



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di laurea magistrale

Biologia marina

**Studio del metabolismo lipidico del tonno rosso
(*Thunnus thynnus*) nel Mediterraneo: nuove implicazioni
per la gestione dello stock ittico**

**Lipid metabolism of Atlantic Bluefin tuna (*Thunnus
thynnus*) in the Mediterranean Sea: new implications for
stock management**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Adolfo Lepre

Relatore:

Prof.ssa Giorgia Gioacchini

Correlatori:

Prof.ssa Oliana Carnevali

Dott.ssa Michela Candelma

Sessione straordinaria
Anno Accademico 2018-2019

Indice

1	<u>Introduzione</u>	3
1.1	<i>Gestione dello stock</i>	3
1.1.1	<i>Problematiche</i>	3
1.1.2	<i>ICCAT</i>	4
1.1.3	<i>Pesca del tonno rosso</i>	8
1.1.4	<i>Area di pesca</i>	9
1.1.5	<i>Allevamenti</i>	10
1.2	<i>Biologia del tonno rosso</i>	13
1.2.1	<i>Collocazione tassonomica</i>	13
1.2.2	<i>Morfologia</i>	15
1.2.3	<i>Alimentazione</i>	17
1.2.4	<i>Habitat e distribuzione</i>	18
1.2.5	<i>Migrazione</i>	19
1.3	<i>Riproduzione del tonno rosso</i>	22
1.3.1	<i>Stadi di sviluppo della gonade</i>	22
1.3.2	<i>Controllo ormonale della riproduzione</i>	27
1.4	<i>Metabolismo lipidico</i>	32
1.4.1	<i>Regolazione</i>	33
2	<u>Scopo della tesi</u>	39

3	<u>Materiali e metodi</u>	<u>41</u>
	<i>3.1 Campionamento</i>	<i>41</i>
	<i>3.2 Disegno sperimentale</i>	<i>42</i>
	<i>3.3 Istologia</i>	<i>44</i>
	<i>3.4 Analisi molecolare</i>	<i>44</i>
	<i>3.4.1 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA</i>	<i>44</i>
	<i>3.4.2 Real Time PCR</i>	<i>45</i>
	<i>3.5 Dati statistici</i>	<i>47</i>
4	<u>Risultati</u>	<u>48</u>
	<i>4.1 Analisi istologiche</i>	<i>48</i>
	<i>4.2 Analisi molecolari</i>	<i>52</i>
5	<u>Discussione</u>	<u>57</u>
6	<u>Conclusioni</u>	<u>66</u>
7	<u>Ringraziamenti</u>	<u>68</u>
8	<u>Bibliografia</u>	<u>69</u>

Introduzione

1.1 Gestione dello stock

Il tonno rosso (*Thunnus thynnus*) è una specie ittica molto importante economicamente, che ha affascinato scienziati e filosofi per secoli, fin dagli antichi greci e romani. Tra i grandi pelagici rappresenta, infatti, la specie più rilevante a livello mondiale per volumi commercializzati (Fromentin and Powers, 2005).

1.1.1 Problematiche

In passato, la forte domanda e l'assenza di piani di gestione adeguati hanno causato un eccessivo sforzo di pesca, danneggiando in maniera considerevole questa specie già in declino. Il tonno rosso è stato infatti ampiamente sfruttato nel Mediterraneo per migliaia di anni, ma i quantitativi pescati hanno acquisito un'importanza crescente soprattutto a partire dagli anni '90 (Figura 1), specialmente a seguito del forte aumento della domanda giapponese, alimentata dalla diffusione del sushi-sashimi, il noto piatto a base di pesce crudo. Infatti, nel 1998, le navi con reti da circuizione erano due volte più lunghe e quattro volte più potenti rispetto al 1970 (Fromentin and Powers, 2005).

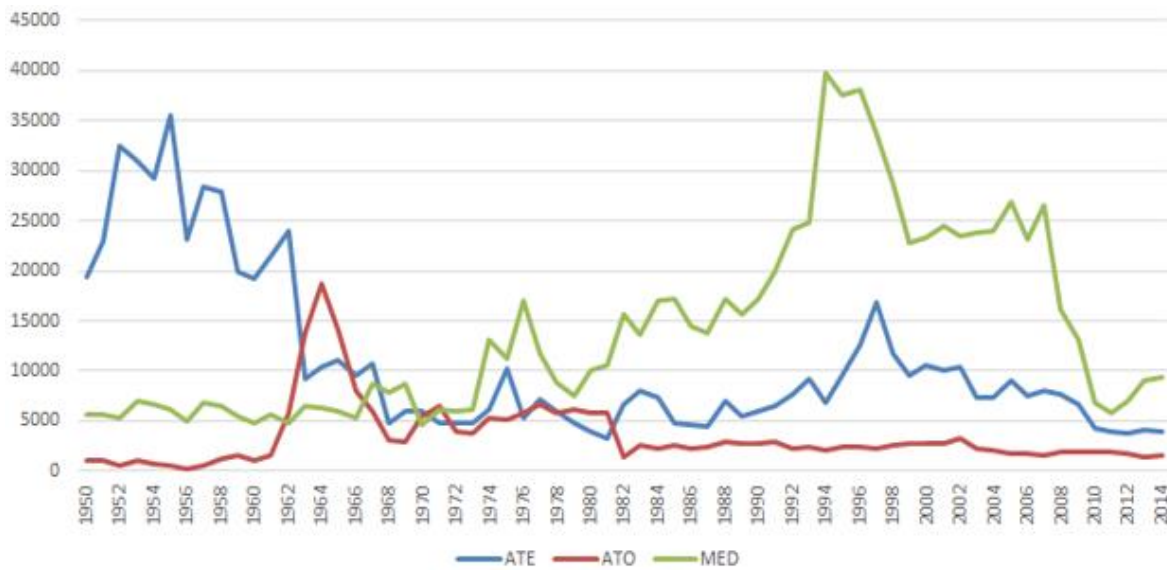


Figura 1: Catture totali di *Thunnus thynnus* divise per area geografica, 1950-2014. (Elaborazione su dati ICCAT)

Ad incidere ulteriormente sulla situazione dello stock del tonno rosso, è stato lo sviluppo degli impianti di allevamento, che hanno incrementato la loro attività nel Mediterraneo nel corso degli anni.

1.1.2 ICCAT

L'importanza del tonno rosso è stata sottolineata a livello internazionale a partire dal 1966, durante la Conferenza di Rio de Janeiro, che ha instaurato la Commissione Internazionale per la Conservazione dei Tonni Atlantici (International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas - ICCAT).

L'ICCAT è una commissione internazionale composta da paesi membri

firmatari, il cui obiettivo è la gestione degli stock di tonno rosso e specie simili, assicurando la massima cattura sostenibile. I paesi membri forniscono ogni anno all'ICCAT sia dati statistici di cattura e di sforzo di pesca del tonno rosso e sia risultati di ricerca di rilevanza biologica ed ecologica. Le analisi di valutazione degli stock sono eseguite dal SCRS, un comitato composto da scienziati degli Stati membri.

Nel novembre del 2006, l'ICCAT ha redatto un piano quindicennale di ricostituzione dello stock del tonno rosso nell' Atlantico orientale e nel Mediterraneo, recepito dal regolamento (CE) n. 1559/2007, successivamente abrogato dal regolamento (CE) n.302/2009, a sua volta abrogato dal regolamento (UE) n. 2016/1627 del 14 settembre 2016.

Tra i regolamenti previsti è di fondamentale importanza la progressiva riduzione del Totale Ammissibile di Catture (TAC), soprattutto durante il periodo 2007-2014 (Figura 2). Il TAC rappresenta la quantità massima di pesci che possono essere prelevati da un determinato stock in un certo periodo di tempo. Questo ha permesso una diminuzione sostanziale delle catture; da 50.000-61.000 tonnellate, tra metà degli anni '90 e il 2007, a circa 13.000 tonnellate nel 2010-2014, riducendo drasticamente la pressione sullo stock (ICCAT,Report, 2019).

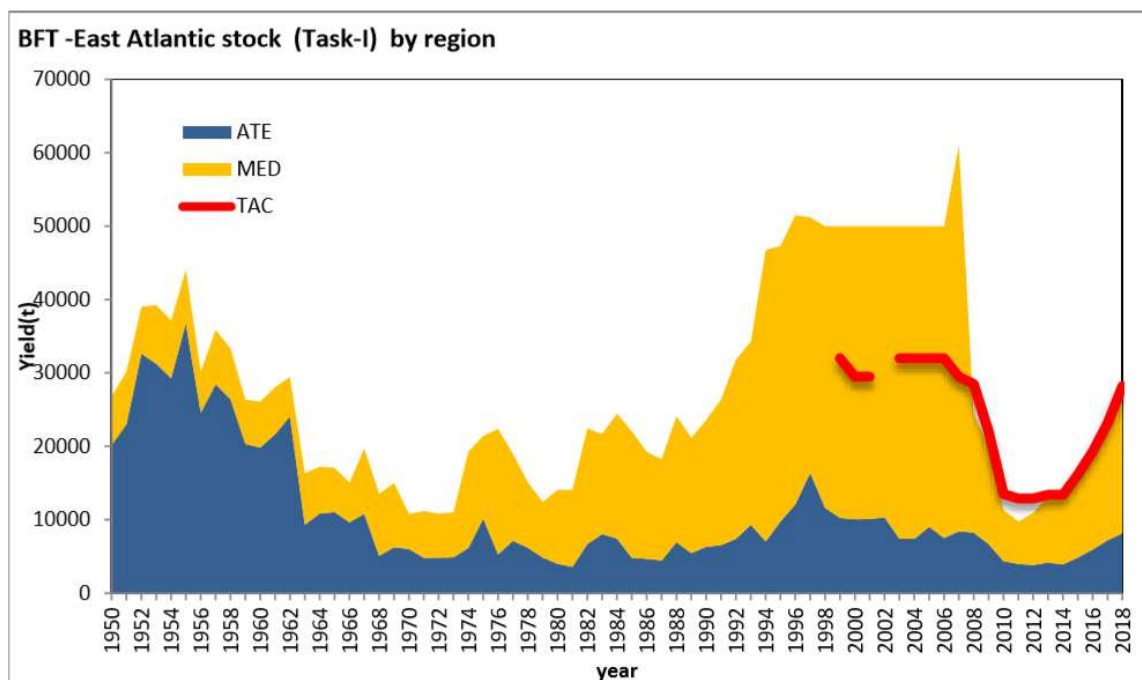


Figura 2: Catture totali dello stock orientale di *Thunnus thynnus*, divisi per aree geografiche, con il totale ammissibile di catture (TAC). (ICCAT, 2019)

Le altre misure adoperate nel piano di recupero, al fine di disciplinare la pesca di questa specie, hanno riguardato: la riduzione della stagione di pesca per le tonniere con reti a circuizione, il divieto di utilizzo di aerei o elicotteri per la ricerca del tonno rosso, una nuova taglia minima di pesca (30kg o 115 cm di lunghezza alla forca), l'avvio di un progetto regionale ICCAT per garantire un controllo integrale da parte di osservatori di tutte le tonniere e di tutte le operazioni di trasferimento, il divieto di effettuare trasbordi di pesce in mare, con obbligo di effettuare gli stessi soltanto nei porti designati, disposizioni in

materia di pesca sportiva e ricreativa, e altri controlli volti a garantire la l'efficacia del piano di gestione.

Al seguito dei regolamenti applicati, è stato riscontrato un miglioramento dello stato dello stock: infatti i risultati del 2017, hanno indicato un aumento della *spawning stock biomass* (SSB) a partire dal 2010 (Figura 3) (ICCAT, 2017).

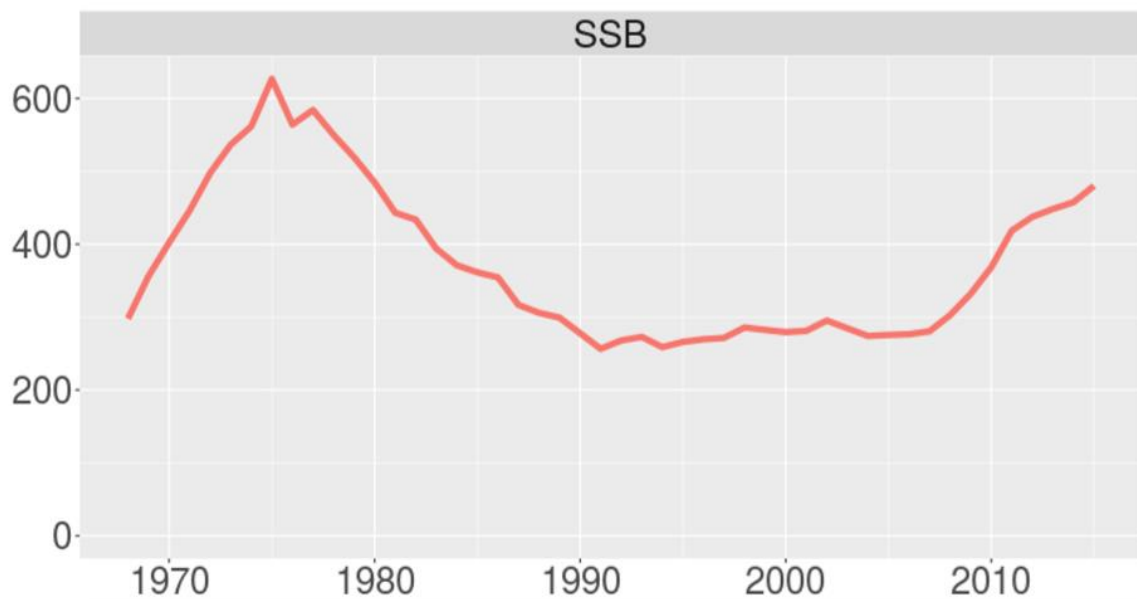


Figura 3: *Spawning stock biomass* (SSB) di *Thunnus thynnus* in migliaia di tonnellate nel corso degli anni. (ICCAT, 2017)

Questo ha permesso con la raccomandazione 17-07 (recante un Piano pluriennale di conservazione per la salvaguardia dello stock di tonno rosso nell'Atlantico occidentale e nel Mediterraneo), adottata dall'ICCAT nel 2017, di incrementare, rispetto alla precedente raccomandazione 14-04, il Totale

Ammissibile di Cattura (TAC), aumentando le quote di cattura per il triennio 2018-2020, che passano da 24 mila tonnellate a 36 mila tonnellate.

Nel 2018 l'ICCAT, con la raccomandazione 18-02 (che abroga la raccomandazione 17-07), ha stabilito il passaggio dal piano di ricostituzione degli stock ad uno di gestione.

1.1.3 Pesca del tonno rosso

Thunnus thynnus è una risorsa molto importante per la pesca globale. Scavi archeologici hanno dimostrato che la pesca di tale specie avviene nel Mediterraneo fin dal VII millennio a.C. (Fromentin and Powers, 2005). Inizialmente, i pescatori utilizzavano principalmente la lenza e diverse varietà di sciabiche, in particolare quelle da spiaggia. Tra il XVI e il XIX secolo, le sciabiche da spiaggia furono progressivamente sostituite dalle tonnare (Ravier and Fromentin, 2001). Le tonnare sono un sistema di reti fisse disposte perpendicolarmente alla costa, in modo da deviare i tonni migranti fino a condurli in recinti via via più piccoli, fino a raggiungere la camera della morte, dove avviene la mattanza. Tuttavia, all'inizio del XX secolo, l'incremento dell'inquinamento, del rumore e del traffico costiero ha contribuito alla riduzione dell'efficienza delle tonnare. Intorno alla metà degli anni novanta, la rete a circuizione e le flotte di palangari iniziarono a sostituire le tradizionali

tecniche per la pesca del tonno rosso. Negli anni ottanta, con lo sviluppo del mercato giapponese di sushi-sashimi, lo sfruttamento del tonno rosso è divenuto molto più proficuo che in passato. Di conseguenza, tra gli anni ottanta e novanta si è registrato un forte aumento dell'efficienza e della capacità dei pescherecci. Nuove tecniche di stoccaggio e sistemi di ingabbiamento sono stati introdotti, al fine di migliorare la strategia e l'efficienza di pesca (Fromentin and Powers, 2005).

Attualmente la tecnica più utilizzata è la pesca con le reti a circuizione, in cui i banchi di tonno vengono individuati e circondati con una rete, grazie all'ausilio di più imbarcazioni. Successivamente i tonni catturati vengono trasferiti vivi, tramite un rimorchiatore, in gabbie di allevamento in mare aperto.

1.1.4 Area di pesca

Le zone di cattura del tonno rosso in Mediterraneo, sono associate principalmente ai fenomeni di *upwelling* (Figura 4):

- Isole Baleari
- Sicilia
- Malta
- Turchia

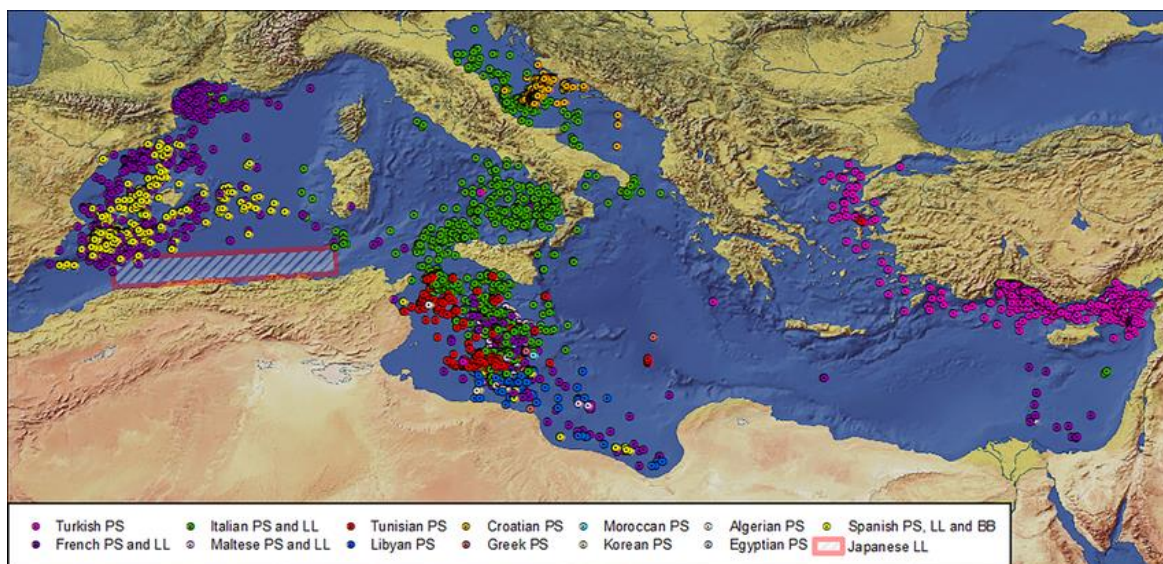


Figura 4: Aree di pesca nel Mediterraneo di *Thunnus thynnus*. (Cerme et al., 2015)

1.1.5 Allevamenti

Una volta che i tonni vengono pescati e trasferiti nelle gabbie dei rimorchiatori, i quali viaggiano a una velocità di rimorchio che di solito non supera 1–1,5 nodi onde evitare l'eccessiva mortalità, sono trasportati fino agli allevamenti (farm). L'allevamento del tonno nell'area del Mediterraneo è iniziato in Andalusia, in Spagna, nel 1985 e si è esteso nel 1996 in Croazia, nel 2000 a Malta e nel 2001 in Italia, per poi svilupparsi in altri Paesi (FAO,2005).

In Mediterraneo, gli allevamenti iniziano la loro attività con l'arrivo del tonno rosso ad inizio estate (giugno/luglio). Tale stagione di arrivo di tonno rosso dura un paio di mesi, tuttavia, nel caso della Croazia e di Malta, la stagione può estendersi fino alla fine dell'estate (settembre) (Ottolenghi, 2008).

Le farm mediterranee utilizzano, in gran parte, gabbie circolari galleggianti in mare aperto. La dimensione delle gabbie varia da 30 a 90 m di diametro, con una profondità delle reti generalmente comprese tra 15 e 20-30 metri.

La stagione di ingrasso, che in genere si estende per diversi mesi, è strettamente legata alla domanda di mercato. Infatti, una volta che il tonno raggiunge le dimensioni e il peso desiderati viene sacrificato, per essere susseguentemente venduto, prevalentemente, al mercato giapponese. Durante questo periodo, il tonno rosso è alimentato principalmente con una dieta mista, composta principalmente da una varietà di piccole specie pelagiche tra cui sardine (*Sardina pilchardus*), aringhe (*Clupea harengus*), sgombri (*Scomber japonicus*), e calamari (*Illex* sp.). La proporzione e il volume del mangime varia tra i diversi Paesi e da una farm all'altra, con una composizione basata anche sulla disponibilità delle specie generalmente utilizzate (Ottolenghi, 2008).

Per stimare con maggiore precisione il numero e il peso del pesce che arriva nelle farm, il 100% delle operazioni di ingabbiamento deve essere coperto da un programma che utilizza sistemi di telecamere stereoscopiche o metodi

alternativi che garantiscano lo stesso livello di precisione e accuratezza. Quando questi risultati indicano che le quantità di tonno rosso che si stanno introducendo nella gabbia differiscono dalle catture dichiarate, viene avviata un'indagine. Se il risultato dell'indagine evidenzia che il numero e / o il peso medio del tonno rosso supera quello dichiarato, esso deve essere rilasciato nello spazio di tre settimane successive dalla fine delle operazioni di ingabbiamento, al fine di aumentare la probabilità che i pesci tornino allo stock (ICCAT, Raccomandazione 18-02).

Tuttavia ciò non sempre accade, di fatto alcuni tonni vengono rilasciati solo dopo il completamento delle operazioni di sacrificio, e quindi dopo il periodo di ingrasso, in particolare i pesci che non sono coperti da un documento di cattura di tonno rosso dell'ICCAT. Di conseguenza tali esemplari mostreranno una condizione alterata rispetto al periodo di pre-ingrasso, che può portare all'insorgenza di problemi nell'organismo.

1.2 *Biologia del tonno rosso*

1.2.1 Collocazione Tassonomica

Thunnus thynnus (Linnaeus, 1758), comunemente conosciuto in Italia come “Tonno Rosso” o anche “Tonno pinna blu” e a livello internazionale come “Atlantic Bluefin Tuna”, è un grande pesce pelagico appartenente alla famiglia Scombridae.

Subphylum: *Vertebrata*

Superclasse: *Gnathostomata*

Classe: *Actinopterygii*

Sottoclasse: *Neopterygii*

Infraclasse: *Teleostei*

Superordine: *Acanthopterygii*

Ordine: *Perciformes*

Famiglia: *Scombridae*

Sottofamiglia: *Scombrinae*

Genere: *Thunnus*

La famiglia Scombridae comprende 54 specie ed è suddivisa in 2 sottofamiglie: *Gasterochismatinae*, che comprende un unico genere e *Scombrinae*, costituito da 14 generi.

Il genere *Thunnus* è compreso nella sottofamiglia *Scombrinae*, e le specie appartenenti a tale genere posseggono un corpo fusiforme, non compresso lateralmente e sono caratterizzate dalla presenza di due pinne dorsali, contigue o separate, di dimensioni variabili. Hanno un'unica pinna anale simmetrica alla seconda dorsale, mentre la pinna caudale risulta lunata, ampia e robusta. Il peduncolo caudale assume una conformazione sottile, ed è dotato alla base di almeno 2 piccole carene per ciascun lato (Mather et al., 1995; FishBase).

Il corpo è ricoperto da piccole scaglie, che spesso possono delineare un'area nella porzione anteriore toracica denominata *corsaletto*, costituita da scaglie più spesse e di grande importanza tassonomica. In alcune specie il *corsaletto* può rappresentare l'unica porzione del corpo ricoperta da squame (Mather et al., 1995; FishBase).

Sono prevalentemente rapidi predatori epipelagici, con una distribuzione che varia da specie più costiere a specie che prediligono acque più profonde. Sono complessivamente diffusi in tutti i mari, ma la loro massima diversità si riscontra nelle regioni tropicali.

Le femmine della maggior parte delle specie raggiungono dimensioni maggiori rispetto agli individui di sesso maschile.

La deposizione, spesso costiera, avviene principalmente in acque tropicali e subtropicali. Le uova sono pelagiche e si schiudono in larve planctoniche (Mather et al., 1995; FishBase).

Appartengono a questo genere alcune delle specie ittiche più importanti a livello commerciale e di grande rilevanza per quanto concerne la pesca sportiva.

1.2.2 Morfologia

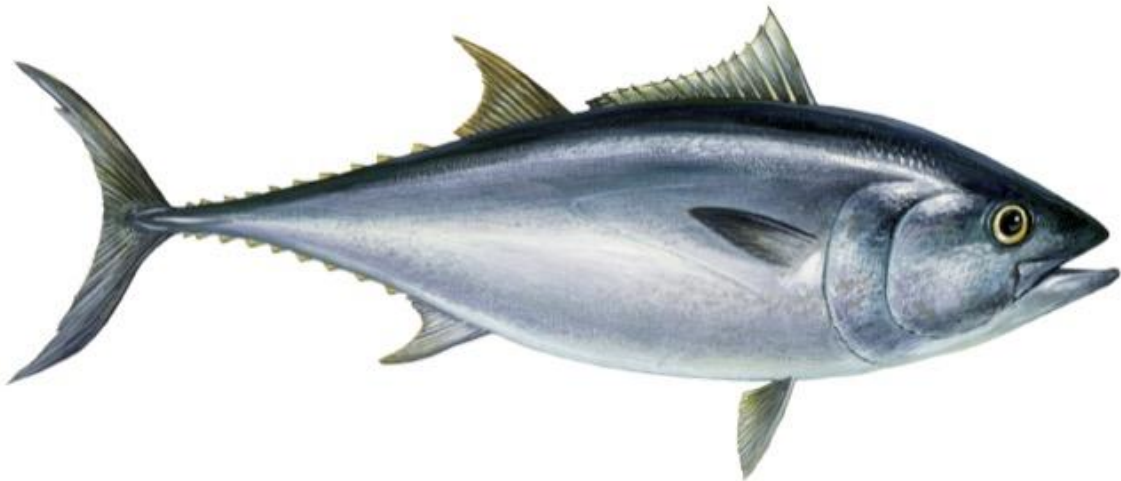


Figura 5: Thunnus thynnus. <https://mare.istc.cnr.it>

Caratterizzato da un corpo massiccio e fusiforme, con un peduncolo caudale sottile, il tonno rosso presenta una colorazione tipica dei pesci pelagici, blu scuro sulla porzione dorsale, bianca–argentea sui fianchi e sul ventre (Figura 5).

Il corpo è ricoperto di squame molto piccole, che diventano gradualmente più grandi e spesse nei pressi della pinna pettorale. La bocca, non molto grande, è terminale ed è dotata di una sola fila di denti conici, piccoli e appuntiti (Mather et al., 1995; FishBase).

Presenta due pinne dorsali: la prima, composta da 14-15 raggi spinosi, ha forma triangolare e una colorazione bluastra, la seconda, composta da 1 raggio spinoso e 13 molli, è contigua alla prima e risulta rosso-bruna. La seconda pinna dorsale è susseguita da 9-10 pinnule di colore giallo cromo.

Il tonno rosso può raggiungere dimensioni notevoli, con una lunghezza che può superare i 3 m e un peso corporeo che può arrivare a sfiorare i 900 kg (Fromentin and Powers, 2005).

Il ritmo di accrescimento in lunghezza dei giovanili è rapido, mentre diminuisce negli individui adulti, nei quali tuttavia si incrementa considerevolmente il peso corporeo (Api et al., 2018; Fromentin & Powers, 2005). A 10 anni, un tonno raggiunge in generale dimensioni di 200 cm, con un peso di 150 kg.

Inoltre alcuni studi suggeriscono che i maschi crescono più velocemente rispetto agli individui femminili (Mather et al., 1995).

Il sistema circolatorio peculiare di *T. thynnus* permette a questo grande pelagico di mantenere la temperatura di muscoli, cervello, occhi e viscere più calda di quella esterna, infatti deve necessariamente continuare a nuotare per produrre calore e per respirare (Fromentin and Powers, 2005).

1.2.3 Alimentazione

Definito come predatore attivo, carnivoro e opportunista, il tonno rosso si posiziona tra i *top predators* negli ambienti in cui vive e risulta predato solo da squali e grandi cetacei, oltre che destinato al consumo umano.

Analisi dei contenuti stomacali hanno dimostrato che la dieta cambia con il variare dell'età e quindi con l'aumento di taglia: le larve prediligono specie appartenenti al piccolo zooplancton, principalmente naupli di copepodi, i giovanili si nutrono di crostacei, piccoli pesci e cefalopodi, mentre gli esemplari adulti si cibano di pesci bentonici (Ammoditidi) e pelagici (soprattutto Clupeidi), ma anche di salpe e meduse, e in minima parte di specie sessili e demersali come cefalopodi, granchi e spugne (Chase, 2002). Gli adulti del tonno rosso possono immergersi fino a una profondità di 1000 metri per procacciarsi il cibo (Muhling et al., 2013).

1.2.4 Habitat e distribuzione

Fra le altre specie di tonno, il tonno rosso è quella che ha la più estesa distribuzione geografica: popola l'intero ecosistema pelagico dell'Oceano Atlantico (dalla penisola scandinava al Sudafrica) e i suoi mari adiacenti (dal Mar Nero al Golfo del Messico), anche se tra questi ultimi è nel mar Mediterraneo che riscontriamo principalmente la sua presenza (Fromentin and Powers, 2005) (Figura 6).

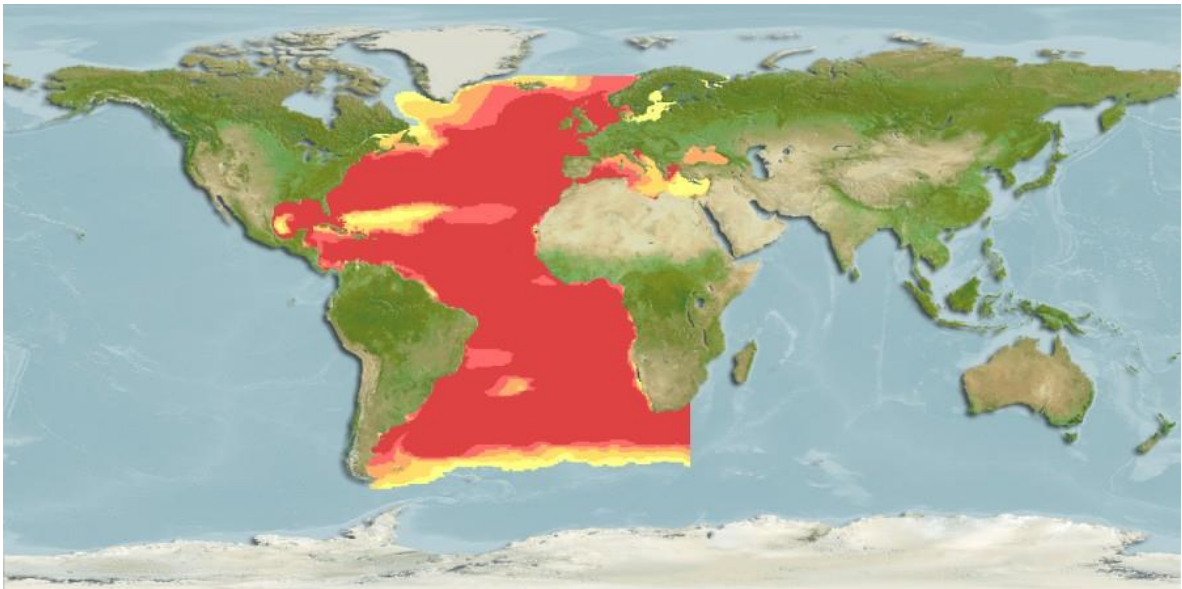


Figura 6: Distribuzione geografica di *Thunnus thynnus*.
https://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular

I *tagging* di archiviazione e le informazioni di *tracking* confermano che il tonno rosso può sopportare in maniera efficiente sia basse temperature (inferiore a

3°C) sia alte temperature (superiore a 26°C), mentre mantiene la temperatura corporea stabile (Block et al, 2001).

Nonostante la sua presenza preferenziale nelle acque pelagiche superficiali, sia gli adulti che i giovanili di questa specie possono raggiungere una profondità di 500-1000 metri. Similmente alle altre specie di tonno, la distribuzione geografica e i movimenti del tonno rosso sono controllati da range preferenziali e dai gradienti di temperatura (Fromentin and Powers, 2005).

Studi recenti convergono sull'idea che individui adulti e giovanili, guidati dalla necessità di foraggiamento, si aggregano frequentemente lungo i frontali oceanici; note sono infatti le aree di *upwelling*, come le coste occidentali del Marocco e del Portogallo, e le zone del Nord Atlantico associate alla circolazione generale (Fromentin & Powers, 2005; Mather et al., 1995).

1.2.5 Migrazione

T. thynnus è caratterizzato da due tipi di movimenti migratori: uno considerato passivo, all'interno dell'habitat e in risposta a variazioni di condizioni biotiche e abiotiche, e uno attivo, tra habitat diversi a seguito di un cambiamento ontogenetico dei requisiti biologici e correlato al bisogno di nutrimento e di riproduzione (Humston et al., 2000).

L'ICCAT attualmente gestisce il tonno rosso come due distinti stock: lo stock occidentale, che generalmente si nutre nell'Atlantico nord-occidentale e si riproduce nel Golfo del Messico durante la primavera, e lo stock orientale, che utilizza come zone di nutrimento le aree nei pressi del Portogallo, Marocco e del Golfo di Biscaglia e il Mediterraneo come area di *spawning* durante il periodo estivo (Muhling et al., 2013) (Figura 7).

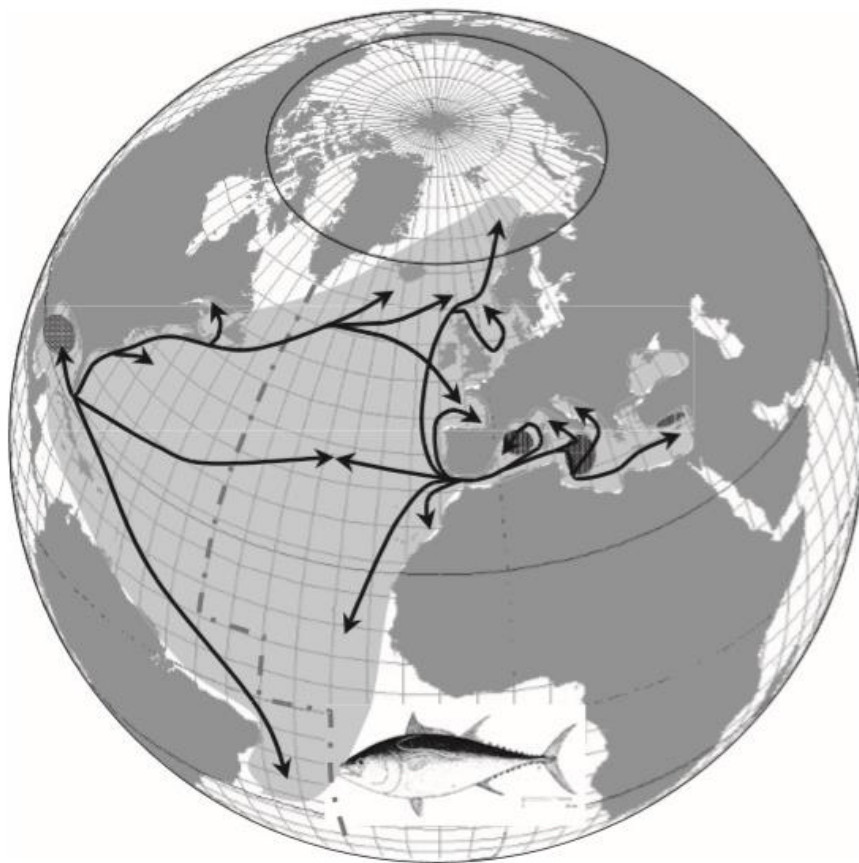


Figura 7: Movimenti migratori del tonno rosso. (Fromentin and Powers, 2005)

Infatti il tonno rosso mostra un comportamento di *homing*, migrando in aree specifiche e ben definite per la riproduzione. L'arrivo e la persistenza nelle suddette aree varia considerevolmente: sembra infatti che non tutti i pesci migrino ogni anno e che la quantità dei banchi migratori, composti da una vasta gamma di individui di dimensioni ed età diverse, sembri fluttuare in relazione alle condizioni ambientali (Ravier, 2004).

Con il procedere della stagione riproduttiva, la temperatura nelle aree di *spawning* può raggiungere valori superiori ai 28 C°. Sebbene sia ben adattato alle acque fredde, il tonno rosso non è molto idoneo per le temperature troppo elevate. Quando le temperature si avvicinano ai 30 C°, la sua funzione cardiaca può essere inibita e per sopravvivere richiede grandi quantità di ossigeno (Blank et al., 2004). Tuttavia, nonostante queste limitazioni, gli individui adulti percorrono grandi distanze per raggiungere le aree di riproduzione, suggerendo che le condizioni ambientali di queste ultime siano particolarmente benefiche per la sopravvivenza larvale. Le larve di *T. thynnus* tendono infatti a localizzarsi in zone oceanografiche particolari: vicino ai fronti di salinità, come nelle acque attorno alle Isole Baleari nel Mediterraneo occidentale, o in aree caratterizzate dalla confluenza delle acque atlantiche superficiali e dalle acque mediterranee più salate, ad esempio intorno alla Sicilia e ad altre isole minori del Mediterraneo centrale (Muhling et al., 2013).

1.3 Riproduzione del tonno rosso

1.3.1 Stadi di sviluppo della gonade

La maturità sessuale del tonno rosso varia in relazione allo stock: nell'Atlantico orientale e in Mediterraneo viene raggiunta approssimativamente a 4 anni, mentre nell'Atlantico occidentale intorno agli 8 anni (Fromentin and Powers, 2005). Questa differenziazione influisce chiaramente anche sulla taglia di maturità sessuale, che risulta maggiore per lo stock occidentale (circa 200 cm, con un peso di 150 kg) rispetto allo stock orientale (circa 110-120 cm, e un peso di 30-35 kg) (Fromentin & Powers, 2005; Mather et al., 1995).

Thunnus thynnus è una specie a sessi separati, che non presenta dimorfismo sessuale nelle sue caratteristiche morfologiche esterne, ovipara e iteropara, come tutte le specie di tonno (Schaefer, 2001). Ha un ovario con uno sviluppo asincrono, ed è considerato uno *spawner* multiplo, che rilascia i suoi gameti in colonna d'acqua, dove avviene la fecondazione delle uova.

Come nella maggior parte dei pesci, la quantità delle uova prodotte risulta dipendente all'età e quindi alla dimensione corporea: una femmina di 5 anni produce in media 5 milioni di uova (di dimensione di circa 1 mm), mentre all'età di 15-20 anni ne può produrre più di 45 milioni (Rodríguez-Roda, 1967).

La riproduzione avviene una volta l'anno (a maggio per lo stock occidentale e a giugno per lo stock orientale) in acque calde ($>24\text{ C}^\circ$) e in specifiche aree ristrette (presso le isole Baleari, in Sicilia e nel Golfo del Messico).

Come dimostrato da Medina et al., (2002), una volta che i tonni migranti superano lo stretto di Gibilterra, avviene un rapido sviluppo delle gonadi, probabilmente dovuto alla crescente temperatura delle acque. La fecondazione avviene direttamente in colonna d'acqua, mentre la schiusa delle uova, senza cure parentali, si realizza dopo un periodo di incubazione di circa due giorni. Le larve, della dimensione di 3-4 millimetri, sono tipicamente pelagiche, presentano un sacco vitellino e una forma del corpo relativamente poco sviluppata. Il sacco vitellino viene assorbito in pochi giorni, dopodiché le larve devono nutrirsi per conto proprio (Fromentin and Powers, 2005).

L'ovario del tonno rosso presenta 4 stadi riproduttivi (Tabella 1), basati sul gruppo più avanzato di follicoli ovarici e sull'estensione dell'atresia:

Gli ovari in *resting* (R) contengono solamente ovociti immaturi o precoci, e nessun segno di atresia. Le femmine *active nonspawning* (ANS) mostrano grandi ovociti maturi e assente o ridotta ($<50\%$) atresia. La condizione di *active spawning* (AS) è caratterizzata da segni di un rilascio imminente (ovociti idratati) o recente (evidenza di follicoli post ovulazione). In fine, le femmine *inactive mature* (IM), che sono entrate in regressione dopo la fine dell'attività

riproduttiva, mostrano ovari con ovociti previtelloginici o precoci con segni di atresia, o ovociti maturi e un'atresia maggiore del 50% (Figura 8) (Carnevali et al., 2019; Medina et al., 2016).

STADIO	CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE
Resting (R)	Ovociti immaturi o precoci, nessuna atresia
Active nonspawning (ANS)	Ovociti maturi e ridotta (<50%) o assente atresia
Active spawning (AS)	Ovociti maturi e ridotta o assente atresia, presenza di POF
Inactive mature (IM)	Ovociti previtelloginici o immaturi con atresia, o ovociti maturi con atresia maggiore del 50%

Tabella 1: Classificazione degli stati riproduttivi delle femmine di Thunnus thynnus.

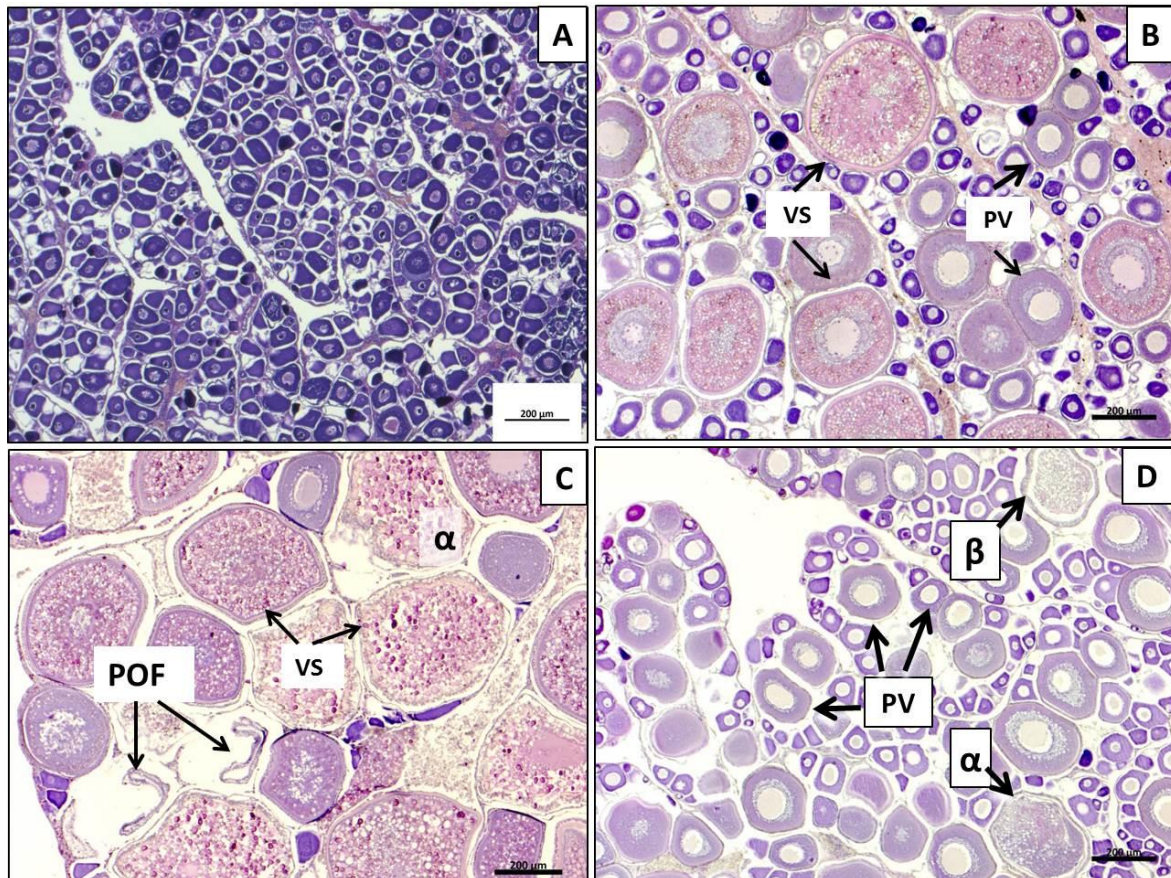


Figura 8: Micrografie dei 4 stati di sviluppo di ovario di *Thunnus thynnus*: (A) inactive mature (IM); (B) active nonspawning (ANS); (C) active spawning (AS); (D) resting (R). VS=late-vitellogenic oocytes; PV=pre-vitellogenic oocytes; POF=post-ovulatory follicle; α = α -atretic follicle; β = β -atretic follicle. (Carnevali et al., 2019)

Gli individui maschili di *T. thynnus* presentano testicoli che si differenziano in 3 stadi riproduttivi differenti (Tabella 2) (Figura 9):

Lo stadio *early spermatogenesis* (ES) è caratterizzato da testicoli aventi cisti con spermatogoni e la presenza sporadica di spermatociti, spermatidi e spermatozoi (Corriero et al., 2007; Cruz-Castán et al., 2019). Nei testicoli in *late spermatogenesis* (LS), l'epitelio germinale consiste principalmente di cisti

composte da spermatidi e spermatozoi, sebbene siano presenti anche spermatociti; è presente sperma nel lume dei lobuli seminiferi e dei dotti centrali. I testicoli dei maschi in *spent* (S), stadio presente dopo la riproduzione, mancano di cisti germinali, e il lume dei lobuli seminiferi appare completamente vuoto o mostra residui di sperma (Carnevali et al., 2019; Medina et al., 2016).

STADIO	CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE
Early spermatogenesis (ES)	Principalmente cisti con spermatogoni, presenza minima di spermatociti, spermatidi e spermatozoi
Late spermatogenesis (LS)	Epitelio germinale dei lobi testicolari contenenti cisti di cellule germinali maschili in via di sviluppo in cui predominano gli spermatidi; spermatozoi nel lume dei lobuli seminiferi e dei dotti centrali
Spent (S)	Epitelio germinale privo di cisti germinali e costituito principalmente da spermatogoni; lume dei lobuli seminiferi vuoti

Tabella 2: Classificazione degli stati riproduttivi dei maschi di Thunnus thynnus.

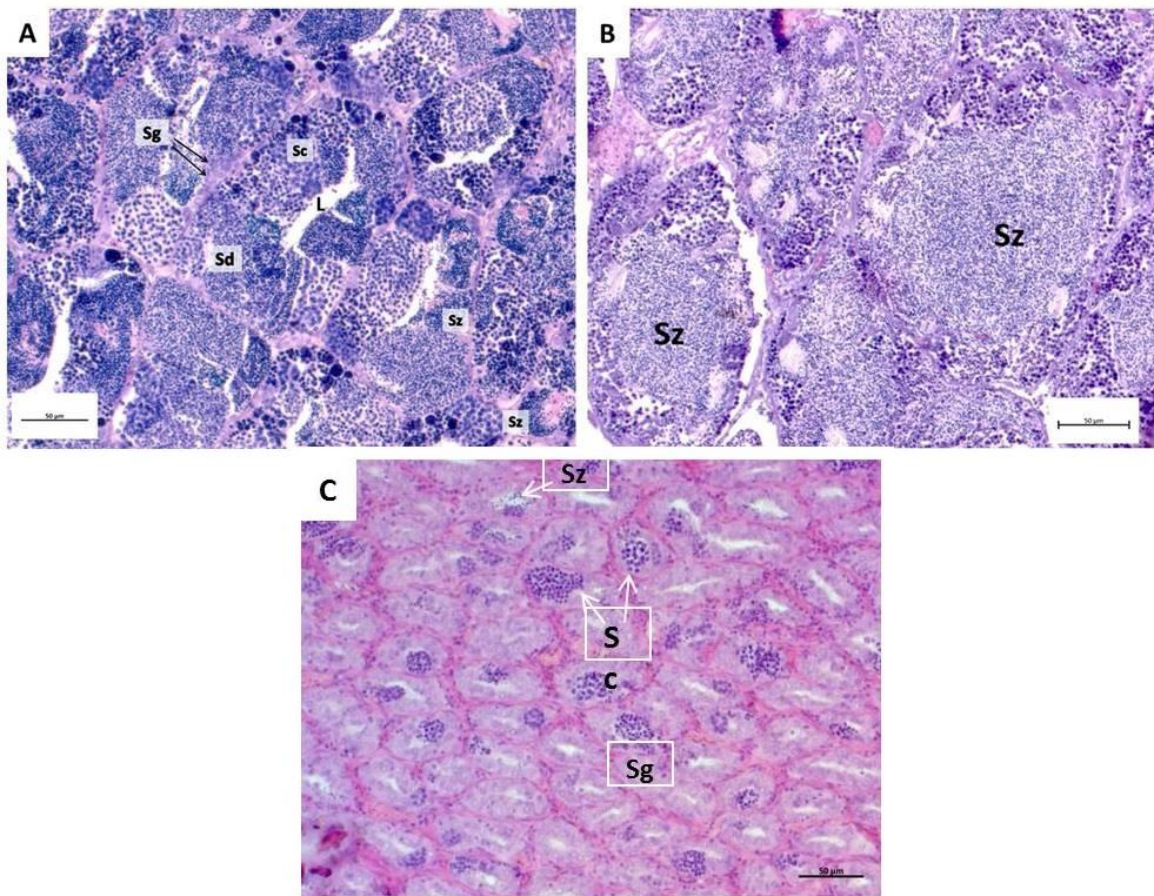


Figura 9: Micrografie dei stati di sviluppo di testicoli di *Thunnus thynnus*: **(A)** early spermatogenesis (ES) **(B)** late spermatogenesis (LS); **(C)** spent (S). Sg=spermatogonia; Sc=spermatocytes; Sd=spermatids; Sz=spermatozoa. (Carnevali et al., 2019)

1.3.2 Controllo ormonale della riproduzione

Come in tutti vertebrati, la riproduzione del tonno rosso è regolata a livello ormonale da più componenti che definiscono nel complesso l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade (Figura 10).

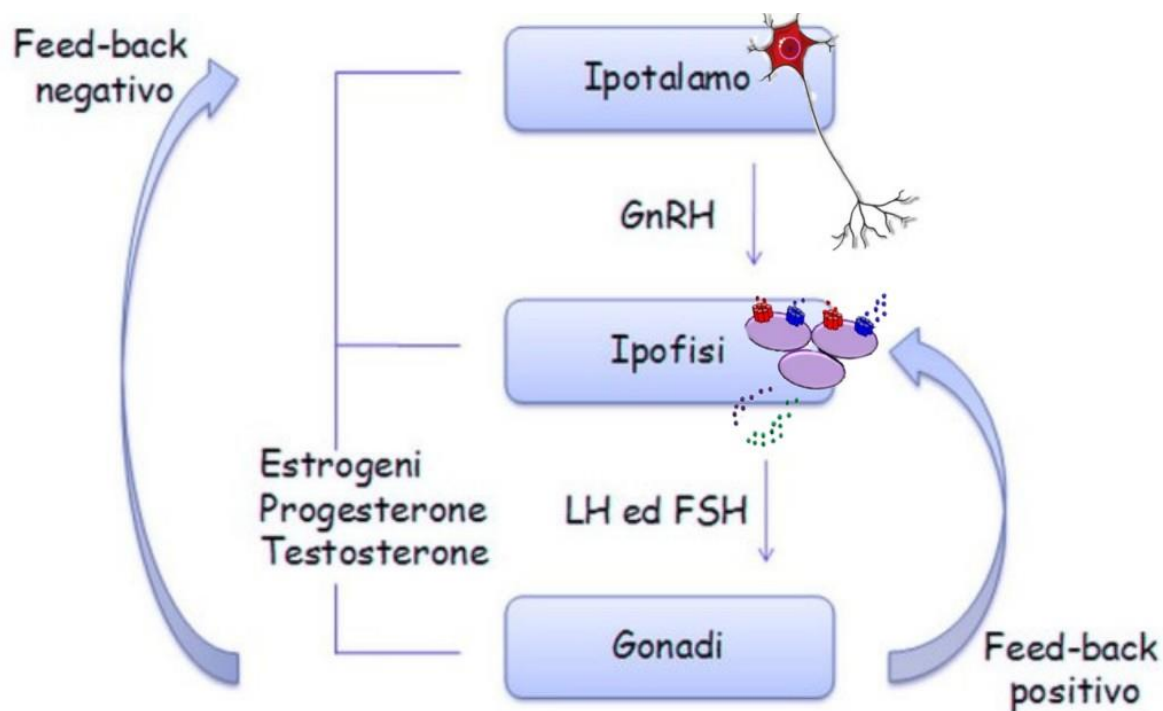


Figura 10: Asse ipotalamo-ipofisi-gonadi.

L'ipotalamo è responsabile della produzione del GnRH, ormone di rilascio delle gonadotropine. Tale ormone peptidico mantiene livelli di espressione bassi fino al raggiungimento della pubertà, quando aumenta in maniera spiccata la sua concentrazione e tramite trasmissione nervosa diretta raggiunge l'ipofisi. Le cellule gonadotrope della ghiandola pineale, essendo dotate di recettori per il GnRH, rispondono allo stimolo tramite la produzione di due ormoni: l'ormone follicolo stimolante FSH e l'ormone luteinizzante LH, direttamente coinvolti nella regolazione della gametogenesi (Weltzien et al., 2004).

Nel tonno rosso, la concentrazione dell'ormone LH aumenta in concomitanza con il progredire dell'età, esibendo valori che possono essere fino a tre volte superiori negli individui adulti femminili rispetto a quelli maschili (Berkovich et al., 2011). In esemplari di tonno rosso non ancora maturi sessualmente, la concentrazione dell'ormone FSH risulta sempre maggiore rispetto all'ormone luteinizzante, indicando il ruolo che tale ormone assume nella preparazione delle gonadi per la gametogenesi (Carnevali et al., 2019; Berkovich et al., 2013). In generale, FSH svolge un ruolo di stimolazione durante l'inizio della pubertà e nelle prime fasi dello sviluppo riproduttivo, mentre l'ormone LH ha un ruolo predominante nelle fasi avanzate di maturazione e nel periodo di *spawning*.

Le gonadotropine vengono rilasciate dall'ipofisi e, attraverso il circolo sanguigno, raggiungono la gonade, dove incontrano specifici recettori e inducono la gametogenesi, favorendo la sintesi degli ormoni steroidei; principalmente estradiolo e 11- ketotestosterone (Carnevali et al., 2019).

Gli ormoni steroidei vengono sintetizzati nelle gonadi a partire dal colesterolo in un processo definito steroidogenesi (Figura 11). Vi sono diverse fonti da cui deriva il colesterolo; una di queste è il fegato, dove avviene la sua biosintesi *de novo* a partire dall'acetil Co-A (Charni-Natan et al., 2019).

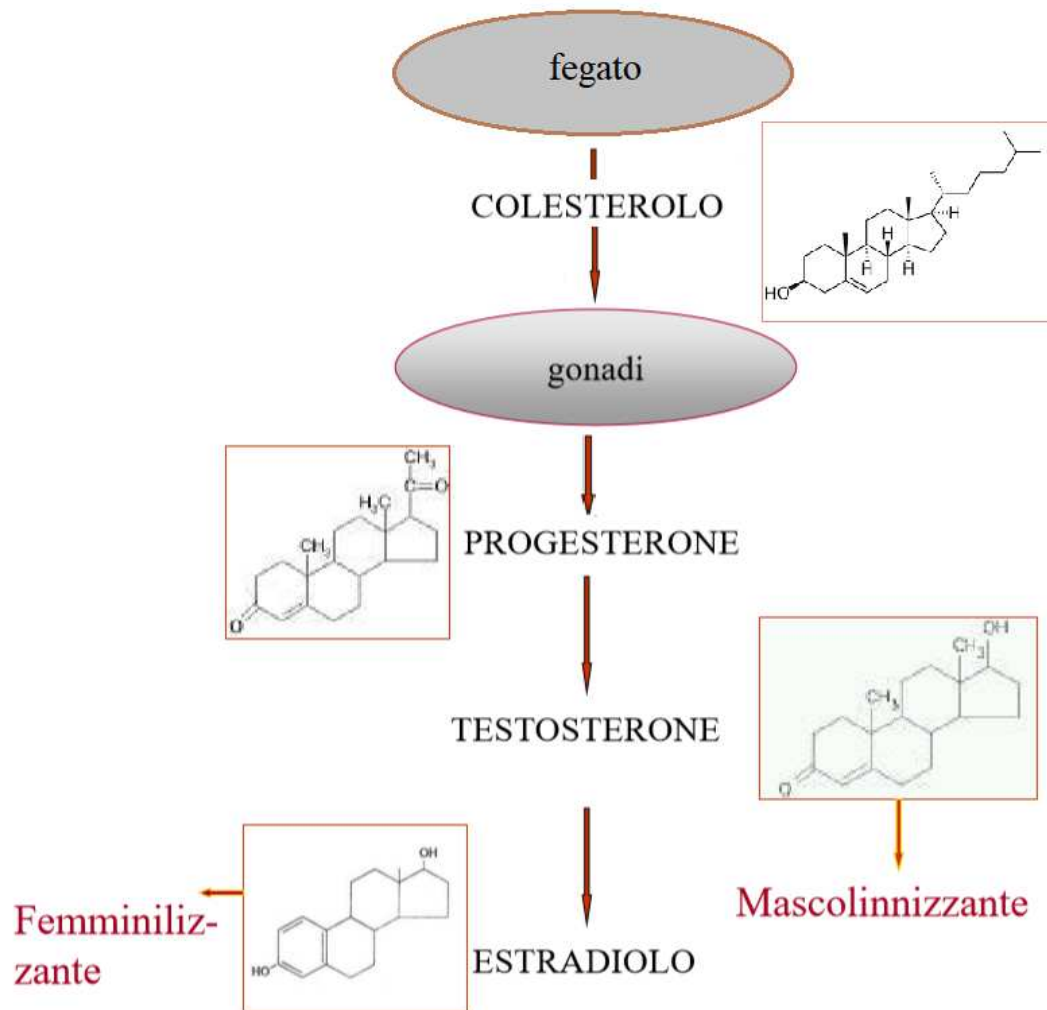


Figura 11: Sintesi degli ormoni steroidei a partire dal colesterolo.

Negli individui di sesso femminile, l'estradiolo stimola la trascrizione del gene per la sintesi della vitellogenina nel fegato e la mobilitazione di acidi grassi neutri che da fegato raggiungono la gonade per essere internalizzati dagli ovociti pre-vitellogenicici (Figura 12).

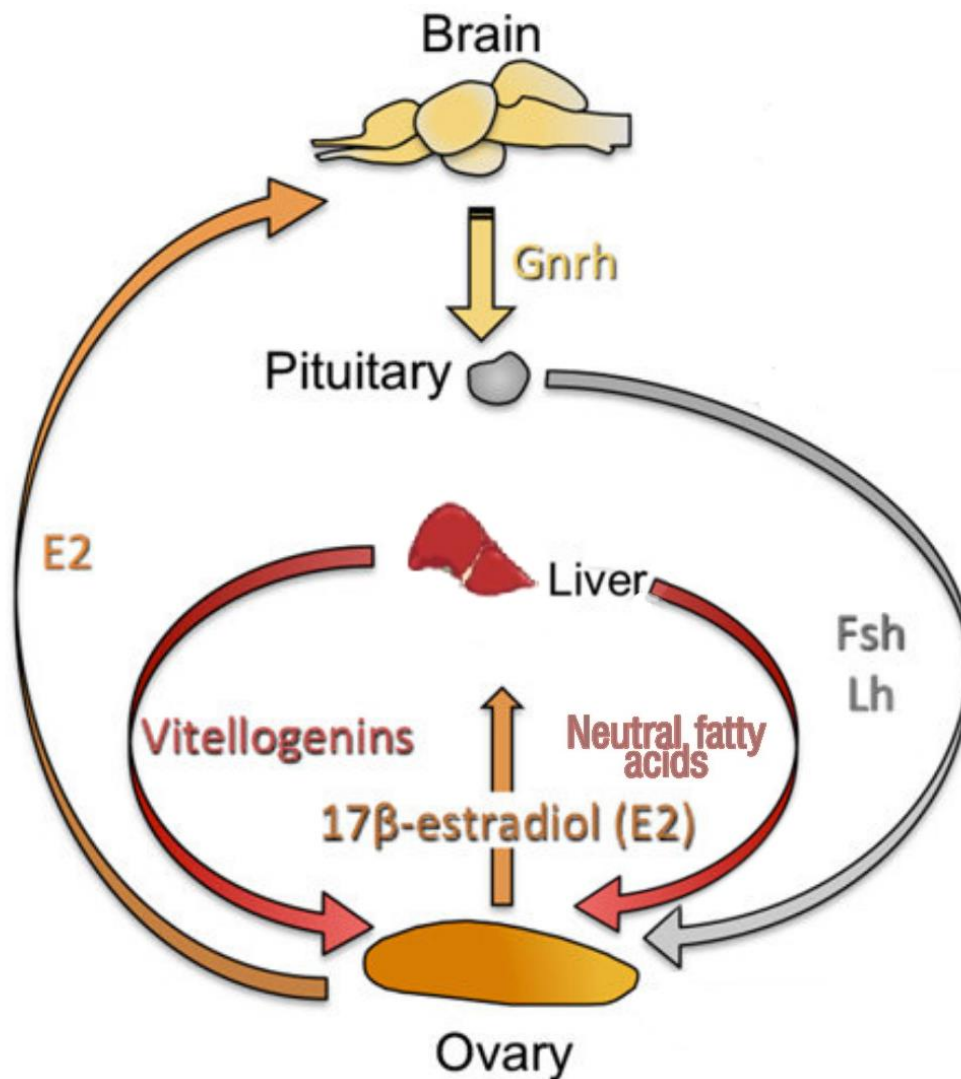


Figura 12: Origine e destino della vitellogenina. (Immagine elaborata dall'autore)

Questa proteina, una volta sintetizzata, viene trasportata tramite flusso sanguigno nello strato follicolare dell'ovario, dove specifici recettori permettono la sua endocitosi negli ovociti, nei quali può essere utilizzata come

precursore delle proteine del tuorlo (Sullivan and Yilmaz, 2018). La concentrazione plasmatica di vitellogenina è direttamente correlata all'estradiolo e al suo precursore (il testosterone), entrambi i quali aumentano rapidamente durante la vitellogenesi e diminuiscono dopo lo *spawning*.

Negli individui maschili, invece, non si assiste alla produzione di vitellogenina nel fegato, ma da quest'ultimo vengono comunque convogliati nei testicoli altri composti lipidici, come gli acidi grassi neutri e il colesterolo, soprattutto durante il periodo riproduttivo.

1.4 Metabolismo lipidico

La variazione stagionale dei livelli lipidici nel fegato e negli altri siti di stoccaggio lipidico è profondamente correlata al ciclo riproduttivo, infatti i pesci marini generalmente accumulano grandi depositi lipidici durante la maturazione sessuale, e antecedentemente lo sviluppo delle gonadi. Le riserve lipidiche vengono sfruttate successivamente come energia metabolica durante la migrazione riproduttiva (Mourente et al., 2001).

Avendo un elevato tasso metabolico, il tonno rosso necessita di ingenti quantità di energia, che utilizza anche per la ventilazione delle branchie e per mantenere la posizione in colonna d'acqua, essendo sprovvisto di vescica natatoria. In

generale, l'accumulo dei lipidi nei teleostei è suddiviso tra grasso mesenterico, fegato e muscoli.

Nel tonno rosso, i principali siti di stoccaggio lipidico corrispondono a un grande deposito di grasso mesenterico perigonadico insieme a grasso accumulato nei muscoli. Il fegato in questa specie non ha un ruolo predominante come sito di riserva lipidica, ma coincide con il punto focale per l'elaborazione dei lipidi, pertanto svolge un ruolo fondamentale nel processare gli acidi grassi, che derivano da altri depositi di grasso, prima del loro trasferimento nell'ovario (Mourente et al., 2001). Generalmente, il grasso mesenterico è il deposito lipidico primario ed è adatto per la conservazione a lungo termini dei lipidi, mentre il loro stoccaggio nel fegato e nei muscoli è secondario (Sheridan, 1994).

1.4.1 Regolazione

Vi sono una moltitudine di geni a livello epatico coinvolti nella regolazione del trasporto, della sintesi, dell'accumulo e dell'utilizzo degli acidi grassi (Figura 13).

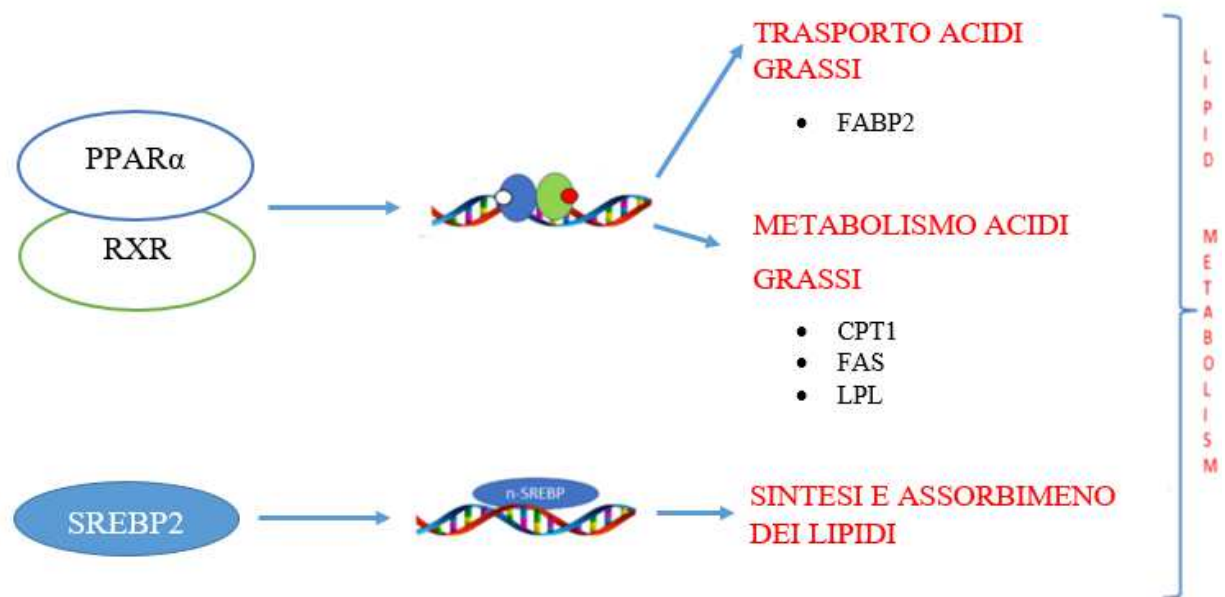


Figura 13: Trasduzione del segnale degli elementi coinvolti nel metabolismo lipidico. (Immagine elaborata dall'autore).

Il *peroxisome proliferator-activated receptor* α (PPAR α), è un recettore nucleare che forma eterodimeri con i *retinoid X receptor* (RXR). I dimeri formatosi si legano agli elementi regolatori del DNA sensibili ai PPAR (PPARE), i quali controllano l'espressione dei geni coinvolti nell'adipogenesi, nel metabolismo dei lipidi, del glucosio e del colesterolo (Maradonna and Carnevali, 2018). Tra questi ultimi spiccano in particolare i geni adibiti alla sintesi delle *fatty-acid-binding proteins* (FABP), che permettono il trasporto intracellulare dei composti lipofilici, e il gene designato alla sintesi della lipoproteina lipasi (LPL), in grado di idrolizzare i trigliceridi in acidi grassi liberi (Maradonna & Carnevali, 2018; Saera-Vila et al., 2005). Anche la sintesi

della carnitina palmitoiltrasferasi 1 (CPT1), enzima mitocondriale responsabile della formazione di acil-carnitina, è regolata da PPAR α , tramite PPARE (Dressel et al., 2003). Analogamente a PPAR α , vi sono altri fattori di trascrizione di essenziale importanza che regolano il metabolismo lipidico (Figura 14); tra questi i fattori colesterolo-sensibili (SREBP), responsabili dell'espressione di geni fondamentali per la sintesi e l'assorbimento dei lipidi (Maradonna and Carnevali, 2018).

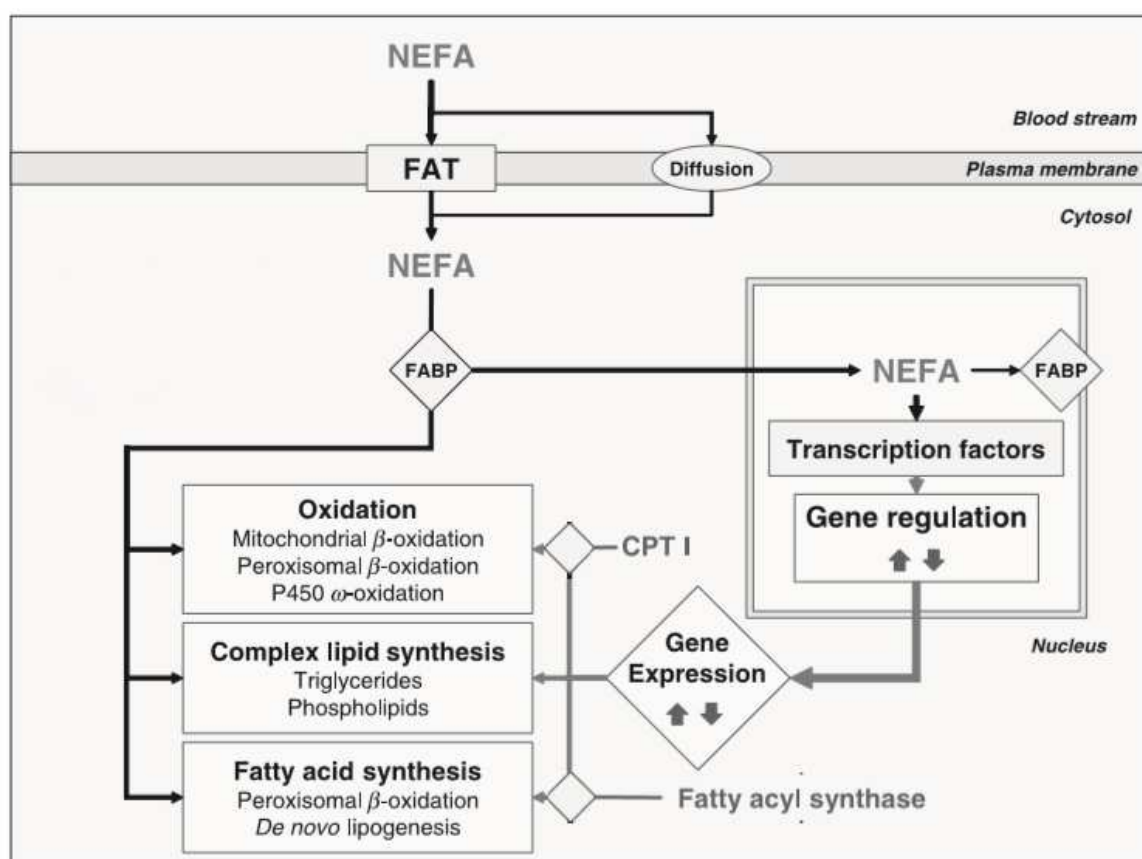


Figura 14: Regolazione metabolismo lipidico nel fegato. (Nguyen et al., 2008)

Una volta che gli acidi grassi sono stati trasportati nei mitocondri, vengono attivati un insieme di geni coinvolti in diversi aspetti del metabolismo lipidico, come ad esempio la loro ossidazione. L'acido grasso sintasi (FAS) catalizza la via principale della lipogenesi, formando una lunga catena satura di atomi di carbonio, che può essere in fine immagazzinata nei tessuti adiposi (Maradonna and Carnevali, 2018).

Ricapitolando, possiamo suddividere gli elementi coinvolti nel metabolismo lipidico in due categorie: fattori di trascrizione e geni per il metabolismo degli acidi grassi.

Fattori di trascrizione:

- PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor*), è un recettore nucleare che lega acidi grassi poli e mono insaturi, eicosanoidi (soprattutto prostaglandina) e ormoni lipofilici. La sua attivazione porta a livello epatico a una serie di fenomeni, come l'aumento della sintesi della lipoproteina lipasi (LPL, enzima che idrolizza i trigliceridi provenienti dalle lipoproteine), l'aumento della β -ossidazione degli acidi grassi e della sintesi dei trasportatori di membrana di questi ultimi.
- SREBP2 (*sterol regulatory element-binding protein 2*), è un fattore di trascrizione che controlla l'omeostasi degli steroli nella cellula, in particolare quelli coinvolti nella sintesi del colesterolo, degli acidi grassi

e del loro assorbimento. La sua espressione infatti è regolata dai livelli di steroli nella cellula, i quali ne provocano l'attivazione quando raggiungono bassi valori. Ha come funzione principale l'attivazione della sintesi del colesterolo, quando quest'ultimo raggiunge livelli minimi.

Geni per il metabolismo degli acidi grassi:

- FABP2 (*fatty-acid-binding protein 2*), è una proteina adibita al trasporto degli acidi grassi a catena lunga attraverso la membrana cellulare e all'interno della cellula. A differenza di FABP1 è meno espressa a livello epatico e maggiormente espressa nell'intestino.
- CPT1 (carnitina palmitoiltrasferasi 1), è un enzima associato alla membrana esterna mitocondriale che permette la sintesi di acil-carnitina e quindi del suo susseguente trasporto dal citosol nello spazio intermembrana mitocondriale. La presenza di acidi grassi causa l'attivazione del gene per questa proteina tramite il fattore PPAR α , mentre la sua inibizione è causata da malonil-CoA.
- LPL (lipoproteina lipasi), è un enzima idrosolubile in grado di idrolizzare i trigliceridi in acidi grassi liberi e glicerolo, permettendo di conseguenza il loro assorbimento. È presente sulla parte extracitosolica delle cellule, in particolare sull'endotelio capillare.

- FAS (acido grasso sintasi), è un enzima appartenente alla classe delle transferasi, responsabile della produzione di acidi grassi *de novo*. È regolato principalmente dal fattore colesterolo-sensibile 1 (SREBP1).

Sebbene poco studiato, il metabolismo lipidico nei tonni è sicuramente importante, data la loro dieta relativamente ricca di grassi, gli alti tassi riproduttivi e la elevata capacità di immagazzinare e mobilitare grandi quantità di lipidi (Mourente et al., 2001). Di conseguenza è estremamente importante valutare come i lipidi vengono accumulati e utilizzati dai tonni in condizione di allevamento.

Scopo della tesi

Lo scopo della tesi è stato quello di ampliare le conoscenze disponibili in merito al metabolismo lipidico del tonno rosso *Thunnus thynnus* in diversi periodi riproduttivi nel Mar Mediterraneo.

In particolare focalizzando l'attenzione sul metabolismo lipidico dei tonni rossi in condizione di allevamento, i quali spesso sono sottoposti a un trattamento di ingrasso della durata di diversi mesi fino al raggiungimento del peso desiderato, quando in fine vengono sacrificati. Tuttavia, una volta che è stata superata la quota di pesca stabilita, alcuni esemplari non sono destinati alla mattanza, e di conseguenza vengono rilasciati in seguito al periodo di ingrasso.

Il presente studio ha cercato di far chiarezza sulle condizioni che tali tonni presentano una volta rilasciati in mare aperto, tramite dei confronti con organismi nello stesso periodo riproduttivo, ma che vivono in condizioni naturali, e organismi in un periodo riproduttivo diverso, al fine di evidenziare delle eventuali similarità.

Per un'indagine accurata è stato necessario attuare l'analisi istologica dei fegati, che permette di evidenziare lo stato degli epatociti e di individuare il contenuto lipidico negli stessi.

Infine, l'approccio molecolare è risultato importante per completare lo scenario sul metabolismo lipidico del tonno rosso nei diversi periodi riproduttivi; valutando l'espressione dei geni che principalmente lo regolano.

Materiali e metodi

3.1 Campionamento

Per il presente studio sono stati raccolti in totale 70 campioni di fegato in diversi siti del Mar Mediterraneo tra il 2017 e il 2019. Complessivamente sono stati catturati 28 esemplari di tonno rosso tramite tonnara fissa a Carloforte (Sardegna), mentre 20 individui sono stati pescati in Adriatico tramite il metodo del palangaro e successivamente sbarcati al porto di San Benedetto, dove sono stati campionati presso lo stabilimento “La Selva Pesca” di Pescara. I restanti 22 esemplari sono stati campionati durante le operazioni di raccolta nelle gabbie di allevamento a Malta (Fish & Fish). Tali individui allevati in cattività sono stati catturati dapprima, con la rete da circuizione, nelle zone di riproduzione nel Mar Mediterraneo, e successivamente trasferiti in una gabbia da rimorchio, al fine di essere trasportati verso le strutture di allevamento in mare aperto. Ogni esemplare è stato sottoposto ad analisi biometriche, valutando: la lunghezza lineare alla forca (SFL), la lunghezza curva alla forca (CFL) e il peso totale (TBW). I campioni di fegato sono stati prelevati sia per le analisi istologiche che molecolari. I tessuti di fegato finalizzati alle analisi istologiche, sono stati fissati con Formol, al fine di preservarne l'integrità e

conservati a una temperatura di 4 C°. Invece, i campioni di fegato finalizzati alle analisi molecolari, sono stati fissati in RNAlater® (Ambion, Austin, TX, USA) e conservati a una temperatura di 4 C°, fino al loro trasporto definitivo in laboratorio, dove sono stati conservati a una temperatura di - 20°C fino al loro utilizzo.

3.2 Disegno sperimentale

I 70 campioni di fegato sono stati suddivisi in 3 gruppi sperimentali in base al periodo riproduttivo (Figura 15), allo scopo di caratterizzarne il diverso metabolismo lipidico:

- **Reproductive period (RP)**, caratterizzato da esemplari di ambo i sessi in pieno periodo riproduttivo.
- **Non-reproductive period farmed (NRF)**, con individui campionati in allevamento e che mostrano uno stadio non riproduttivo.
- **Non-reproductive period wild (NRW)**, contraddistinto da esemplari catturati in natura e in periodo non riproduttivo.

Periodo Riproduttivo	Area di campionamento	Sesso	N° individui	Stadio riproduttivo
RW	Sardegna	F	6	AS
			10	ANS
		M	4	ES
			8	LS
NRF	Malta	F	7	IM
			7	R
		M	8	S
NRW	Adriatico	F	11	R
			3	ES
		M	6	S

Figura 15: Campioni divisi in base al periodo riproduttivo.

Questi gruppi sperimentali contengono tessuti di fegato che derivano da individui di entrambi i sessi e in diversi stati riproduttivi (Figura 16).

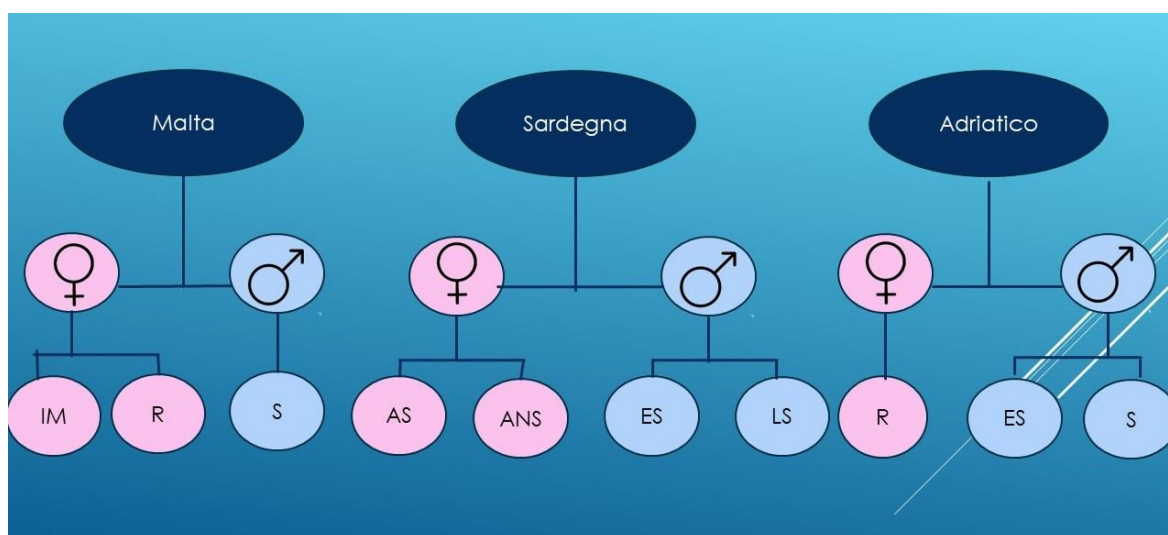


Figura 16: Gruppi sperimentali

3.3 Istologia

I campioni sono stati disidratati in soluzione alcoliche crescenti (70% etanolo → 100% etanolo) e successivamente immersi in soluzione di Xilene. Dopo il passaggio in Xilene, i campioni sono stati inclusi in paraffina. Da ogni campione incluso sono state ottenute delle sezioni di 5 µm, tramite l'utilizzo di un microtomo (Leica RM2125 RTS), e collocate poi su un vetrino. I vetrini sono stati poi colorati (colorazione con Ematossilina/Eosina di Mayer) e in fine montati. Le sezioni istologiche ottenute, sono state analizzate e fotografate tramite un microscopio ottico Zeiss Axioscop (Oberkochen Germany). Per ogni fegato, sono state scattate 5 fotografie ad ingrandimento 100x da diverse aree del tessuto.

Le immagini ottenute sono state poi analizzate tramite il programma ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), allo scopo di misurare l'area lipidica totale (TLA/ACVL %) (Forner-Piquer et al., 2017).

3.4 Analisi Molecolare

3.4.1 Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

I tessuti di fegato sono stati sottoposti a omogeneizzazione e l'RNA estratto tramite il reagente RNazol RT (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

In un secondo momento, per eliminare eventuali tracce di DNA che possono essere state rilasciate dalla lisi cellulare durante il processo di omogeneizzazione, i campioni estratti sono stati trattati con DNase (Sigma-Aldrich Co. LCC., USA).

In seguito, utilizzando una quantità di campione variabile in base alla concentrazione dell'RNA, è stato sintetizzato per ogni estratto di fegato il cDNA tramite l'utilizzo del kit LunaScript RT Supermix (New England BioLabs) e del termociclatore iQ5 iCycler (Bio-Rad).

3.4.2 Real Time PCR

Le Real Time PCR sono state realizzate mediante il metodo SYBR Green, con l'utilizzo del termociclatore CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad). Ogni campione di fegato è stato sottoposto a PCR in duplicato, utilizzando come geni housekeeping i geni della β -actina (*bact*) e dell'*elongation factor 1* (*ef1*). I geni presi in considerazione e analizzati sono elencati con i rispettivi primers nella Tabella 3

Gene	Sequenza	Orientamento	Temperatura di annealing	Fonte	
<i>β-actina</i>	5'-TATCCTGACCCTGAAGTA-3'	forward reverse	60 C°		
	5'-CATTGTAGAAGGTGTGATG-3'				
<i>ef1</i>	5'- ATGGTCGTACACCTTTGCTCC-3'	forward reverse	60 C°		
	5'-CCACGTATCCACGACGGATT-3'				
<i>srebp2</i>	5'-CAGTCTGGGAAGTGGCTGAA - 3'	forward reverse	58 C°		Betancor et al. 2018
	5' - CTCCATTACTGCTGCCTCCC- 3'				
<i>fas</i>	5'-ATACCGTGGCAATGTAACGC -3'	forward reverse	58 C°		Betancor et al. 2018
	5'- GTGAGCTGTGGATGATGCTG-3'				
<i>ppara</i>	5'-TGGTCATGGAGGTGGAAGAC -3'	forward reverse	60 C°	Betancor et al. 2018	
	5'-ATGGATGACGAAAGGAGGGG 3'				
<i>lpl</i>	5' -CCGAAAGAACCGCTGCAATA- 3'	forward reverse	57 C°	Betancor et al. 2018	
	5' -GATCCTCCTTCTCTCCGTGG - 3'				
<i>fabp2</i>	5'-CGCAGCGAGAATTATGACAA -3'	forward reverse	57 C°	Gardner et al. 2012	
	5'-AGCATGTCACCCTCCATCTC -3'				
<i>cpt1</i>	5'-TGGAGGCTGTCCACCAGTCA-3'	forward reverse	57 C°	Betancor et al. 2018	
	5'-TGCTGGAGATGTGGAAGTTG-3'				

Tabella 3: Primers utilizzati per le real-time quantitative RT-PCR, con le rispettive temperature di annealing.

3.5 Dati Statistici

Le differenze statistiche sono state determinate utilizzando One-way ANOVA, seguito dal test di confronto multiplo Tukey. Tutte le analisi statistiche sono state realizzate tramite Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e sono stati considerati significativi i valori di $p < 0,05$. Tutti i risultati vengono espressi come $\text{media} \pm s.d.$, dove per $s.d.$ si intende la deviazione standard.

Risultati

4.1 Analisi istologiche

Per la definizione dello stadio di maturità istologico e del periodo riproduttivo, è stata presa in considerazione la scala elaborata da Medina *et al.* (2016), da Carnevali *et al.* (2019) e da Corriero *et al.* (2007).

Le sezioni istologiche di fegato (Figura 17 e 18) nei vari periodi riproduttivi, sono state analizzate al fine di evidenziare la presenza di gocce lipidiche, e possibile presenza di steatosi. Le femmine pescate in mare aperto durante il periodo non riproduttivo (non reproductive wild, NRW) (Figura 17C, 17D) mostrano un'area coperta da lipidi relativamente bassa, che tende leggermente ad aumentare nelle femmine pescate in mare aperto durante il periodo riproduttivo (reproductive periodo, RP) (Figura 17A, 17B). Una differenza sostanziale può invece essere rilevata negli esemplari femminili allevati e sacrificati durante il periodo non riproduttivo (non reproductive farmed, NRF) (Figura 17E, 17F), in cui si riscontra una concentrazione elevata di gocce lipidiche e presenza di steatosi, con epatociti che arrivano ad avere in media una concentrazione di lipidi pari al 48%. Tali gocce lipidiche sono presenti

esclusivamente all'interno degli epatociti, che risultano particolarmente ingrossati e con una coformazione simile a quella degli adipociti.

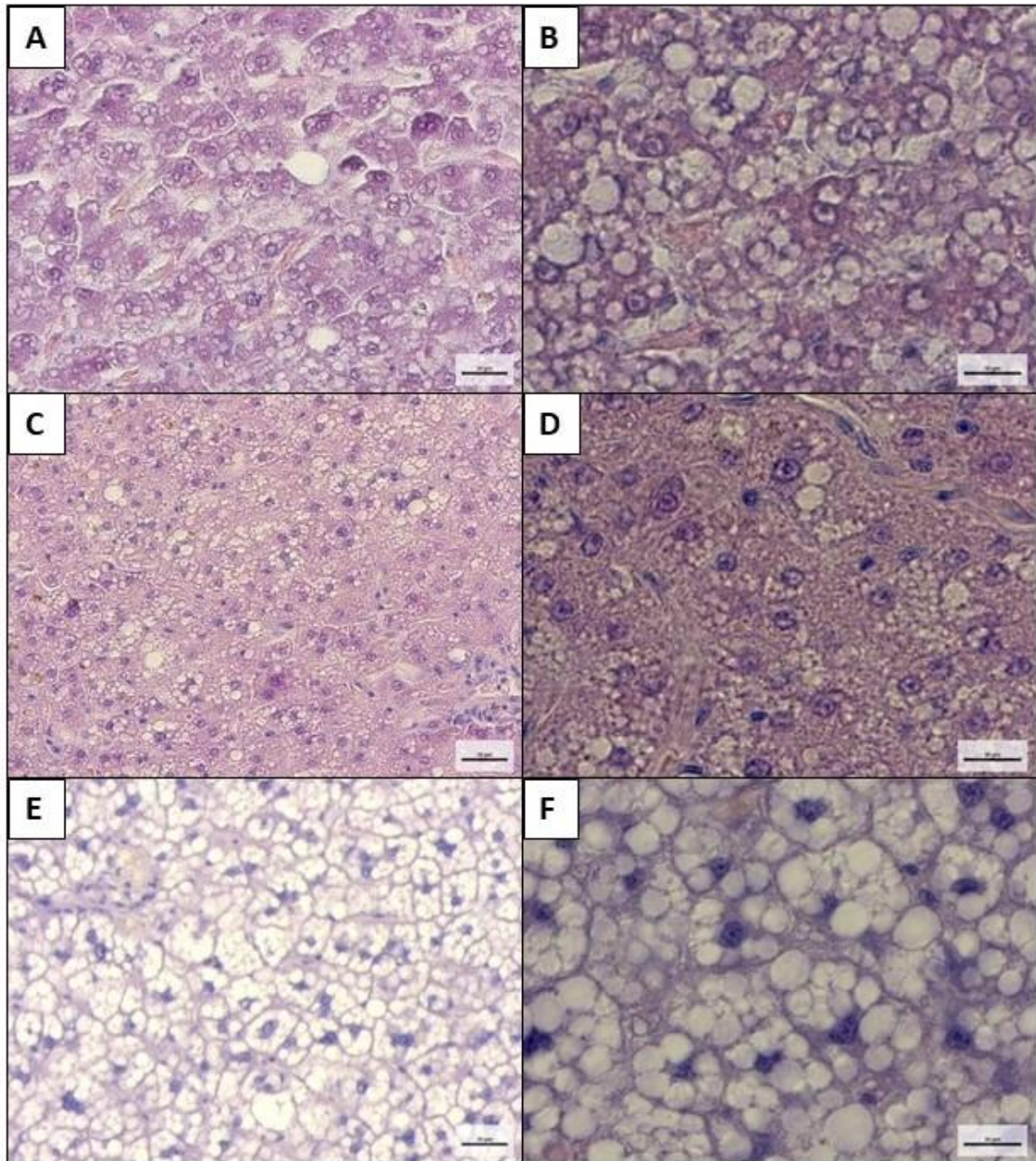


Figura 17: Sezioni di fegato di individui femminili di Thunnus thynnus nei diversi periodi riproduttivi. (A) Reproductive period (RP) (ingrandimento 40x); (B) Reproductive period (RP) (ingrandimento 100x); (C) Non-reproductive period wild (NRW) (ingrandimento 40x); (D) Non-reproductive period wild (NRW) (ingrandimento 100x) (E) Non-reproductive period farmed (NRF) (ingrandimento 40x); (F) Non-reproductive period farmed (NRF) (ingrandimento 100x)

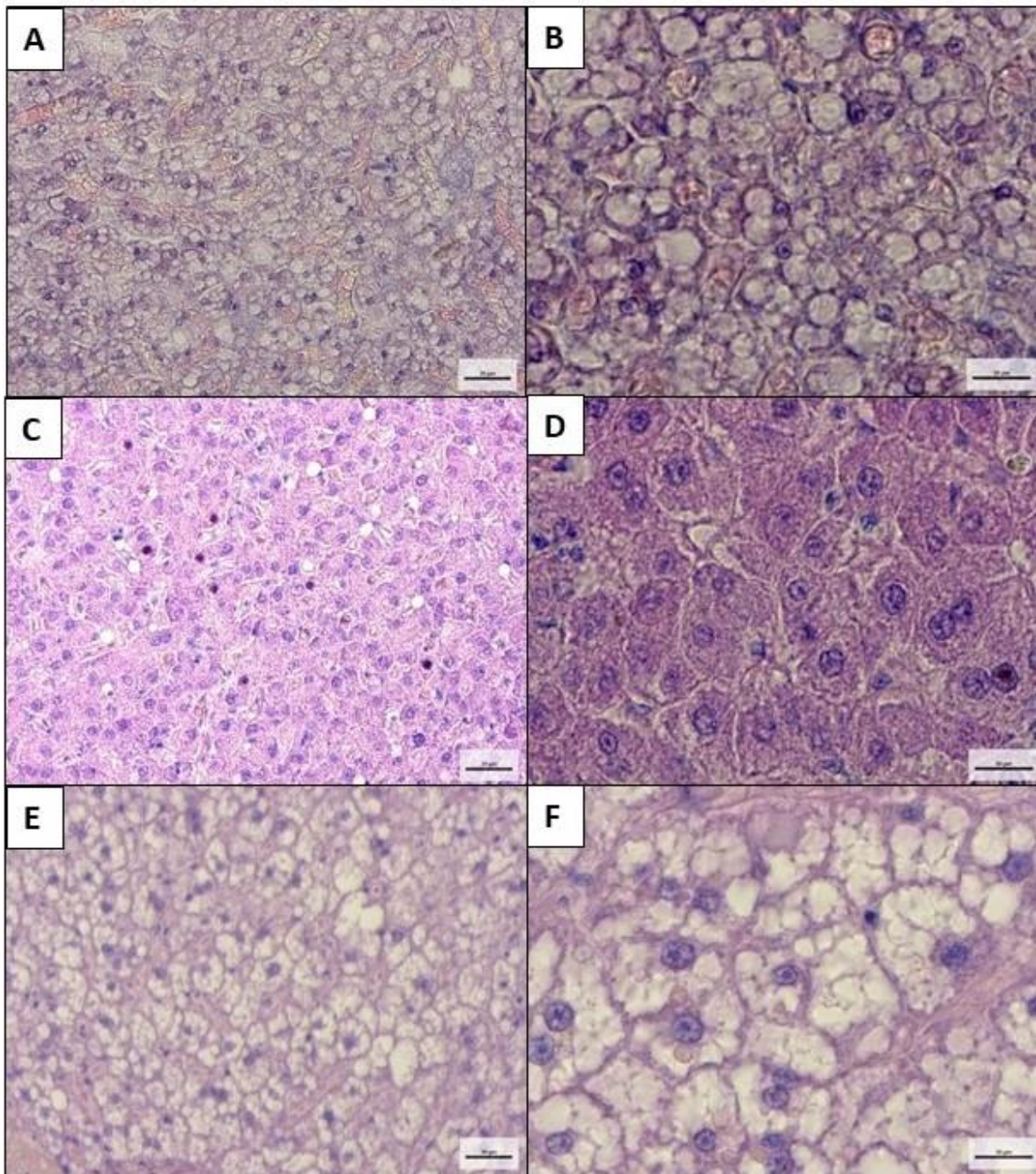


Figura 18: Sezioni di fegato di individui maschili di *Thunnus thynnus* nei diversi periodi riproduttivi. **(A)** Reproductive period (RP) (ingrandimento 40x); **(B)** Reproductive period (RP) (ingrandimento 100x); **(C)** Non-reproductive period wild (NRW) (ingrandimento 40x); **(D)** Non-reproductive period wild (NRW) (ingrandimento 100x) **(E)** Non-reproductive period farmed (NRF) (Ingrandimento 40x); **(F)** Non-reproductive period farmed (NRF) (ingrandimento 100x).

I maschi NRW (Figura 18C, 18D) mostrano una ridottissima presenza di gocce lipidiche, aumentando considerevolmente negli esemplari RP (Figura 18A, 18B). Anche gli individui maschili NRF (Figura 18E, 18F), come nel caso delle femmine NRF, presentano una condizione di steatosi, con un'elevata quantità di gocce lipidiche all'interno degli epatociti, che risultano di conseguenza particolarmente ingrossati e simili ad adipociti.

Da una analisi statistica delle differenze nel contenuto lipidico epatico (Figura 19) è risultato che gli individui femminili NRF mostrano un contenuto lipidico significativamente più elevato ($p < 0,05$) rispetto gli altri due gruppi sperimentali (RP e NRW), mentre tra questi ultimi non vi è una differenza significativa ($p < 0,05$).

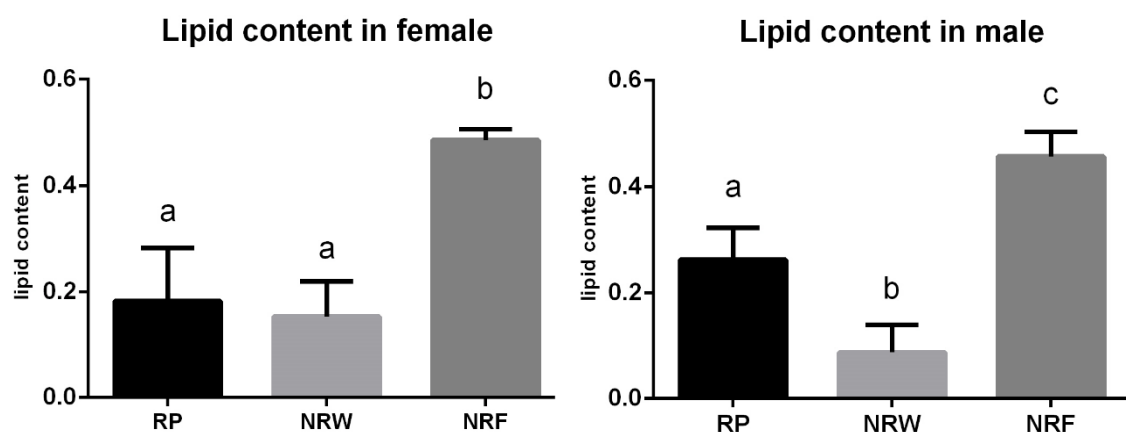


Figura 19: Contenuto lipidico negli esemplari femminili e maschili di *Thunnus thynnus*.

Al contrario, nei maschi si osserva una differenza significativa ($p < 0,05$) tra tutti i gruppi sperimentali, con gli esemplari NRF che mostrano un contenuto lipidico significativamente più alto ($p < 0,05$) rispetto agli altri individui (RP e NRW).

4.2 Analisi Molecolare

Per ciascun campione di fegato è stata analizzata l'espressione dei geni coinvolti nella regolazione del metabolismo lipidico. Nelle femmine (Figura 20), l'espressione del gene *ppara* (Figura 20A) risulta significativamente più alta ($p < 0,05$) nei gruppi sperimentali RP e NRF rispetto agli esemplari NRW. L'espressione del gene *fabp2* (Figura 20B) risulta significativamente elevata ($p < 0,05$) negli individui RP rispetto ai gruppi sperimentali NRW e NRF, i quali evidenziano bassi valori, non significativi tra loro ($p < 0,05$).

I geni *cpt1* (Figura 20C) e *lpl* (Figura 20D) hanno lo stesso andamento, mostrando valori significativamente più elevati ($p < 0,05$) negli individui NRW, in relazione agli altri due gruppi sperimentali RP e NRF, nei quali l'espressione di tali geni risulta bassa e non significativa ($p < 0,05$) tra loro.

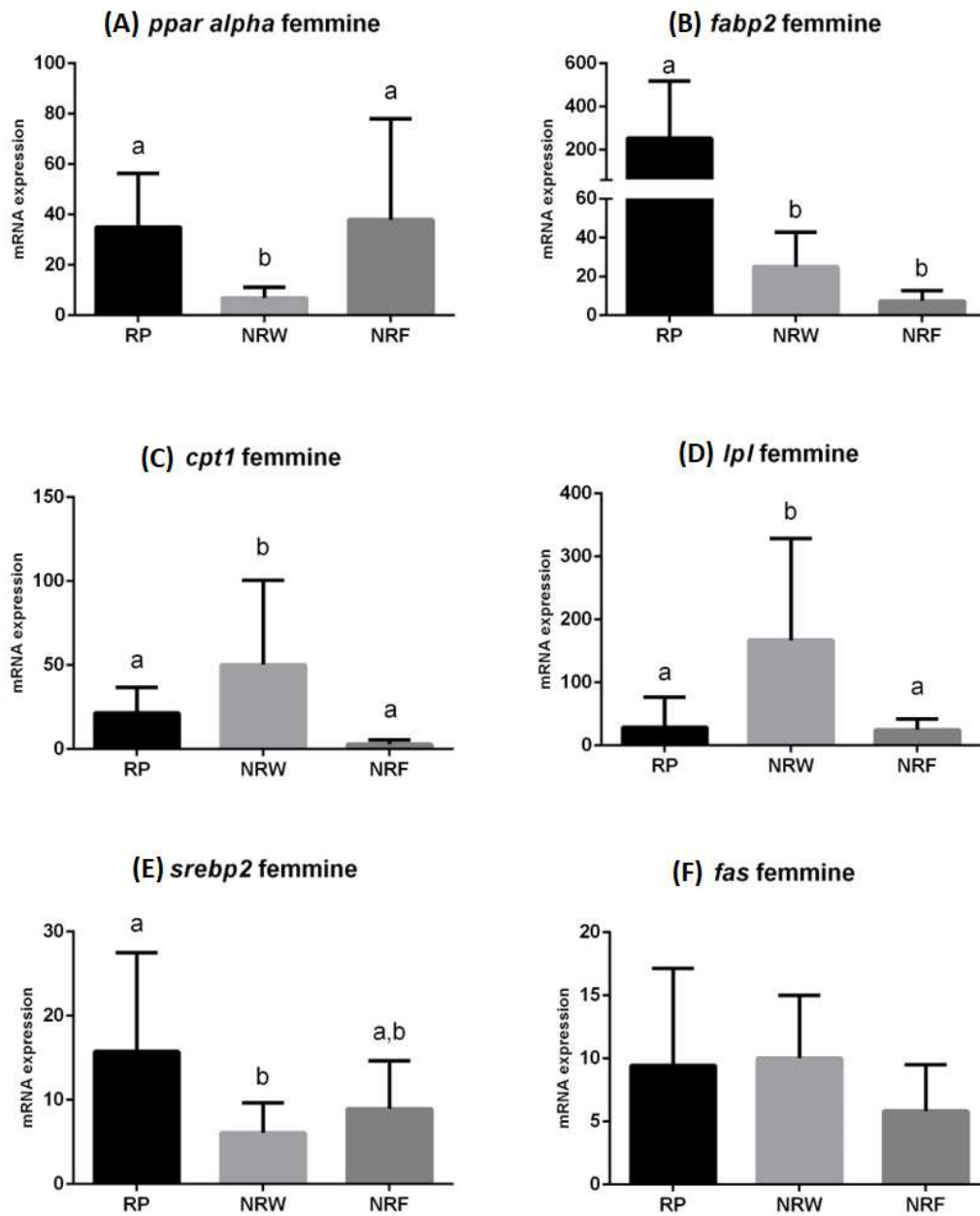


Figura 20: Livelli di espressione genica di *pparα* (A), *fabp2* (B), *cpt1*(C), *lpl* (D), *srebp2* (E) e *fas* (F) nel fegato di *Thunnus thynnus* in individui femminili nei diversi periodi riproduttivi. Tali valori sono espressi come media ± s.d.

Si riscontrano alti valori negli individui RP, per quanto riguarda l'espressione del gene *srebp2* (Figura 20E), significativamente maggiore ($p < 0,05$) rispetto al gruppo sperimentale NRW. Non si evidenzia, invece, significatività ($p < 0,05$) negli esemplari NRF, in relazione agli altri due gruppi sperimentali.

Tutti e tre i gruppi sperimentali non mostrano una differenza significativa ($p < 0,05$) per quanto riguarda l'espressione del gene *fas* (Figura 20F).

Nei maschi (Figura 21), l'espressione del gene *ppara* (Figura 21A) risulta significativamente maggiore ($p < 0,05$) nei gruppi sperimentali RP e NRF, rispetto agli individui NRW, i quali mostrano bassi valori.

Il gene *fabp2* (Figura 21B), ha valori mediamente elevati per il gruppo sperimentale NRW, il quale risulta significativo ($p < 0,05$) in relazione agli esemplari NRF, nei quali l'espressione del gene è molto bassa. Il gruppo RP ha valori intermedi rispetto agli altri due gruppi sperimentali, nel confronto dei quali non mostra significatività ($p < 0,05$).

Per quanto riguarda il gene *cpt1* (Figura 21C), i valori di espressione raggiungono il picco negli individui NRW, risultando significativamente elevati ($p < 0,05$) in relazione ai bassi valori del gruppo sperimentale NRF. Al contrario, nel gruppo sperimentale RP, nel quale il gene è mediamente espresso, non si evidenzia significatività ($p < 0,05$) rispetto agli altri due gruppi sperimentali.

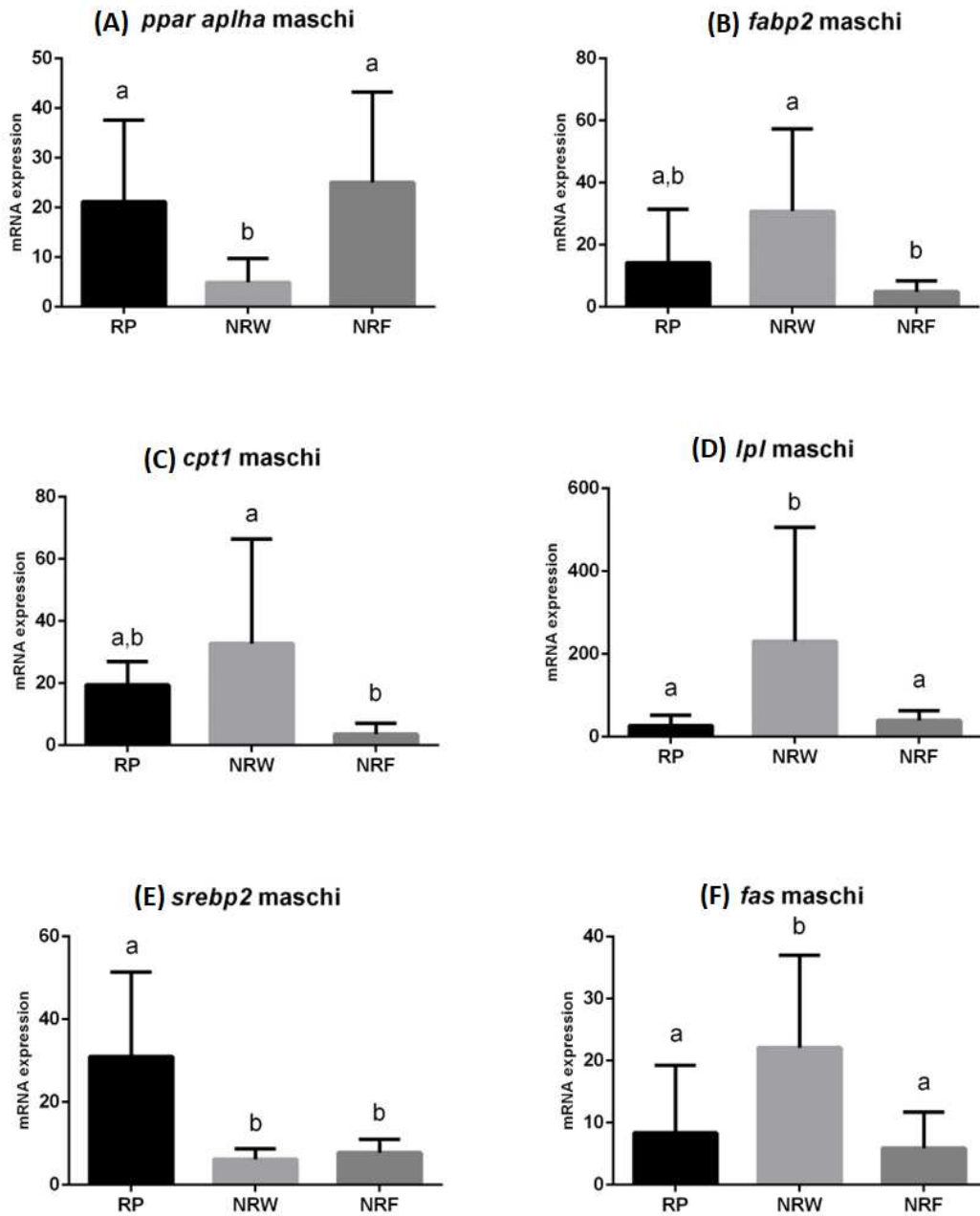


Figura 21: Livelli di espressione genica di *ppara* (A), *fabp2* (B), *cpt1*(C), *lpl* (D), *srebp2* (E) e *fas* (F) nel fegato di *Thunnus thynnus* in individui maschili nei diversi periodi riproduttivi. Tali valori sono espressi come media \pm s.d.

L'espressione di *lpl* (Figura 21D) risulta significativamente elevata ($p < 0,05$) negli esemplari NRW, in relazione ai valori mostrati dagli altri due gruppi sperimentali (RP e NRF) entrambi molto bassi e non significativi ($p < 0,05$) tra loro.

Si riscontrano valori similmente bassi, per quanto concerne l'espressione del gene *srebp2* (Figura 21E), nei gruppi sperimentali NRW e NRF, i quali risultano significativamente minori ($p < 0,05$) rispetto ai valori elevati degli individui RP.

Infine, il gene *fas* (Figura 21F), mantiene livelli minimi negli individui RP e NRF, registrando, invece, valori significativamente maggiori ($p < 0,05$) nel gruppo sperimentale NRW.

Discussione

Il tonno rosso è considerato a livello mondiale una risorsa ittica di grande valore commerciale, e il crescente interesse nei suoi confronti, ha portato nel corso degli anni alla necessità di un programma di gestione per tutelare tale specie. Ad incidere ulteriormente sulla situazione dello stock, è stato il progressivo aumento degli impianti di allevamento, per rispondere alla domanda di mercato sempre maggiore nei riguardi di questa specie.

Tuttavia, vi sono una serie di problematiche correlate agli allevamenti, in particolare il rilascio di individui, non inclusi nella quota di pesca, dopo il periodo di ingrasso. Tali individui presentano una condizione chiaramente differente dallo stato di pre-allevamento, mostrando un metabolismo lipidico deregolato. Infatti, nonostante si trovino in un periodo non riproduttivo, questi tonni manifestano delle similarità con gli esemplari in piena riproduzione, per quanto concerne il metabolismo lipidico, rispetto invece ad individui nello stesso periodo riproduttivo, ma in condizioni naturali.

Le analisi istologiche hanno fornito informazioni importanti per determinare la condizione epatica negli individui dei tre gruppi sperimentali.

Gli esemplari femminili NRF presentano una condizione istologica molto più simile agli individui RP, rispetto al gruppo NRW. Infatti, mostrano un'elevata

concentrazione di gocce lipidiche e presenza di steatosi, che non si riscontra invece negli individui NRW. Le analisi statistiche confermano i dati istologici: il tessuto epatico negli individui femminili del gruppo NRF presenta un elevato contenuto lipidico rispetto agli altri due gruppi (RP e NRW). Non si riscontra una grande differenza per quanto riguarda il contenuto lipidico tra gli individui NRW e RP, in quanto questi ultimi, essendo in pieno periodo riproduttivo, convogliano la maggior parte dei composti lipidici sintetizzati dal fegato (come ad esempio la vitellogenina e il colesterolo) verso le gonadi, mostrando quindi un contenuto lipidico non molto alto.

Come nel caso delle femmine, anche le sezioni epatiche degli individui maschili NRF mostrano una grande similarità con gli esemplari del gruppo RP, nonostante si trovino in periodi riproduttivi differenti. Entrambi i gruppi presentano una notevole quantità di gocce lipidiche, che tuttavia raggiungono la massima concentrazione negli individui del gruppo NRF, dove si assiste anche all'insorgenza di steatosi.

Per quanto concerne le analisi statistiche, al contrario di ciò che avviene negli individui femminili, i maschi mostrano un contenuto lipidico differente per ogni gruppo sperimentale: anche in questo caso, il picco più alto coincide con gli individui NRF, i quali accumulano ingenti quantità di lipidi, essendo sottoposti a un trattamento di ingrasso, mentre gli esemplari RP, essendo nel

periodo riproduttivo, mostrano un contenuto intermedio di lipidi, necessari per la sintesi di composti correlati alla riproduzione, come ad esempio il colesterolo, elemento di partenza della steroidogenesi. Gli individui NRW presentano, invece, livelli molto bassi di lipidi, dal momento che ne utilizzano la maggior parte come fonte di energia metabolica.

Molti geni sono adibiti alla regolazione del metabolismo lipidico (Betancor et al., 2018). Il gene *ppara* è altamente espresso nel fegato, dove va a regolare principalmente una serie di enzimi, responsabili sia del trasporto che del catabolismo degli acidi grassi (Nguyen et al., 2008). Tale gene mostra lo stesso andamento nei gruppi sperimentali RP e NRF, dove il contenuto lipidico è maggiore. Si assiste, infatti, alla massima espressione di *ppara* in corrispondenza di questi due gruppi, mentre gli individui NRW mostrano bassi livelli di espressione. Non si riscontra, inoltre, nessuna differenza significativa tra individui femminili e maschili, per quanto riguarda l'andamento del suddetto gene, evidenziando che il metabolismo lipidico possa non essere sesso dipendente.

In letteratura è noto che; *ppara* è responsabile dell'aumento della trascrizione e dell'espressione di proteine e enzimi necessari per il trasporto, come FABP, e l'ossidazione, come CPT1, degli acidi grassi (Nguyen et al., 2008). Tuttavia, nel seguente studio non vi è una correlazione positiva tra l'andamento dei geni

ppara e *fabp2* e tra *ppara* e *cpt1*, per quanto riguarda le femmine. Ad eccezione del gruppo sperimentale RP, nel quale si assiste all'incremento dei livelli di *fabp2*, in concomitanza con l'aumento di espressione di *ppara*, probabilmente dovuto a un incessante bisogno, di tali individui in riproduzione, di trasportare i composti lipidici prodotti e/o accumulati dal fegato verso l'ovario. Anche nei maschi, non si osserva una correlazione positiva tra gli andamenti di *ppara* e *fabp2* e tra *ppara* e *cpt1*, i quali mostrano bassi livelli di espressione (nei gruppi sperimentali RP e NRF), quando invece *ppara* è maggiormente espresso. La correlazione negativa che si osserva tra *ppara* e *cpt1*, può essere indice del fatto che nei gruppi RP e NRF, la maggior parte dei lipidi che vengono assorbiti dal fegato, non vengono utilizzati per la produzione di energia tramite β -ossidazione, ma subiscono un destino diverso. Ciò è sostenuto anche da altri dati in letteratura, nei quali questi geni mostrano un andamento simile al presente studio (Betancor et al., 2018).

Uno dei geni coinvolto nel trasporto e all'assorbimento degli acidi grassi è *fabp2*, che nel presente studio mostra la massima espressione, come accennato in precedenza, negli individui RP, per quanto riguarda le femmine, mentre nel gruppo NRW, per quanto riguarda i maschi. Infatti, negli individui maschili, tale gene detiene lo stesso andamento del gene *cpt1*, evidenziando come il trasporto degli acidi grassi sia correlato alla loro susseguente ossidazione, per

ricavare energia. Di fatto, il picco di entrambi i geni nei maschi, coincide con gli individui NRW, i quali, vivendo in condizioni naturali, hanno bisogno di più energia rispetto agli individui tenuti in allevamento, sottoposti a un regime di ingrasso. Tali risultati sono conformi a quanto riportato in letteratura da altri studi, nei quali si evidenzia una correlazione tra i livelli di espressione dei geni *fabp* e la capacità di β -ossidazione (Londrville and Sidell, 1996; Torstensen et al., 2009). Non si assiste invece a questa correlazione per quanto riguarda gli individui femminili, suggerendo che il gene *fabp* possa essere sesso-dipendente, e che quindi siano necessarie ulteriori indagini.

Nel presente studio l'espressione di *cpt1*, sia per i maschi che per le femmine, ha lo stesso andamento di *lpl*, gene che codifica per un enzima responsabile dell'idrolisi e del susseguente assorbimento degli acidi grassi (Betancor et al., 2017). Come riportato in letteratura, il picco dei livelli di espressione di *lpl*, potrebbe essere associato a un maggior utilizzo dei lipidi (Zheng et al., 2010). Ciò infatti giustificerebbe anche l'incremento dell'espressione di *cpt1* in concomitanza con l'aumento di *lpl*.

Il fattore di trascrizione *srebp2* è importante per l'omeostasi degli steroli nella cellula, ed implicato principalmente nella regolazione dei geni coinvolti nella sintesi del colesterolo (Betancor et al., 2017). Infatti, il suo massimo livello di espressione, sia nei maschi che nelle femmine, si riscontra negli individui RP,

suggerendo la sua importanza durante la riproduzione, dal momento che è implicato nella sintesi del colesterolo, composto di partenza della steroidogenesi. Tuttavia, negli individui femminili, si assiste anche ad un incremento nei valori di espressione nel gruppo NRF, evidenziando ancora una volta la similarità tra questi due gruppi sperimentali.

Il gene *fas* è coinvolto nella lipogenesi, contribuendo alla sintesi di acidi grassi *de novo* (Nguyen et al., 2008). Nelle femmine di tonno rosso tale gene è sempre espresso senza differenze significative, mentre nei maschi presenta la sua massima espressione in corrispondenza degli individui NRW, i quali hanno una necessità maggiore di produzione di acidi grassi, vivendo in condizioni naturali. Probabilmente il differente andamento che tale gene assume tra individui maschili e femminili, è indice del fatto che questo gene possa essere sesso-dipendente, e di conseguenza è necessario attuare ulteriori studi per indagare a tal proposito.

Infine, l'analisi multivariata (PCA) di tutte le variabili considerate in questo studio (contenuto lipidico, valori di espressione genica dei segnali studiati, lunghezza del pesce, stadio riproduttivo, sesso, zona e periodo di pesca) (Figura 22) ha permesso di evidenziare come gli animali considerati vengano segregati in tre cluster ben distinti tra loro. In particolare, una prima divisione è data dall'asse della PC1 (varianza del 27,9%) in animali *wild* e animali *farmed*. Una

periodo di pesca, dai valori di espressione genica di *lpl*, *cpt1* e *fas*. Il gruppo RP è caratterizzato, oltre a periodo e luogo di pesca, dall'espressione genica dei restanti segnali molecolari qui valutati. Infine, il gruppo NRF è caratterizzato, oltre che dal luogo e dal periodo di pesca, solamente dal contenuto lipidico riscontrato nel fegato di questi animali.

Questi risultati ci permettono di effettuare diverse considerazioni: innanzitutto le variabili che abbiamo considerato in questo studio spiegano solamente circa il 50% della varianza, testimoniando il fatto che sicuramente in studi futuri andranno presi in considerazione altri parametri.

Non ci sono differenze sesso specifiche tanto più che il sesso non risulta essere una variabile fondamentale per la determinazione dei tre cluster.

Il gruppo NRF risulta essere quello non descritto da espressione genica dei segnali studiati. Questo potrebbe significare che in questi animali tutti i segnali coinvolti nel metabolismo lipidico sembrerebbero essere appiattiti, probabilmente con un meccanismo a feedback negativi, dall'enorme disponibilità di cibo e del risultante enorme accumulo di grasso nel fegato. Di fatto la conformazione degli epatociti, in questi esemplari, cambia totalmente rispetto agli individui wild, risultando molto più simile a quella degli adipociti.

Questa ultima considerazione è molto importante considerando le alterazioni che questi pesci subiscono in condizioni di allevamento e che potrebbero alterare il loro comportamento una volta rilasciati.

Conclusioni

Il presente studio fornisce un quadro complessivo sul metabolismo lipidico di *Thunnus thynnus*, in particolare focalizzando l'attenzione sugli individui in allevamento, sottoposti a una dieta di ingrasso e successivamente rilasciati in mare aperto, quando non sono destinati al sacrificio.

L'approccio multidisciplinare ha permesso di acquisire informazioni sullo stato di tali individui, i quali mostrano un metabolismo lipidico deregolato.

Infatti, i dati istologici evidenziano una similarità tra questi ultimi e gli individui in riproduzione, in particolare per i maschi, nonostante essi si trovino in un periodo riproduttivo differente.

L'approccio molecolare, indagando sui geni chiave del metabolismo lipidico, ha ribadito la similarità tra tali gruppi.

Infine, l'analisi multivariata ha evidenziato come gli individui NRF non siano contraddistinti da espressione genica dei segnali presi in considerazione, confermando ulteriormente la grande alterazione del metabolismo lipidico che questi organismi subiscono.

In conclusione, il presente studio ha marcato il mutamento che i tonni rossi subiscono a livello epatico, sia sul piano istologico che sul piano molecolare, a seguito di un regime di ingrasso nelle farm, ponendo le basi per eventuali studi

futuri, focalizzando l'attenzione su come tali individui si pongono una volta tornati in condizioni naturali.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la mia relatrice, la professoressa Gioacchini, per avermi dato l'opportunità di svolgere il progetto di tesi presso il laboratorio di Biologia dello Sviluppo e della Riproduzione, nell'Università Politecnica delle Marche. La ringrazio per i suoi suggerimenti e per la sua disponibilità.

Un ringraziamento alla professoressa Carnevali, per la sua gentilezza e per i suoi consigli in merito alle esperienze lavorative, oltre l'università.

Ringrazio Michela, per avermi insegnato le tecniche di laboratorio, spingendomi sempre a migliorare e facendomi crescere professionalmente.

In fine, vorrei ringraziare tutti i ragazzi del laboratorio e dello stabulario, che mi hanno accompagnato in questo percorso.

Bibliografía

- Api, M., Bonfanti, E., Lombardo, F., Pignalosa, P., Hardiman, G., Carnevali, O., 2018. Effects of age on growth in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Gen. Comp. Endocrinol. 265, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.01.010>.
- Berkovich, N., Corriero, A., Santamaria, N., Mylonas, C., Bridges, C., Vassallo Agius, R., de la Gándara, F., Belmonte, A., Mislov, K., Katavic, I., Elizur, A., Meiri-Ashkenazi, I., Gordin, H., Rosenfeld, H. (2011). The neuroendocrine control of pubertal development in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Indian J.Sci.Technol.. 4 (S8) 9th ISRPF Issue. 21-22.
- Berkovich, N., Corriero, A., Santamaria, N., Mylonas, C.C., Vassallo-Aguis, R., de la Gándara, F., Meiri-Ashkenazi, I., Zlatnikov, V., Gordin, H., Bridges, C.R., Rosenfeld, H., 2013. Intra-pituitary relationship of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during pubertal development in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Gen. Comp. Endocrinol. 194, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.08.005>.
- Betancor, M.B., Ortega, A., de la Gándara, F., Tocher, D.R., Mourente, G., 2018. Performance, feed utilization, and hepatic metabolic response of weaned juvenile Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.): effects of dietary lipid level and source. Fish Physiol. Biochem. 45, 697–718. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0587-9>.
- Betancor, M.B., Ortega, A., de la Gándara, F., Tocher, D.R., Mourente, G., 2017. Lipid metabolism-related gene expression pattern of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) larvae fed on live prey. Fish Physiol. Biochem. 43, 493–516. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0305-4>.
- Blank, J.M., Morrissette, J.M., Landeira-Fernandez, A.M., Blackwell, S.B., Williams, T.D., Block, B.A., 2004. In situ cardiac performance of

Pacific bluefin tuna hearts in response to acute temperature change. *J. Exp. Biol.* 207, 881–890. <https://doi.org/10.1242/jeb.00820>.

- Block BA, Dewar H, Blackwell SB, Williams TD, Prince ED, et al. (2001) Migratory movements, depth preferences, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna. *Science* 293 (5533): 1310–1314. PMID: 11509729.
- Carnevali, O., Maradonna, F., Sagrati, A., Candelma, M., Lombardo, F., Pignalosa, P., Bonfanti, E., Nocillado, J., Palma, P., Gioacchini, G., Elizur, A., 2019. Insights on the seasonal variations of reproductive features in the Eastern Atlantic Bluefin Tuna. *Gen. Comp. Endocrinol.* 282, 113216. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113216>.
- Cerme, P., Quílez-badia, G., Ospina-alvarez, A., Sainz-, S., 2015. Electronic Tagging of Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*, L.) Reveals Habitat Use and Behaviors in the Mediterranean Sea. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116638>.
- Charni-Natan, M., Aloni-Grinstein, R., Osher, E., Rotter, V., 2019. Liver and steroid hormones-can a touch of p53 make a difference? *Front. Endocrinol.* (Lausanne). 10, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00374>.
- Chase BC (2002) Differences in diet of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) at five seasonal feeding grounds on the New England continental shelf. *Fish Bull* 100: 168–180.
- Corriero, A., Medina, A., Mylonas, C.C., Abascal, F.J., Deflorio, M., Aragón, L., Bridges, C.R., Santamaria, N., Heinisch, G., Vassallo-Agius, R., Belmonte, A., Fauvel, C., Garcia, A., Gordin, H., De Metrio, G., 2007. Histological study of the effects of treatment with gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on the reproductive maturation of captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Aquaculture*

272, 675–686. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.030>.

- Cruz-Castán, R., Saber, S., Macías, D., Vives, M.J.G., Galindo-Cortes, G., Curiel-Ramirez, S., Meiners-Mandujano, C., 2019. A possible new spawning area for Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*): The first histologic evidence of reproductive activity in the southern Gulf of Mexico. PeerJ 2019, 1–13. <https://doi.org/10.7717/peerj.7187>.
- Dressel, U., Allen, T.L., Pippal, J.B., Rohde, P.R., Lau, P., Muscat, G.E.O., 2003. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ Agonist, GW501516, Regulates the Expression of Genes Involved in Lipid Catabolism and Energy Uncoupling in Skeletal Muscle Cells. Mol. Endocrinol. 17, 2477–2493. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0151>.
- FAO. 2005. Report of the third meeting of the Ad Hoc GFCM/ICCA ICCAT Working Group on Sustainable Bluefin Tuna Farming/Fattening Practices in the Mediterranean. Rome, 16–18 March 2005. FAO Fisheries Report. No. 779. Rome, FAO.
- FishBase. <https://www.fishbase.in/search.php>.
- Forner-Piquer, I., Maradonna, F., Gioacchini, G., Santangeli, S., Allara, M., Piscitelli, F., Habibi, H.R., Di Marzo, V., Carnevali, O., 2017. Dose-specific effects of di-isononyl phthalate on the endocannabinoid system and on liver of female zebrafish. Endocrinology 158, 3462–3476. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00458>.
- Fromentin, J., Powers, J.E., 2005. Atlantic bluefin tuna : population dynamics , ecology , fisheries and management 281–306.
- Gardner, L.D., Jayasundara, N., Castilho, P.C., Block, B., 2012. Microarray gene expression profiles from mature gonad tissues of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* in the Gulf of Mexico. BMC

Genomics 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-530>.

- Humston, R., Ault, J.S., Lutcavage, M., Olson, D.B., 2000. Schooling and migration of large pelagic fishes relative to environmental cues. *Fish. Oceanogr.* 9, 136–146. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2419.2000.00132.x>.
- ICCAT, 2017. Addendum to the detailed report of the 2017 bluefin tuna stock assessment session: Updates to the bluefin tuna stock assessment models adopted during the 2017 bluefin tuna species group meeting. *Iccat Scrs 2017/188* 1–6.
- ICCAT, 2019. SCRS report 9.5 109–131.
- Londrville, R.L., Sidell, B.D., 1996. Cold acclimation increases fatty acid-binding protein concentration in aerobic muscle of striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Exp. Zool.* 275, 36–44. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19960501\)275:1<36::AID-JEZ6>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19960501)275:1<36::AID-JEZ6>3.0.CO;2-B).
- Maradonna, F., Carnevali, O., 2018. Lipid metabolism alteration by endocrine disruptors in animal models: An overview. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00654>.
- Mather, F.J., Mason Jr, J.M. and Jones, A. (1995) Historical document: life history and fisheries of Atlantic bluefin tuna. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-370, Miami, FL, 165 pp.
- Medina, A., Abascal, F.J., Megina, C. and García, A. (2002) Stereological assessment of the reproductive status of female Atlantic northern bluefin tuna during migration to Mediterranean spawning grounds through the Strait of Gibraltar. *Journal of Fish Biology* 60, 203–217.

- Medina, A., Aranda, G., Gherardi, S., Santos, A., Mèlich, B., Lara, M., 2016. Assessment of spawning of Atlantic bluefin tuna farmed in the western Mediterranean Sea. *Aquac. Environ. Interact.* 8, 89–98. <https://doi.org/10.3354/aei00166>.

- Mourente, G., Megina, C., Díaz-Salvago, E., 2001. Lipids in female northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus* L.) during sexual maturation. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 351–363. <https://doi.org/10.1023/A:1015011609017>.

- Muhling, B.A., Reglero, P., Ciannelli, L., Alvarez-Berastegui, D., Alemany, F., Lamkin, J.T., Roffer, M.A., 2013. Comparison between environmental characteristics of larval bluefin tuna *Thunnus thynnus* habitat in the Gulf of Mexico and western Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 486, 257–276. <https://doi.org/10.3354/meps10397>.

- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'H, J., Siliart, B., Dumon, H., 2008. Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 92, 272–283. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x>.

- Ottolenghi, F. 2008. Capture-based aquaculture of bluefin tuna. In A. Lovatelli and P.F. Holthus (eds). *Capture-based aquaculture. Global overview*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 508. Rome, FAO. pp. 169–182.

- Ravier, C., 2004. Are the long-term fluctuations in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) population related to environmental changes? 145–160.

- Ravier, C., Fromentin, J., 2001. Long-term fluctuations in the eastern Atlantic and Mediterranean bluefin tuna population 1299–1317. <https://doi.org/10.1006/jmsc.2001.1119>.

- Rodríguez-Roda, J., 1967. Fecundidad del atún, *Thunnus thynnus* (L.), de la costa sudatlántica de España.

- Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Gomez-Requeni, P., Medale, F., Kaushik, S., Perez- Sanchez, J., 2005. Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoprotein lipase. Transcriptional regulation by season and nutritional condition in skeletal muscle and fat storage tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 142, 224–232.

- Schaefer, K., 2001. Reproductive biology of tunas. In: Block, B., Stevens, G. (Eds.), *Fish Physiology: Tuna: Physiology, Ecology and Evolution*. Academic Press, pp. 225–270.

- Sheridan, M.A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B(4): 495–508.

- Sullivan, C. V., Yilmaz, O., 2018. Vitellogenesis and Yolk Proteins, *Fish. Encycl. Reprod.* 266–277. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20567-0>.

- Torstensen, B.E., Nanton, D.A., Olsvik, P.A., Sundvold, H., Stubhaug, I., 2009. Gene expression of fatty acid-binding proteins, fatty acid transport proteins (cd36 and FATP) and β -oxidation-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish oil or vegetable oil. *Aquac. Nutr.* 15, 440–451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00609.x>.

- Weltzien, F.A., Andersson, E., Andersen, Ø., Shalchian-Tabrizi, K., Norberg, B., 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp. Biochem. Physiol. – A Mol. Integr. Physiol.* 137, 447–477. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2003.11.007>.

- Zheng, K., Zhu, X., Han, D., Yang, Y., Lei, W., Xie, S., 2010. Effects of dietary lipid levels on growth, survival and lipid metabolism during early ontogeny of *Pelteobagrus vachelli* larvae. *Aquaculture* 299, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.028>.