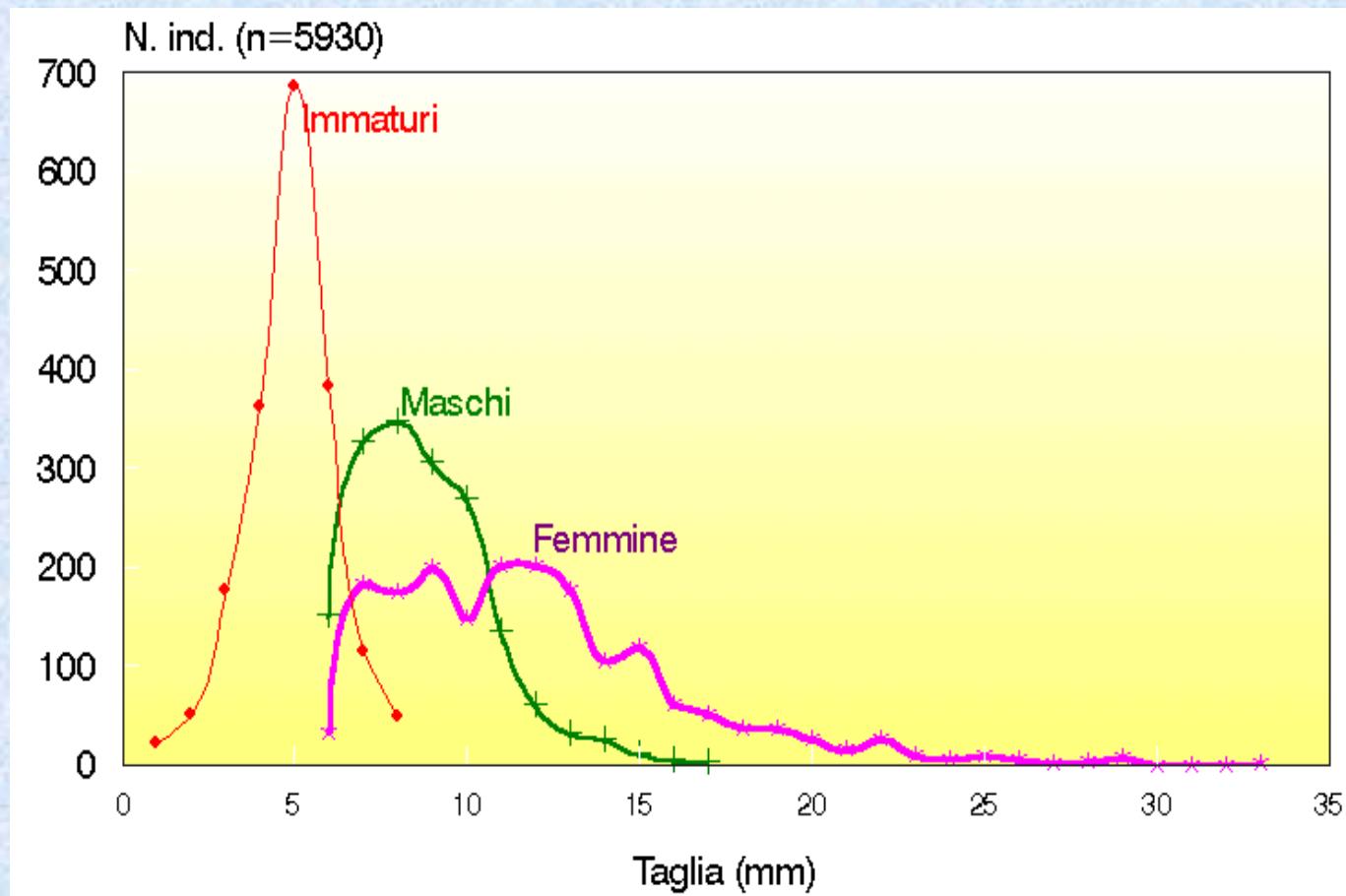
### Abstract

The population of the shrimp *Hippolyte inermis* Leach was investigated for one year along a transect through a bed of *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Two reproductive periods per year were observed and two types of females were identified: one type is small, does not pass through a male stage and spawns in September to produce the next year's male generation. The other is large, passes through a male stage, and spawns in April to produce sufficient males and females for the reproductive period in September. This unusual strategy of sexual inversion could be an adaptation to overcome problems related to predation pressure and seasonal availability of food in *P. oceanica* seagrass meadows.

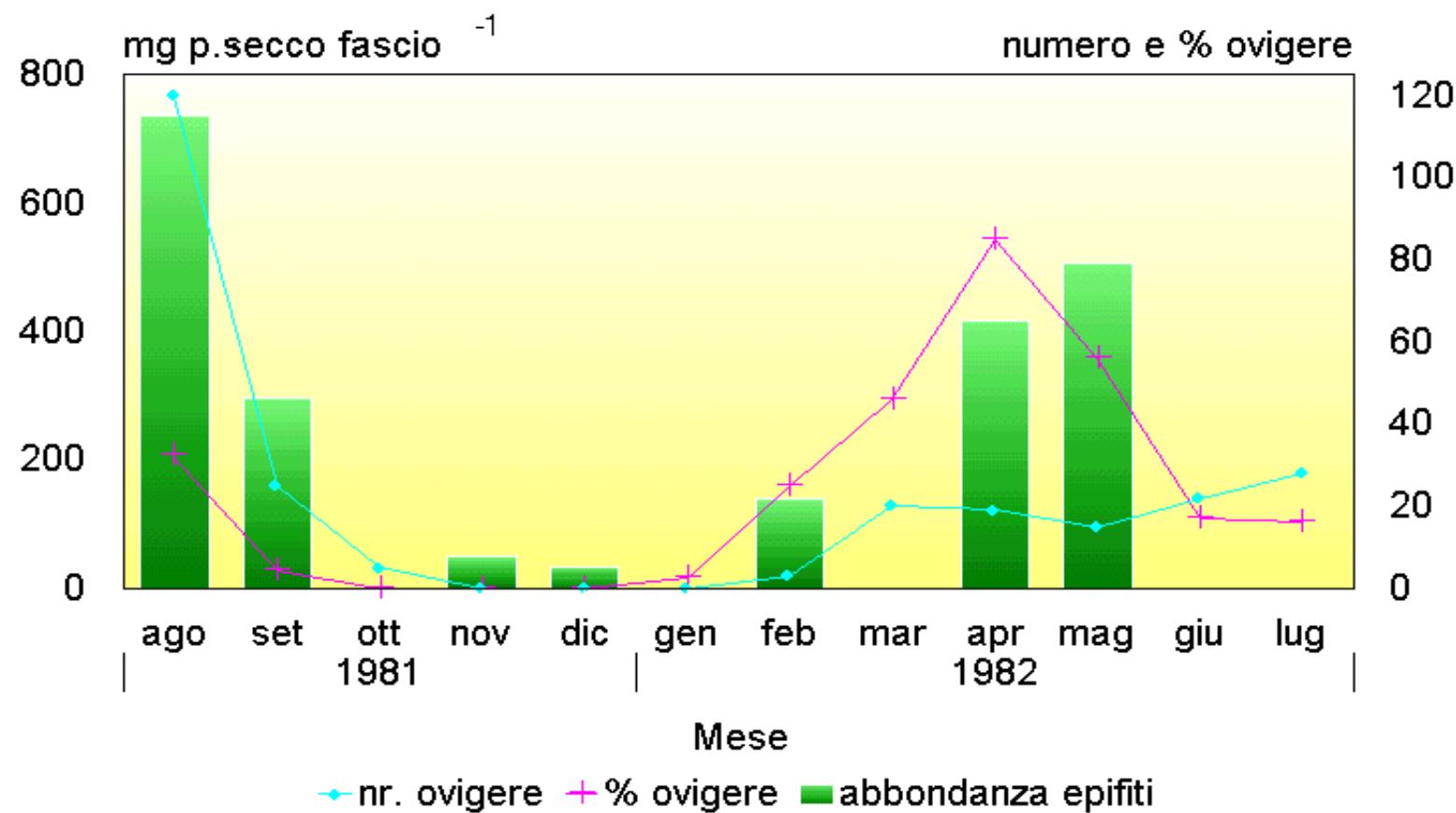
---

**Key words:** Food; *Hippolyte inermis*; life cycle; *Posidonia oceanica*; Sex reversal

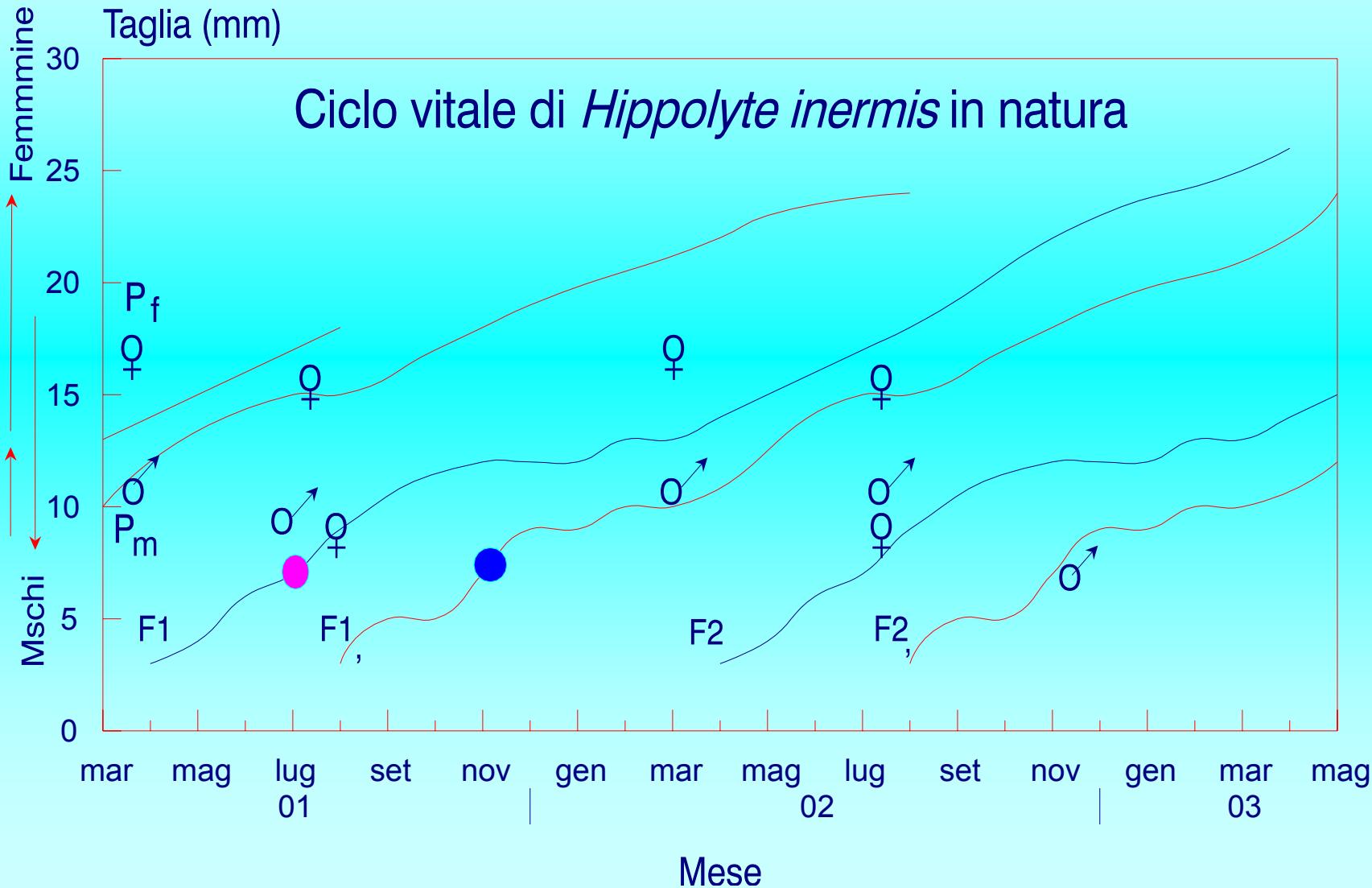
# Sex ratio in the field



# Relationships with epiphytes



# Results of the first field investigation





## Influence of diet on sex differentiation of *Hippolyte inermis* Leach (Decapoda: Natantia) in the field

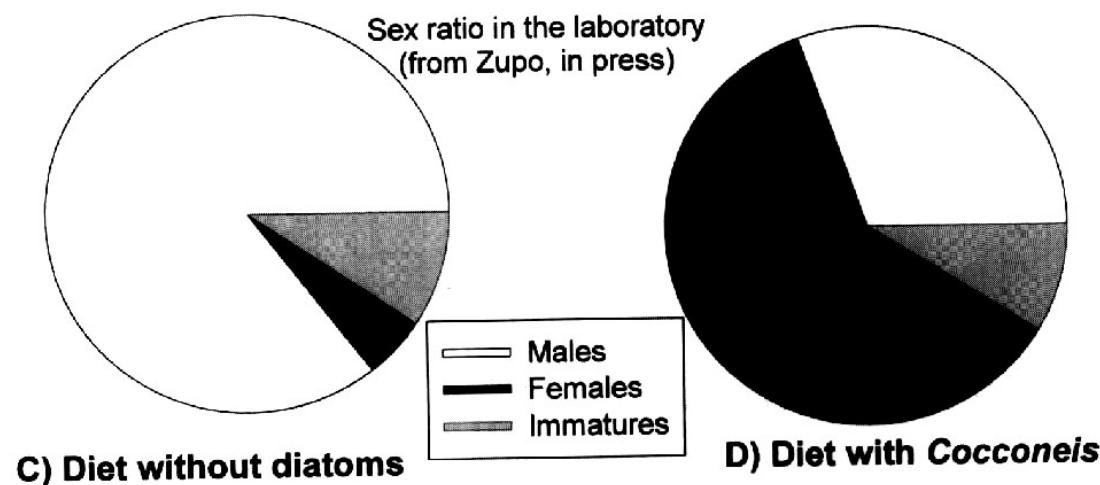
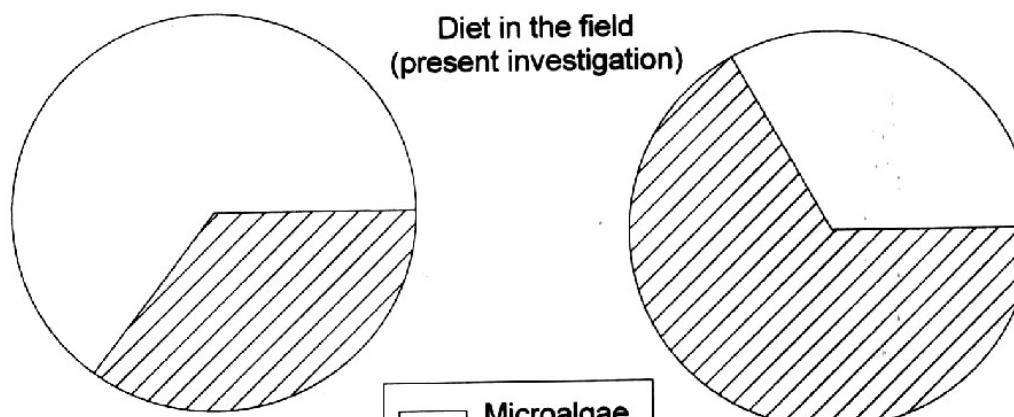
Valerio Zupo

Stazione Zoologica 'A. Dohrn' di Napoli, Laboratorio di Ecologia del Benthos, Punta S. Pietro, I80077 Ischia, Italy. E-mail: vzupo@alpha.szn.it

**Key words:** *Hippolyte inermis*, shrimp, food, sex reversal, development, *Posidonia oceanica*

### Abstract

The gut contents of the shrimp *Hippolyte inermis* were investigated for 1 year along a depth transect through a seagrass bed. Besides size, sex and weight of all individuals were recorded. The diets of immature and adult individuals were compared to detect any influence of food on sex development, since previous investigations indicated a correlation of the life cycle of this protandric species with the abundance of algal food in the environment, and laboratory experiments demonstrated the effect of diatoms of the genus *Cocconeis* on the direct development of females. Results indicated that the shrimp is an opportunistic herbivore, able to feed on both plant and animal items, with a preference for macroalgae and diatoms present on the leaves of *Posidonia oceanica*. Small females, deriving from direct differentiation, had a diet significantly different from that of males. The difference was due to a larger abundance of microalgae in the guts of young females. The influence of microalgal food on the sex reversal mechanism of this species, previously detected through laboratory experiments, was demonstrated to control the life cycle of *H. inermis* in the field.



(Zupo, 2001)

# Effect of microalgal food on the sex reversal of *Hippolyte inermis* (Crustacea: Decapoda)

Valerio Zupo\*

Stazione Zoologica 'A. Dohrn' di Napoli, Laboratorio di Ecologia del Benthos, Punta San Pietro, 80077 Ischia (Naples), Italy

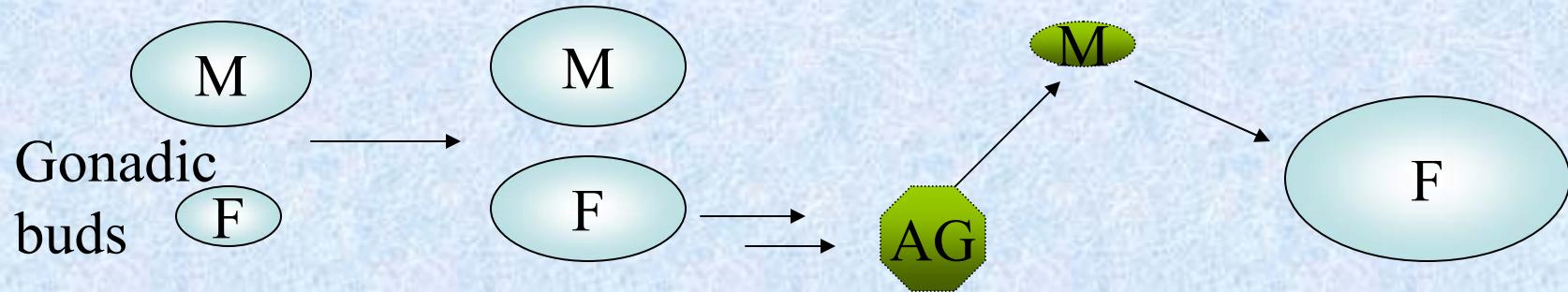
**ABSTRACT:** The effect of diatoms of the genus *Cocconeis* on the sex reversal of the shrimp *Hippolyte inermis* Leach was examined in the laboratory. Randomised experiments were carried out to investigate the functional response of shrimps to various diets. The benthic diatom *Cocconeis neothumensis* was offered, alternatively, during the larval phase and during the postlarval phase, and the results obtained with shrimps produced by individual females were compared. Results demonstrated that diets based on green alga *Enteromorpha* sp. or dry commercial food did not influence the normal protandric development, as most shrimps at sexual maturation were males. Conversely, diets containing *C. neothumensis* did influence the protandric development, as most shrimps at sexual maturation were females and the sex ratio was significantly different from that obtained with diets not containing *C. neothumensis*. These results provide an explanation of the patterns observed in the field, and are in accordance with the seasonal abundances of diatoms in the leaf stratum of *Posidonia oceanica*.

**KEY WORDS:** Diatom · Shrimp · Sex change · Adaptation · Feeding

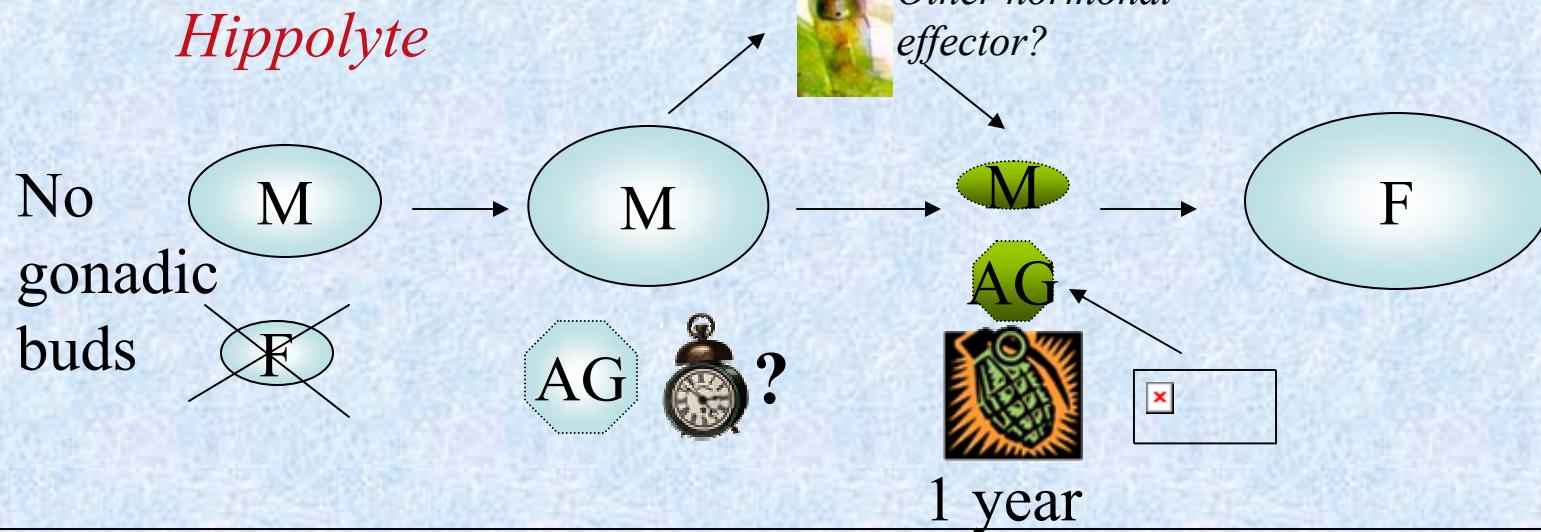
# How food may influence sex?

## How food may influence sex?

### Other decapods



### Hippolyte



# I geni della morte cellulare programmata

*La morte fa parte della vita: nei metazoi ai processi vitali della cellula si affianca un programma genetico di morte il cui chiarimento potrà indicare nuove strategie per la terapia dei tumori*

di Alessandro Quattrone e Sergio Capaccioli

**L**a necessità di prevedere una morte cellulare che fosse inclusa nel programma della vita si afferma con la comparsa sulla Terra, 600 milioni di anni fa, dei primi organismi composti da più cellule. La transizione verso la multicellularità comportò la nascita di nuovi livelli di complessità biochimica, tali da permettere una differenziazione funzionale delle cellule nei vari tessuti e una specializzazione regionale delle diverse aree del corpo.

Il requisito fondamentale per l'integrazione di funzioni specializzate entro l'unità individuale fu l'allestimento di una rete informazionale, ovvero di un sistema di comunicazione intercellulare realizzato tramite scambi di molecole aventi la funzione di segnale. Per queste molecole si affilarono nella cellula complessi apparati di ricezione i quali, attivando specifici pacchetti di geni, erano in grado di trasdurre il segnale e convertirlo nell'esecuzione di uno dei programmi di attività cellulare, consentendo così l'attuazione concertata del progetto vitale.

Se vent'anni fa avessimo chiesto a un biologo quali sono questi programmi, egli li avrebbe identificati con quelli di proliferazione e differenziamento, e li avrebbe forse esemplificati attraverso la serie di divisioni e specializzazioni che permettono all'uovo fecondato di dare origine all'individuo completo. L'osservazione dello sviluppo di un embrione lascia in effetti stupefatti per l'estrema precisione con cui le cellule si moltiplicano, migrano e si differenziano, facendo sì che le parti si organizzino finalisticamente; sembra di assistere a un accuratissimo modellamento plastico, a un evento costruttivo in cui tutto trova il suo posto, e nulla va perduto. La realtà è diversa.

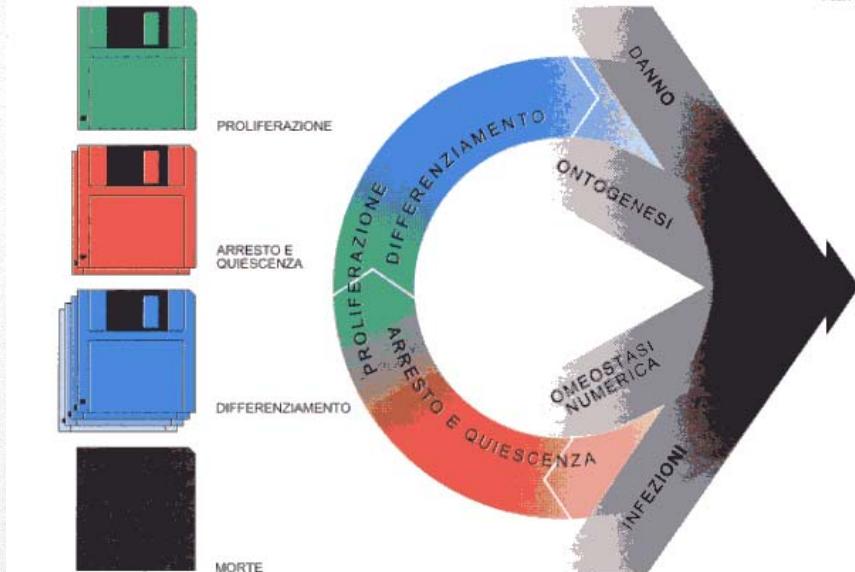
**C**aenorhabditis elegans è un minuscolo verme nematode che completa il suo sviluppo in tre giorni, durante i quali si passa dall'uovo fecondato all'organismo maturo composto da sole 945 cellule. Studi condotti alla fine degli anni settanta dal gruppo di Robert Horvitz al Massachusetts Institute of Technology di Cambridge, negli Stati Uniti, hanno permesso di definire l'intera genealogia cellulare di questo invertebrato, ovvero di stabilire il percorso spaziale e temporale che conduce a ciascuna cellula dell'adulto. Tale percorso è invariante, cioè esattamente lo stesso in ogni individuo, e implica per ogni individuo la morte di esattamente 131 cellule. Nel corso dell'ontogenesi di *C. elegans* un numero preciso di cellule è quindi predestinato all'eliminazione. Come si compie tale destino? La morte di queste cellule è la risposta passiva a un qualche stimolo esterno, oppure è l'esecuzione di un programma ben determinato, un terzo programma che affianca quelli di proliferazione e di differenziamento?

La descrizione dello sviluppo di *C. elegans* fatta da Horvitz rappresenta l'accurata analisi quantitativa di un fenomeno ontogenetico talora molto più evidente, come nel caso delle ecatombe di cellule che accompagnano la metamorfosi degli insetti olometaboli o del girino che si tramuta in rana. Nello sviluppo dei mammiferi esempi di morte cellulare massiva si hanno a livello del sistema immunitario, ove si verifica un vero olocausto di linfociti. T per i processi di selezione che ne permettono l'alta specificità nei confronti di ciò che è estraneo all'organismo, e del sistema nervoso, che si struttura in una rete neurale soprattutto in virtù dell'eliminazione di cellule soprannumerarie. Quindi, correggendo l'immagine prima pro-

posta, l'ontogenesi si configura sì come la messa in forma di un modello plastico, ma nel quale l'aggiunta e la redistribuzione di materiale non sempre in realtà sono sufficienti a compiere l'opera e, almeno per certe parti, è piuttosto l'eliminazione di un eccesso a far da scultore.

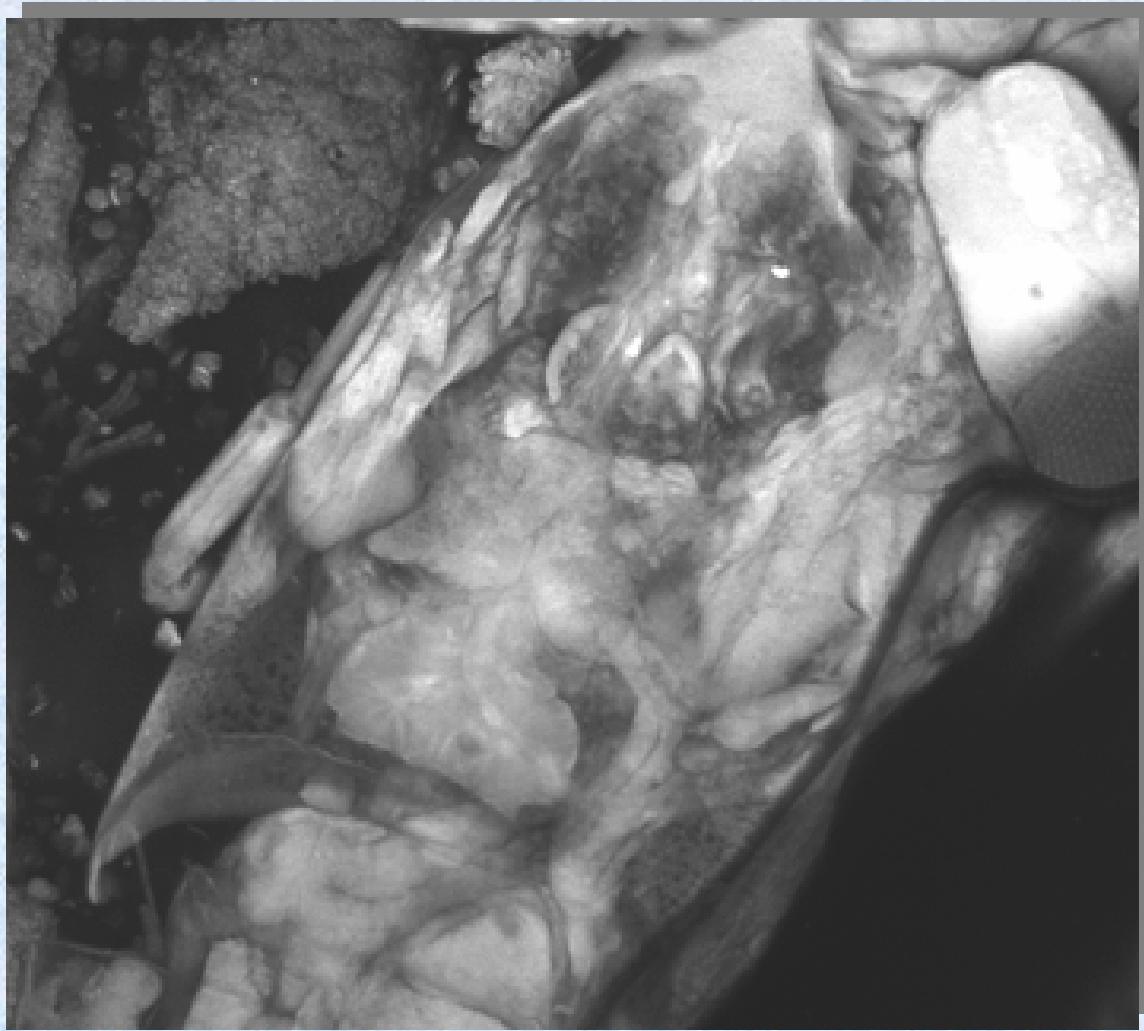
Il significato della morte cellulare va oggi ben oltre i confini dello sviluppo embrionale, interessando una varietà di processi biologici per l'intero arco di vita di tutti gli organismi multicellulari, fino alla senescenza. Nell'individuo adulto la perdita di singoli elementi riveste un ruolo primario nel mantenimento dell'omeostasi numerica delle popolazioni cellulari dei tessuti non perenni, tanto che alterazioni del suo controllo sono alla base dei più vari processi patologici, dall'atrofia all'iperplasia, al cancro, a malattie del sistema immunitario e nervoso. Altri fenomeni di morte cellulare da sempre noti ai patologi sono quelli associati all'azione lesiva di agenti chimici (tossine, veleni), fisici (radiazioni) e biologici (virus, batteri); in questi casi la risposta alla domanda di prima, se cioè l'evento di morte riflette l'esecuzione di un programma, sembrerebbe a sfavore di tale possibilità, riconduendone invece a un processo passivo conseguente all'irreversibilità del danno subito.

**O**ltre un secolo è trascorso dacché Rudolf Virchow, padre della patologia cellulare, fece la prima descrizione di una forma di morte della cellula, la necrosi, che consegue appunto alla transizione all'irreversibilità di un danno esteso a un'intera area di tessuto. Pur nell'ampia variabilità di cause ed effetti che la precedono, solitamente la necrosi si manifesta con eventi stereotipati ed è innescata da una grave lesione



L'intero arco vitale di una cellula può essere visto come l'esecuzione concertata di programmi di proliferazione, arresto-quiescenza, differenziamento e morte, corrispondenti ciascuno all'attivazione o inattivazione di specifici pacchetti di geni. In alto, un feto umano di 14 settimane esemplifica il processo dell'ontogenesi, durante il quale è attivo il programma

ma di morte cellulare che concorre al modellamento dividue in via di sviluppo. Come risulta dallo schema, nell'adulto questo programma presiede poi all'omesostasi numerica delle popolazioni cellulari e rappresenta, che sorprendentemente, una risposta attiva della cellula ai stimoli lesivi indotti da agenti fisici, chimici e biologici.



TUNEL (rapid detection of apoptosis)

# E.U. Pharmapox

*Chemistry, pharmacology and bioactivity of a novel apoptotic compound - a sex regulator in decapod crustaceans with promising environmental and medical applications*



*We aim at isolating, characterizing and investigating the bioactivity, the mechanism of action and the biotechnological applications of a new, peculiar factor present in marine diatoms.*

# Objectives (3 workpackages)

The main objectives to be reached in 33 months are:

*WP 1: to extract, isolate and purify the apoptotic compound(s) from diatoms;*

*WP 2: to characterize and study the bioactivity of this compound(s) as a sex regulator in decapod crustaceans;*

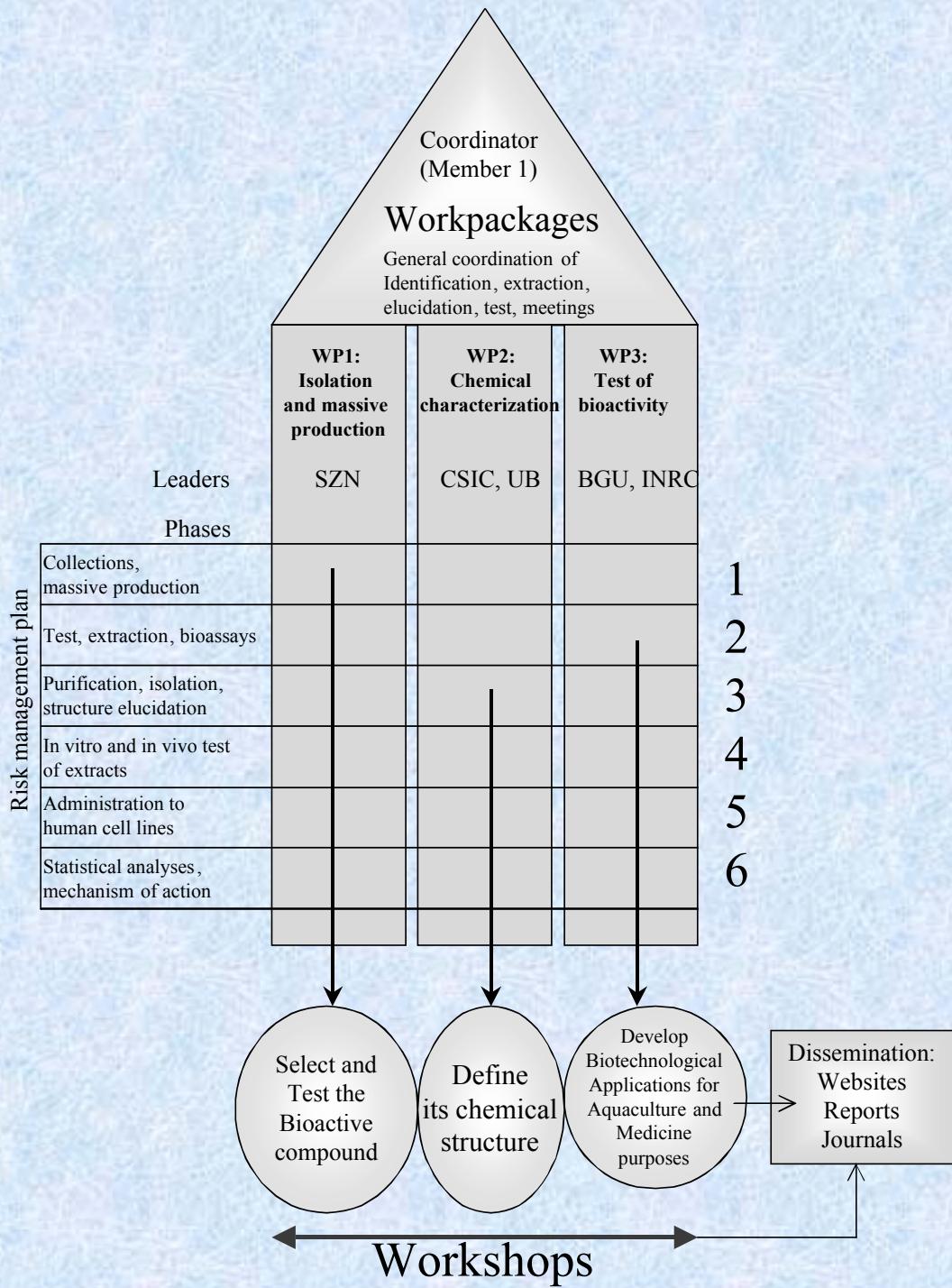
*WP 3: to investigate its possible biotechnological applications by testing its antitumoral activity and aquaculture efficacy.*

# Multidisciplinarity

## List of Participants

Partic. Role*	Partic. no.	Participant name	Participant short name	Country	Date enter project**	Date exit project**
CO	1	Stazione Zoologica "A. Dohrn"	SZN	Italy	1	33
CR	2	Ben Gurion University of the Negev	BGU	Israel	1	33
CR	3	Consejo Superior de Investigaciones Cientificas	CSIC	Spain	1	33
CR	4	Universitat de Barcelona	UB	Spain	1	33
CR	5	Istituto Nazionale per la Ricerca sul cancro	INRC	Italy	1	33

# Structure of the project



# Work to be done....

## WP1

- Diatom collection
- Diatom isolation
- Diatom culture
- Massive cultures

## WP2

- extraction of fractions

## WP3

- Food preparation
- Sampling of shrimps
- Production of postlarvae
- Dried diatom bioassay
- Fraction bioassay
- Analysis of apoptosis

- Fraction Further purification
- Structure elucidation
- Synthesys

- Crustacean cell lines**
- In vivo tests**
- In vitro tests**
- Tests on human cells**

- Compound bioassay

- Data analysis- Spread of biotechnologies