



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di laurea magistrale

Biologia marina

**Valutazione qualitativa e quantitativa dei
melanomacrofagi nel fegato di maschi di pesce spada
(*Xiphias gladius*) e la loro correlazione con le zone di
pesca e il metabolismo lipidico**

**Qualitative and quantitative assessment of melanomacrophages in
swordfish (*Xiphias gladius*) liver males and their correlation with fishing
area and lipid metabolism**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Alessandra Miglio

Relatore:

Professoressa Giorgia Gioacchini

Correlatore:

Professoressa Oliana Carnevali

Sessione autunnale
Anno Accademico 2020-2021

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 – Classificazione	4
1.2 - Morfologia	6
1.3 – Distribuzione e migrazione	10
1.4 – Alimentazione	12
1.5 - Stock del Mediterraneo	14
1.6 - Riproduzione	16
1.7 - Metabolismo lipidico	20
1.8 - Melanomacrofagi	24
1.9 - Esposizione agli xenobiotici	30
2. MATERIALI E METODI	33
2.1 Disegno sperimentale e campionamento	33
2.2 Analisi istologiche	34
3. RISULTATI	37
4. DISCUSSIONI	68
5. BIBLIOGRAFIA	75

1. INTRODUZIONE

1.1 – *Classificazione*

Il pesce spada (*Xiphias gladius*, Linneo 1758) è un pesce marino, unico rappresentante della famiglia *Xiphiidae*. Il nome scientifico di questa specie deriva dall' unione delle terminologie dal greco (“ξίφος, xiphos”) e dal latino (“gladius”) del termine spada.

Il pesce spada è inserito nel sottordine degli Scombroidei, nonostante alcuni autori sostengano che ci siano marcate divergenze filogenetiche, le quali potrebbero portare alla creazione di un nuovo sottordine, quello degli Xhipioidei (Gosline, 1968; Collette et al., 1984).

Phylum: *Chordata*

Subphylum: *Vertebrata*

Superclasse: *Gnathostomata*

Classe: *Osteichthyes*

Sottoclasse: *Actinopterygii*

Ordine: *Perciformes*

Sottordine: *Scombroidei/Xhipioidei*

Famiglia: *Xiphiidae*

Genere: *Xiphias*

Specie: *Xiphias gladius*



Figura 1 - Xiphias gladius

1.2 - Morfologia

Il pesce spada presenta un corpo fusiforme con sezione cilindrica, privo di squame. La mascella superiore è prolungata a formare un lungo rostro, simile ad una “spada”, di forma ovale e appiattito in sezione trasversale, utilizzato generalmente per stordire le prede. Il rostro può arrivare a rappresentare fino al 30-35% della lunghezza del corpo di un individuo ed è costituito da una superficie ruvida e porosa che potrebbe servire per creare delle piccole turbolenze per ridurre l’attrito dell’acqua durante il movimento (Viedeler, 1995). Il rostro è costituito da tre tessuti diversi: tessuto adiposo, cartilagine ialina e tessuto osseo privo di osteociti: i primi due sono molto abbondanti alla base, vicino alla quale è presente anche una zona debolmente mineralizzata (Habegger et al., 2015).

I denti sottili e filiformi sono presenti solo in esemplari fino a 1 metro di lunghezza e scompariranno durante lo sviluppo. Il pesce spada subisce, infatti, diversi cambiamenti durante lo sviluppo, come la perdita dei denti, l’aumento delle dimensioni corporee e del rostro, la separazione della pinna dorsale e anale, unite nei giovanili (Nakamura, 1985).

Le larve presentano corpi allungati e fortemente pigmentati: al di sopra degli 8 mm di lunghezza mostrano diverse file di squame su entrambi i lati del corpo, che spariranno con lo sviluppo (Palko et al., 1981).

La linea laterale è assente negli adulti, ma è riconoscibile in esemplari di circa 1 metro di lunghezza (Nakamura, 1985). Sia le pinne dorsali sia quelle anali sono unite e continue sia nelle larve che nei giovanili.

La posizione delle pinne pettorali nelle larve è laterale e durante lo sviluppo migreranno in posizione ventrale, con forma falciforme e rigida.

Negli individui adulti sono presenti due pinne dorsali ben separate, la prima (34 /49 raggi) molto più grande e sviluppata rispetto alla seconda (da 4 a 6 raggi), le due pinne anali sono separate e le pinne pelviche sono assenti negli adulti (Nakamura, 1985). Inoltre, il pesce spada ha 26 vertebre, di cui 15-16 nel busto e 10-11 caudali.

La pinna caudale si sviluppa nei giovanili contemporaneamente alle pinne dorsali e anali. Negli adulti è molto robusta, a forma di mezzaluna, caratteristica che rende il pesce spada adatto al nuoto veloce (Potthoff & Kelley, 1982). Si ipotizza che il pesce spada possa raggiungere e superare i 100 km/h di velocità durante il nuoto. La forma del corpo idrodinamica ha un rapporto spessore-lunghezza che permette di evitare la resistenza alla pressione dell'acqua (Videler et al., 2016).

Il pesce spada è dotato di ampie aperture branchiali, con membrane unite basalmente.

Il dorso e i lati del corpo sono di colore blu-indaco che sfumano gradualmente in bianco-argento nella parte ventrale: questa colorazione è tipica dei pesci pelagici, con la parte dorsale scura per simulare il colore della superficie del mare se visto dall'alto e la parte ventrale più chiara per simulare la luce solare se visto dal basso, permettendogli di mimetizzarsi da potenziali predatori.

Vicino agli occhi è presente anche una ghiandola di grandi dimensioni. È formata da una parte centrale che si allarga a formare due lobi posteriori.

Essa produce una sostanza oleosa che fuoriesce dai pori, non appena viene riscaldata. La ghiandola dell'olio è costituita da tre compartimenti: una parte anteriore e centrale che si allarga in due lobi laterali posteriori. L'olio che viene prodotto fluisce alla pelle attraverso i pori. Questo fluido potrebbe essere utilizzato per rendere il corpo del pesce spada idrodinamico; sotto gli 8 °C solidifica, processo che lo rende persistente sulla pelle di individui che vivono in acque marine fredde (Viedeler et al., 2016).

Per affrontare le condizioni estreme di queste acque (alta pressione, bassa temperatura e bassa luminosità), il pesce spada ha sviluppato un tessuto "riscaldatore", chiamato "heater tissue" costituito da tessuto muscolare modificato nel cavo dell'orbita, che consente di mantenere costante la temperatura di occhi ed encefalo.

All'interno del muscolo sono presenti delle cellule termogeniche che permettono scambi di calore tra il sangue delle vene e delle arterie ed il tessuto muscolare. Questo calore prodotto viene poi trasferito per conduzione al cervello e agli occhi (De Metrio et al., 1977).

Il tessuto è collegato ad una *rete mirabilis* che riscalda il sangue freddo ed ossigenato che proviene dalle branchie, attraverso un sistema di vasi controcorrente che fluisce verso l'encefalo e la retina (Carey, 1982).

Questo organo permette al pesce di mantenere un'eccellente funzionalità nervosa e sensoriale, rendendolo un predatore efficiente anche in queste acque (Canese et al., 2009).

Questa specie raggiunge la dimensione massima di 445 cm e circa 540 kg di peso. Le femmine sono spesso di dimensioni maggiori rispetto ai maschi (Palko et al., 1981).

1.3 – Distribuzione e migrazione

Il pesce spada è una specie cosmopolita ed è distribuito in acque tropicali, temperate e subtropicali di tutti gli oceani, tra 45°N e 45°S e nei larghi bacini come Golfo del Messico, Mar dei Caraibi e Mediterraneo, Mar Nero e Mare di Azov (Arocha, 2007).

Xiphias gladius è una specie meso pelagica, predilige acque superficiali sopra al termoclino, ma sono tolleranti ad un ampio range di temperatura che va dai 5 ai 27 °C (Nakamura, 1985), invece le larve generalmente vivono in acque con temperature al di sotto dei 24 °C.

È una specie altamente migratoria che si sposta stagionalmente da acque tropicali ad aree di foraggiamento in acque fredde o temperate. Vivono ad un range di profondità che va da 0 a 800 m (Abascal et al., 2010)

Oltre alle migrazioni stagionali, il pesce spada compie delle migrazioni verticali giornaliere, passando le ore diurne ad una profondità compresa tra 250 e 650 metri, affiorando velocemente in superficie e restandoci per circa un'ora per tornare poi in profondità, e durante la notte ritorna in superficie per restare tra 0 e 10 metri (Canese et al., 2009).

In Oceano Atlantico occidentale, il pesce spada è distribuito lungo le coste del Canada fino all'Argentina, con elevate concentrazioni nel Golfo del Messico e

in Florida durante i mesi estivi. Mentre in Atlantico orientale questa specie si sposta dalle coste scandinave, del Regno Unito, Francia e Spagna fino ad arrivare in Africa a Capo di Buona Speranza.

(Palko et al., 1981).

Il pesce spada è distribuito anche in tutto il bacino del Mediterraneo e del Mare di Marmara; inoltre compie delle migrazioni estive dalle acque del mar Nero a quelle del Mar D'Azov (Palko et al., 1981).

Nell' Oceano Pacifico, il pesce spada è distribuito lungo le coste degli Stati Uniti settentrionali fino al Cile e dalle coste giapponesi fino a quelle di Australia e Nuova Zelanda, dove le larve e i giovanili sono spesso associati ad aree di upwelling.

Alcune zone in cui sono evidenti grandi concentrazioni di individui sono anche le coste dell'India e dell'Arabia Saudita nell'Oceano Indiano.

Nel mar Mediterraneo, le aree di spawning si trovano nel bacino occidentale, ad est dello stretto di Gibilterra fino alle Baleari, nel sud del Mar Tirreno e nello stretto di Messina, nel Golfo di Taranto (Ionio) e nel mar Levantino (sud-est di Rodi) (Arocha, 2007). Il maggior numero di giovanili si riscontra in Mediterraneo nei mesi tra novembre e marzo.

Si ipotizza che il pesce spada tenda a fare ritorno nelle stesse acque in cui è nato per riprodursi, questo comportamento viene definito “homing behaviour” ed avviene generalmente tra individui di una stessa popolazione (Carey & Robinson, 1981).

1.4 – Alimentazione

Il pesce spada possiede la capacità di riscaldare la parte cefalica, caratteristica che gli garantisce un miglior successo nella cattura delle prede a profondità elevate.

La dieta del pesce spada è variabile a seconda dell’habitat e della stagione, inoltre subisce dei cambiamenti anche in base alla dinamica di popolazione delle sue prede.

Le larve si nutrono principalmente durante la mattina e la sera, mentre mostrano una ridotta intensità di alimentazione nel pomeriggio e nella notte. Quando le larve sono di dimensioni molto ridotte (fino a 9 mm) si nutrono principalmente di zooplancton ed organismi dell’ordine Mysida, Phyllopora e Amphipoda.

Quando raggiungono le dimensioni di circa 20 mm iniziano a cibarsi anche di larve di pesci (Palko et al., 1981).

I giovanili (< 100 cm) si cibano di cefalopodi, piccoli pesci ed in piccola parte anche di alcuni crostacei pelagici. Per quanto riguarda il Mar Mediterraneo la principale famiglia di cefalopodi di cui si nutrono i giovanili è quella degli Ommastrephidae, seguita da quella dei Cranchiidae e dei Sepiolidae. I piccoli pesci sono principalmente rappresentati da acciughe (*Engraulis encrasicolus*) e sardine (*Sardina pilchardus*).

Gli adulti in acque profonde, si nutrono principalmente di pesci pelagici, compresi i tonni (*Thunnus* sp.), lampughe (*Coryphaena* sp.), pesci volanti (*Exocoetidae* sp.), barracuda (*Sphyraenidae* sp.) e altri, mentre in acque relativamente basse predano principalmente pesci pelagici neritici: sgombri (*Scomber scombrus*), aringhe (*Clupea harengus*), acciughe (*Engraulis encrasicolus*), sardine (*Sardina pilchardus*) (Nakamura, 1985).

Relativamente importanti per l'alimentazione del pesce spada sono anche i cefalopodi: infatti, analizzando i contenuti stomacali di pesci spada del Mediterraneo, si evince che le prede principali siano *Galiteuthis armata* e *Todarodes sagittatus*.

Stimare la quantità di cefalopodi ingeriti dal pesce spada risulta essere spesso problematico, portando ad una possibile sottostima o sovrastima del numero di

prede ingerite. Infatti, nel momento in cui viene catturato, il pesce spada potrebbe rigettare le prede ingerite, per tentare di sottrarsi all'amo.

Infine, i crostacei sono presenti nella dieta del pesce spada ma in quantità molto più basse rispetto a pesci e cefalopodi.

È probabile che questi organismi utilizzino la spada per tramortire o confondere le loro prede, in particolare seppie e calamari, creando dei vortici in acqua. In questo modo il pesce spada utilizza un ridotto quantitativo di energia per la predazione perché non sarà impegnato nell'inseguimento attivo delle prede (Nakamura, 1985).

1.5- Stock del Mediterraneo

L'ICCAT (*International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas*) ha identificato due stock Atlantici separati inserendoli in due aree ICCAT, una al di sopra dei 5°N e uno al di sotto, ed uno stock mediterraneo. (Arocha, 2007).

La maturità sessuale negli individui appartenenti allo stock mediterraneo viene raggiunta prima rispetto a quello atlantico. Le femmine raggiungono la maturità sessuale ad una taglia intorno ai 130 cm, che corrisponde ad un'età di 3-4 anni. I maschi invece sono maturi già a 95 cm di lunghezza.

Ad oggi, lo stock mediterraneo è considerato in “overfishing”, arrivando a pescare individui anche al di sotto della taglia minima di cattura. La taglia minima di cattura è stata stabilita a 100 cm dall'ICCAT, ben al di sotto della taglia di prima maturazione, consentendo la cattura di animali che ancora non si sono riprodotti.

La pesca del pesce spada viene effettuata soprattutto utilizzando palangari, arpioni o reti da posta. È una specie soggetta a “bycatch”, cattura accidentale di specie non target o individui che sono di dimensioni minori rispetto alla taglia commerciale.

Per la conservazione del pesce spada, l'ICCAT ha stabilito un piano pluriennale di ripristino delle popolazioni. Questo piano prevede e stabilisce delle norme e delle linee guida per la gestione ed il controllo dello stock Mediterraneo, per raggiungere quello che viene definito “Maximum Sustainable Yield”, ovvero il massimo rendimento sostenibile, entro il 2031.

Inoltre, è stata introdotta un TAC (totale ammissibile di cattura) pari a 10.500 tonnellate; sono previsti fermi pesca stagionali per evitare, o perlomeno ridurre le catture di organismi giovanili.

1.6 - Riproduzione

Xiphias gladius è una specie gonocorica con fecondazione esterna.

Nonostante sia un animale solitario, durante la stagione riproduttiva tende a formare una coppia stabile dall'inizio della stagione riproduttiva fino alla fine.

La riproduzione avviene tra individui che vengono definiti maturi, ovvero un animale che ha raggiunto la maturità sessuale e quindi capaci di riprodursi.

In Mediterraneo la stagione riproduttiva avviene nel periodo estivo, inizia a giugno e termina alla fine di agosto.

In Oceano Atlantico viene considerata area di spawning tutta la zona equatoriale-tropicale, che si estende dai Caraibi, Golfo del Messico e Florida. Qui la deposizione delle uova avviene durante tutto l'anno, a differenza delle zone più temperate in cui avviene da aprile a settembre.

In Oceano Pacifico settentrionale e centrale lo spawning avviene in primavera ed estate per un periodo che si estende da marzo a luglio. Nel Pacifico meridionale invece si verifica più tardivamente, tra settembre e dicembre.

Diversi studi hanno dimostrato che la taglia di prima maturità sessuale nelle femmine in Mediterraneo avviene intorno ai 130 cm LJFL. Per taglia di prima maturità sessuale si intende la dimensione alla quale il 50% degli individui di una popolazione ha iniziato la maturazione gonadica (L50).

Gran parte delle femmine sotto i 120 cm sono di norma sessualmente immature. La taglia di prima maturità in Mediterraneo è comunque ridotta rispetto agli stock atlantici e pacifici (De la Serna et al., 1995; Kime et al., 2002; Macías et al., 2005).

La taglia di prima maturità nei maschi non si differenzia molto nelle diverse aree. In Mediterraneo i maschi sono maturi intorno ai 95 cm, in Nord Atlantico ai 128 cm e in Atlantico meridionale tra 120 e 130 cm.

(Hazin et al., 2002)

Nei maschi avviene un cambiamento nella proporzione delle cisti del testicolo che contengono spermatogoni, spermatociti, spermatidi e spermatozoi; questo va a determinare le diverse fasi di maturità.

I maschi vengono considerati in maturazione quando mostrano un'alta

percentuale di cisti con spermatociti e spermatidi nelle pareti dei tubuli e una ridotta quantità di spermatozoi viene trovata nel lume dei tubuli seminiferi (Macías et al., 2005). Il testicolo del pesce spada consiste in tubuli seminiferi e tessuto connettivo. Le pareti del tubulo seminifero sono formate da cisti, costituite da cellule germinali che si sviluppano in modo sincrono e cellule del Sertoli.

Gli spermatogoni si sviluppano in sequenza: spermatociti primari, spermatociti secondari e spermatidi. Gli spermatozoi maturi si accumulano nel lume dei tubuli seminiferi (Macías et al., 2005). Le spermatocisti sono formate da due componenti cellulari: le cellule del Sertoli e le cellule germinali. Le cellule del Sertoli derivano da precursori delle cellule somatiche presenti nell'epitelio germinale. La riproduzione viene controllata dal sistema endocrino. Nell'ipotalamo viene prodotto il GnRH (Gonadotropin Releasing hormon), un decapeptide altamente conservato, il quale funziona come neurotrasmettitore che raggiunge l'ipofisi, dove viene riconosciuto da particolari recettori di membrana delle cellule gonadotrope. In queste ultime vengono sintetizzate le gonadotropine (LH o FSH), che verranno riversate nel circolo ematico e raggiungeranno le gonadi.

Nelle gonadi, esse inducono la sintesi degli ormoni sessuali steroidei. Nei testicoli viene prodotto testosterone che è il responsabile del differenziamento

degli spermatogoni fino agli spermatozoi, mentre nell'ovario vengono prodotti estrogeni e progesterone che regolano la maturazione degli oociti.

La spermatogenesi è un processo più semplice rispetto all'oogenesi. Anch'essa è regolata dalle gonadotropine che vengono prodotte dall'ipofisi. L'LH tende a dominare nei primi stadi del processo mentre nella fase finale è l'FSH a giocare un ruolo dominante.

Questo processo può essere diviso in diverse fasi:

1. La prima fase è la moltiplicazione, in cui le cellule germinali primordiali si moltiplicano per mitosi e si differenziano in spermatogoni.

Gli spermatogoni di tipo A si differenziano poi in spermatogoni di tipo

B. La principale differenza tra essi è il tasso di divisione, lento nei primi e più veloce negli altri e sono di più piccole dimensioni e hanno nuclei ridotti.

2. A questo punto iniziano una serie di divisioni mitotiche che portano alla formazione di spermatociti primari.

3. Gli spermatociti primari vanno quindi incontro ad una prima divisione meiotica al termine della quale si formeranno gli spermatociti secondari.

Anche in questo caso avviene una seconda meiosi con cui si formano spermatidi aploidi.

4. L'ultima fase viene definita spermiogenesi e porta alla formazione di spermatozoi flagellati. Essi matureranno nei dotti e costituiranno lo sperma.

1.7 - Metabolismo lipidico

I processi fisiologici richiedono un quantitativo specifico di nutrienti, che vengono in parte stoccati come riserve energetiche in diversi organi e tessuti. I pesci utilizzano soprattutto lipidi e proteine per svolgere i processi vitali fondamentali piuttosto che i carboidrati (Maradonna & Carnevali, 2018).

La quantità di energia disponibile per un individuo durante il suo ciclo di vita influenza la sua abilità di crescere e riprodursi ed è correlata in modo positivo al contenuto lipidico, importante per l'immagazzinamento di energia e spesso le prime macromolecole ad essere catabolizzate (Albo-Puigserver et al., 2017).

Il ruolo dei lipidi è fondamentale per il funzionamento di diversi tessuti, quali fegato, tessuto adiposo e intestino nei quali vengono immagazzinati. I lipidi assunti sono una fonte essenziale di acidi grassi, i quali regolano diverse funzioni, tra cui l'equilibrio energetico, l'assunzione di cibo, la crescita, la riproduzione e la salute (Maradonna & Carnevali, 2018).

I pesci che compiono lunghe migrazioni acquisiscono i nutrienti essenziali principalmente nei periodi nei quali si trovano nei luoghi di alimentazione e foraggiamento.

Successivamente, quando il periodo riproduttivo si avvicina, i lipidi vengono investiti per lo sviluppo delle gonadi: durante la gametogenesi e lo sviluppo embrionale sono implicati diversi nutrienti, come gli acidi grassi insaturi omega-3.

La quantità di lipidi può cambiare durante l'anno a causa di differenti processi biologici (es. crescita, mantenimento e riproduzione) e fattori esterni (es. temperatura). Nelle regioni temperate, gli ambienti marini pelagici mostrano

importanti fluttuazioni sia in termini di temperatura che di disponibilità di cibo. In risposta a queste fluttuazioni gli organismi marini hanno sviluppato diverse strategie per ottimizzare la riproduzione e la crescita della popolazione (Albo-Puigserver et al., 2017).

I pesci possono essere divisi in base alla strategia riproduttiva, in individui “*capital breeding*” e “*income breeding*”. I primi sono individui che accumulano le proprie riserve energetiche prima della stagione riproduttiva, per poi utilizzarle per la riproduzione. Gli “*income breeding*” invece accumulano energia durante il periodo riproduttivo.

I lipidi sono fondamentali durante la riproduzione e nello sviluppo degli embrioni.

Durante l’embriogenesi sono presenti in grandi quantità due acidi grassi: l’acido docosaesaenoico (DHA) e acido eicosapentaenoico (EPA); essi sono necessari per lo sviluppo del sistema nervoso della progenie (Lazo-Andrade et al., 2021).

Il pesce spada mostra fluttuazioni del contenuto lipidico, con il massimo immagazzinamento nella stagione non riproduttiva. Queste variazioni dello stato energetico e nutrizionale permettono di ipotizzare che l’organismo possa

adeguare le sue riserve energetiche per svolgere i processi fisiologici e per contrastare le condizioni ambientali.

I lipidi possono contribuire al fabbisogno energetico degli organismi a causa della loro struttura chimica, soprattutto per l'alto contenuto di carbonio, e della loro capacità di essere stoccati in organi come il fegato (Lazo-Andrade et al., 2021).

I lipidi, una volta sintetizzati, vengono accumulati negli epatociti come fonte di energia (Maradonna & Carnevali, 2018).

1.8 - Melanomacrofagi

I melanomacrofagi sono cellule fagocitarie presenti soprattutto in tessuti emopoietici di animali pecilotermi, quali la milza, il surrene e il fegato, e la loro presenza in questi ed altri organi potrebbe essere un importante indicatore patologico (Dang et al., 2019). I melanomacrofagi presentano 3 pigmenti: lipofuscina, melanina ed emosiderina (Steinel & Bolnik, 2017).

Si ipotizza che la melanina neutralizzi i radicali liberi rilasciati durante la rottura delle membrane cellulari. Esse possono essere danneggiate, ad esempio, a causa della presenza di inquinanti o sostanze tossiche. Alcuni studi hanno dimostrato che i MMC (Centri di Melanomacrofagi) sono aggregazioni in cui avviene la melanogenesi primaria, processo di produzione della melanina, e quindi non viene solo accumulata (Agius & Roberts., 2003).

Nei pesci, la melanogenesi avviene nel derma e le cellule che producono melanina sono chiamate melanociti. I melanociti sono melanofori immaturi che producono attivamente melanina, ma sono inoltre capaci di maturare e diventare melanofori, i quali si sposteranno in quello che viene definito strato melanoforo funzionale.

Si è a lungo sostenuto che, in contrasto con i melanociti, i melanomacrofagi non fossero in grado di produrre melanina. Questa ipotesi è stata

successivamente smentita da diversi studi, tra cui quelli di Zuasti et al. (1990) e Gallone et al. (2002), che studiarono queste strutture rispettivamente nella spigola e nella rana. Essi dimostrarono che i melanomacrofagi possono sintetizzare la melanina in situ. Questo processo di melanogenesi differisce dalla via classica descritta in precedenza, soprattutto in relazione alla natura di un enzima, la dopa-ossidasi che in questo caso ha proprietà più simili ad una perossidasi che ad una tirosinasi come invece avviene nei melanociti.

In un loro studio del 1985, Wolke et al., suggerirono come la melanina possa essere importante nella produzione di composti con azione battericida, tra cui il perossido di idrogeno e i loro precursori chinonici. Questi composti sono fondamentali per gli eterotermi perché la loro attività enzimatica può essere drasticamente ridotta alle basse temperature (Agius & Roberts., 2003).

La lipofuscina è un sottoprodotto della perossidazione degli acidi grassi insaturi; questo processo è uno dei principali fenomeni di tossicità a cui possono andare incontro le membrane cellulari ed è avviato dalla presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che interagendo con i lipidi portano alla formazione di perossidi lipidici (Qualhato et al., 2018).

L'emosiderina deriva dalla fagocitosi degli eritrociti e dell'emoglobina e gioca un ruolo fondamentale nel riciclo del ferro (Qualhato et al., 2018). È un

pigmento di colore marrone, granulare e relativamente insolubile che contiene componenti proteiche e ferriche. Essa deriva dal catabolismo dell'emoglobina da eritrociti deteriorati o viene prodotta come intermedio metabolico durante il riciclo di componenti per l'eritropoiesi.

L'emosiderina viene normalmente osservata associata a granuli di lipofuscina: inoltre è stato osservato un aumento di emosiderina in seguito ad anemia emolitica e ad una ridotta alimentazione prolungata (Agius & Roberts., 2003).

La comparsa dei melanomacrofagi è spesso legata a diversi fattori e condizioni, ad esempio età, stato nutrizionale, condizioni anatomopatologiche, così come a causa di fattori ambientali: processi di detossificazione degli inquinanti e funzioni di protezione dai radicali liberi (Martins et al., 2020).

I melanomacrofagi possono aggregarsi tra loro a formare quelli che vengono definiti Centri di Melanomacrofagi (MMC). La nomenclatura "centri di melanomacrofagi" è stata attribuita per la prima volta a questi aggregati trovati nei teleostei, ma strutture simili sono state descritte anche in pesci cartilaginei primitivi. È stato suggerito come i MMC rappresentino gli analoghi primitivi dei centri germinali dei linfonodi di mammiferi e uccelli (Agius & Roberts., 2003).

Gli MMCs e gli MMs (melanomacrofagi singoli) ricoprono un ruolo sia nella difesa immunitaria degli organismi che in processi fisiologici non immunitari.

La funzione primaria dei melanomacrofagi è la fagocitosi di cellule degradate, compresi gli eritrociti. Rimuovono i composti di rifiuto dal tessuto ed accumulano materiali che non possono essere eliminati tramite digestione o potenzialmente tossici (Steinel & Bolnik, 2017).

Lo stress può indurre cambiamenti cellulari nei tessuti dei pesci ed i principali effetti che ne derivano sono un aumento di cellule simili ai macrofagi ed un incremento nella degradazione di globuli rossi.

Generalmente lo stress aumenta la suscettibilità dei pesci alle malattie. Questo è generalmente accompagnato da cambiamenti nella circolazione dei globuli bianchi. Il numero di linfociti diminuisce mentre aumenta il numero di granulociti. Gli effetti più importanti sono: l'aumento nell'abbondanza di macrofagi, una riduzione del numero di emoblasti e linfociti ed un aumento della degradazione degli eritrociti.

I pesci che vivono in ambienti inquinati possono riflettere le condizioni ambientali degradate in un'alterata attività del sistema immunitario o delle difese non specifiche (Agius & Roberts., 2003).

È stato osservato un aumento di MMC in pesci esposti a metalli, erbicidi, agenti antimicrobici e in organismi infettati da parassiti (Qualhato et al., 2018).

Diversi studi clinici hanno dimostrato una forte associazione tra MMC ed un ampio range di batteri intracellulari resistenti (*Mycobacteria*, *Renibacteria*) e parassiti. I centri giocano infatti un ruolo fondamentale nello sviluppo della risposta immunitaria agli antigeni batterici (Agius & Roberts., 2003).

Basilone et al. hanno dimostrato come l'esposizione ad inquinanti provochi un aumento della densità di MMC nel fegato di *Engraulis encrasicolus* dovuto ad un aumento del numero di MMC piuttosto che della loro dimensione (Binod et al., 2019).

Sono stati svolti diversi studi sull'incidenza dei MMC nella milza, reni e fegato di pesci pescati in acque con condizioni ipossiche o contaminate da inquinanti chimici tossici, ma questi studi hanno portato a risultati differenti. Alcuni autori hanno riportato un aumento nei centri mentre altri il contrario. Alcuni esperimenti mostrano un aumento a bassi livelli di inquinamento che vengono attribuiti alla capacità del sistema di difesa cellulare di rimuovere i detriti con un aumento dell'attività fagocitaria, con conseguente aumento dei centri di MMC (Agius & Roberts., 2003).

Negli Osteitti, i centri sono generalmente di forma tondeggianti, anche se possono mostrare irregolarità e possono essere separati dal tessuto circostante da una capsula costituita da fibre reticolari.

Normalmente si trovano in stretta relazione con i vasi sanguigni, sia nel fegato che nella milza (Binod et al., 2019).

Passantino et al. (2014) hanno dimostrato che i melanomacrofagi possono muoversi in modo autonomo all'interno dei vasi sanguigni ed hanno osservato una migrazione di melanomacrofagi liberi dai vasi portali del fegato al parenchima epatico del tonno rosso atlantico (*Thunnus thynnus*). I meccanismi che facilitano la loro aggregazione sono però ancora sconosciuti.

I MMC variano in quantità, dimensione e pigmentazione in base all'organo in cui si osservano, all'età dell'organismo, allo stato di salute e alle condizioni ambientali ed ecosistemiche nelle quali si trova.

In molti studi vengono infatti utilizzati per valutare la qualità delle acque, la presenza di contaminanti o patogeni in un determinato ambiente o organismo.

I centri di melanomacrofagi nei pesci hanno anche un ruolo fondamentale nel riconoscimento da parte del sistema immunitario degli antigeni, sia esogeni che endogeni relativi ad elementi potenzialmente dannosi quali, ad esempio, i batteri. È stato dimostrato che piccoli linfociti circolanti spesso migrano nei

centri, ed è stato suggerito che questo sia il luogo in cui l'antigene interagisce con il sistema immunitario.

Esiste una stretta relazione tra i MMC e le cellule linfoidi, questi infatti sono uno dei principali siti di ritenzione a lungo termine dell'antigene (Agius & Roberts, 2003).

Il controllo dello stato dei MMC potrebbe essere un indicatore biologico per monitorare lo stato di salute delle popolazioni di pesci. Gli MMC si sviluppano in associazione con gli stadi tardivi di un'inflammatione cronica come risposta a gravi danni tissutali e associati ad una risposta cellulare ad una varietà di infezioni (Agius & Roberts., 2003).

1.9 - Esposizione agli xenobiotici

L'impatto degli inquinanti sui sistemi marini è stato largamente affrontato in vari studi. Il mar Mediterraneo è particolarmente sensibile soprattutto all'inquinamento chimico essendo un bacino semi-chiuso, con alti tassi di evaporazione, di salinità e un regime microtidale che impedisce alle sostanze inquinanti di disperdersi favorendone l'accumulo. Molti paesi industrializzati si affacciano sul Mediterraneo; negli anni molto materiale di scarico derivante

dalle attività industriali o dall'agricoltura è stato, ed è tuttora, rilasciato in mare.

Le principali sostanze inquinanti sono pesticidi organoclorurati (DDT), bifenili policlorurati (PCBs) e idrocarburi policiclici aromatici.

Nell'ambiente marino, gli inquinanti possono entrare in contatto con gli organismi con diverse modalità, ad esempio tramite ingestione, attraverso le branchie o tramite il processo definito biomagnificazione. Quest'ultimo indica l'accumulo di sostanze tossiche lungo la rete trofica.

Un altro studio svolto da De Metrio et al. (2003) mostra un'elevata percentuale di intersex e la produzione di vitellogenina nel fegato di maschi di pesce spada della popolazione mediterranea. Questo potrebbe confermare l'alta suscettibilità del pesce spada agli distruttori endocrini e l'elevato inquinamento presente nel bacino.

Il pesce spada essendo un top predator è particolarmente soggetto ad un accumulo di sostanze tossiche attraverso il processo di biomagnificazione.

Inoltre, essendo una specie di interesse commerciale, gli effetti di queste sostanze sono particolarmente importanti sia per il settore della pesca che per i rischi legati alla salute umana (De Metrio et al., 2003).

La strategia alimentare del pesce spada e l'alto tasso di digestione possono influenzare la quantità di contaminanti ingeriti.

Il contenuto lipidico nei muscoli di *Xiphias gladius* è inoltre maggiore rispetto a quello del tonno e può essere legato al più intenso accumulo di inquinanti organici persistenti lipofili (Corsolini et al., 2008). I pesci possono accumulare metalli pesanti da cibo, acqua e sedimenti. Essi possono interferire con i sistemi biologici ed interagire con diverse strutture intracellulari.

La loro presenza, anche a basse concentrazioni nei tessuti dei pesci può diventare un rischio non solo per la salute dell'organismo stesso ma anche per quella umana (Mehouel et al., 2019).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Disegno sperimentale e campionamento

Per questo studio sono stati analizzati esemplari maschi di *Xiphias gladius* pescati in quattro zone di pesca del mar Mediterraneo: mar Ionio, mar di Sardegna, Sicilia e Spagna durante la stagione riproduttiva (giugno-settembre).

In accordo con le linee guida per il campionamento biologico, stipulate dall'ente ICCAT (International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas), sono stati eseguiti campionamenti sui pesci catturati a scopo commerciale.

Per ogni area di pesca sono stati considerati dieci individui di cui sono stati registrati i dati biometrici: il peso espresso in kg (totale e/o eviscerato) e la lunghezza tra la mandibola inferiore e la forca espressa in LJFL (Lower Jaw Fork Length).

È stata svolta una analisi istologica su porzioni di fegato e gonade che sono state prelevate da ciascun organismo.

Sui campioni di fegato sono state svolte analisi per la valutazione e la quantificazione della composizione lipidica e dei melanomacrofagi.

Al momento del campionamento, i campioni di fegato e di gonade sono stati inseriti in eppendorf e fissati in formol (formaldeide/gluteraldeide).

2.2 Analisi istologiche

Le porzioni di fegato e gonade (3-4 mm circa) sono state inserite in biocassette per le successive analisi istologiche (Bio-Optica, Milan, Italy).

Sono stati effettuati dei lavaggi inserendo le biocassette con il campione in etanolo (EtOH) a concentrazioni crescenti (50% per 45 minuti, 70% per 45 minuti, 80% per 45 minuti, 95% per 45 minuti e 100% due lavaggi da un'ora ognuno) come ultimo passaggio in xilene per 45 minuti. I campioni sono stati poi immersi in paraffina bianca per due ore e in paraffina blu per 1.30 h. Una volta che la paraffina si è solidificata sono state fatte cinque sezioni per ogni campione al microtomo Leica RM2125 RTS (Biosystems) con spessore 4 μm e posizionate su un vetrino.

Le sezioni sono state trattate con etanolo e xilene per eliminare la paraffina in eccesso e colorate con ematossilina-eosina (H&E): lavaggi di 10 minuti ciascuno in xilene, seguiti da una fase di idratazione in EtOH a concentrazioni decrescenti (100%, 95%, 80%, 70%) per 5 minuti ciascuno. Successivamente sono state posizionate sotto acqua corrente per 10 minuti e colorate in

ematossilina per 120 secondi. In seguito, le sezioni sono state poste sotto acqua corrente per 5 minuti per poi essere trasferite in eosina per 25 secondi e nuovamente in acqua per 2 minuti. Le sezioni passeranno ad una fase di disidratazione in etanolo a concentrazioni crescenti (70%, 80%, 95%, 100%) per poi essere lasciati in xilene per 15 minuti.

In seguito, le sezioni sono state montate sotto cappa chimica utilizzando un mezzo di montaggio SafeMount® (Bio-Optica, Milan, Italy).

I vetrini sono stati osservati al microscopio Zeiss Axiio Imager M2 e le sezioni sono state fotografate con ingrandimento al 20x e al 40x attraverso la camera ad alta risoluzione Zeiss Axiocam 105 color.

Oltre alle sezioni di fegato, sono state analizzate le sezioni delle gonadi degli stessi individui e osservate al microscopio per determinare il sesso e lo stadio di maturazione.

Per la quantificazione dei melanomacrofagi e dei lipidi sono state analizzate cinque foto per ogni campione. Per la quantificazione dei lipidi sono state prese in considerazione le immagini al 40x e analizzate tramite il programma ImageJ/Fiji (<https://imagej.nih.gov/ij/>) per misurare l'area totale occupata dai lipidi in una sezione (Forner-Piquer et al., 2017). La quantificazione dei melanomacrofagi è stata svolta invece su immagini al 20x ed è stata considerata

sia l'area dei singoli melanomacrofagi (MMs), che quella dei centri di melanomacrofagi (MMCs), che l'area totale (MMs + MMCs) utilizzando ImageJ. Inoltre, è stata fatta anche una conta sia dei centri che dei singoli melanomacrofagi.

Per entrambe le quantificazioni sono state fatte due repliche. La significatività dei risultati acquisiti dal conteggio totale e dalle medie è stata valutata con il test Anova previa trasformazione dei valori percentuali in arcoseno utilizzando il software prisma Graphpad (GraphPad Prism version 6.04 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA). Le differenze sono state considerate significative per valori di $p\text{-value} < 0.05$.

Sono stati effettuati anche test di correlazione usando RStudio tramite il pacchetto *Stats*, comando *cor* con il metodo Pearson, per valutare se ci fossero delle correlazioni tra le aree e le conte dei MMs e MMC in funzione del peso, della lunghezza e del mese di pesca.

3. RISULTATI

Sono state analizzate le sezioni di fegato di 10 individui maschi provenienti da ciascuna zona di pesca. Per ogni sezione è stata quantificata l'area dei melanomacrofagi singoli (fig.2), dei MMC (fig.3), l'area totale (MMs+MMCs) e l'area occupata dai lipidi (fig.4). Inoltre, sono stati anche contati i MMs, i MMCs e il totale dei singoli melanomacrofagi più i centri.

Questa analisi è stata ripetuta per tutte le sezioni.

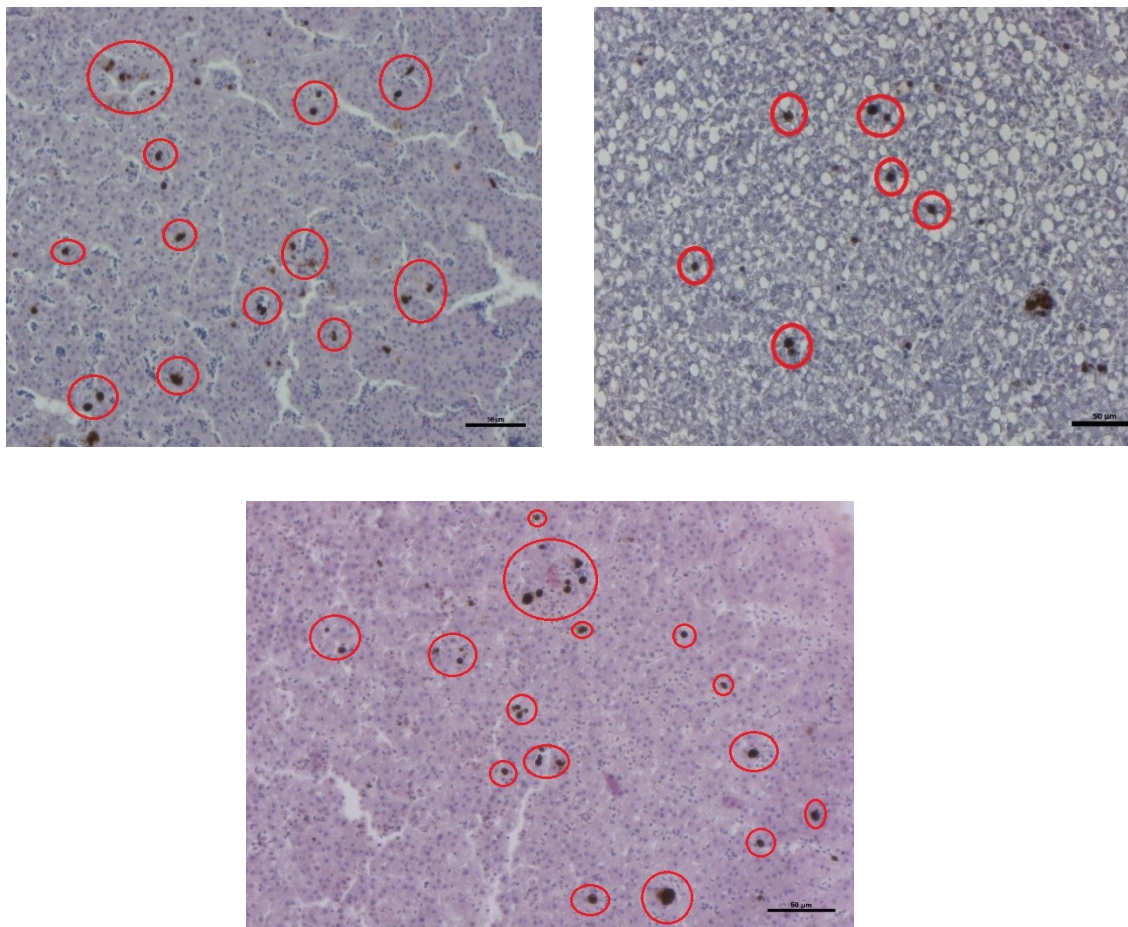


Figura 2 – Sezioni di fegato di maschi di “*Xiphias gladius*” ad ingrandimento 20X (50 µm): cerchio rosso MMs.

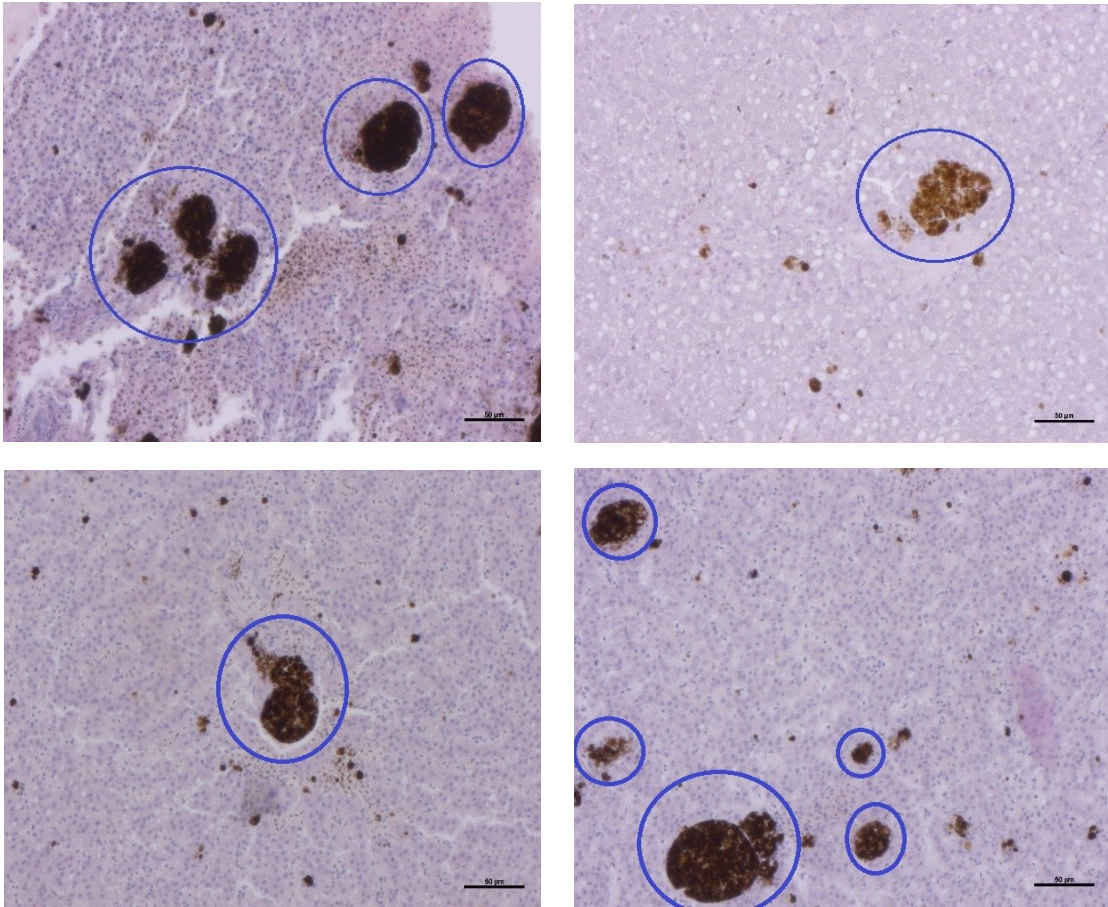


Figura 3 - Sezioni di fegato di maschi di “*Xiphias gladius*” ad ingrandimento 20X (50 µm): cerchio blu MMCs.

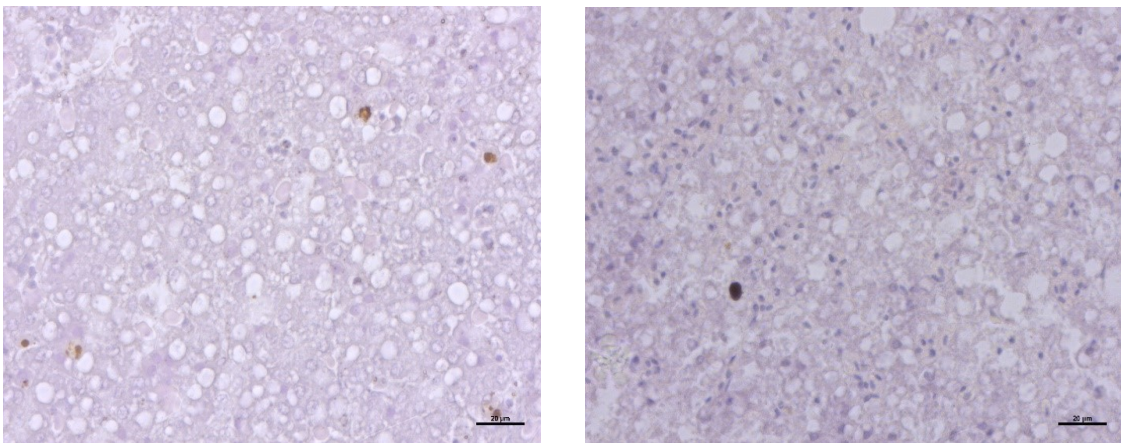


Figura 4 – Sezioni di fegato di maschi di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 40x (20 µm): lipidi

Successivamente per ogni area sono stati ricavati dei grafici per confrontare il numero di MMs, MMCs, e totale di ogni individuo di una stessa zona.

Per quanto riguarda il Mar Ionio sono state rilevate delle differenze minime tra i 10 individui analizzati, sia per quanto riguarda l'area dei melanomacrofagi singoli che dei centri (Figura 5).

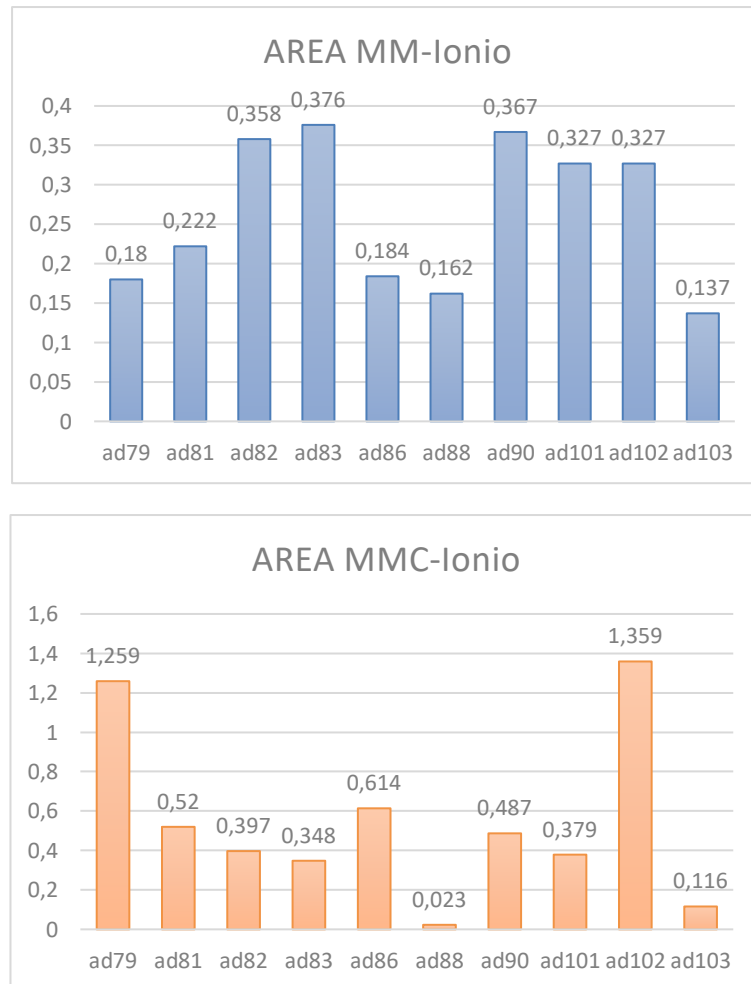


Figura 5 - Grafici area MMs e MMCs Ionio

Nella maggior parte degli individui l'area totale dei melanomacrofagi è occupata per più del 50% da MMCs, ad eccezione dell'individuo ad88 in cui è evidente la maggioranza di MMs (Figura 6).

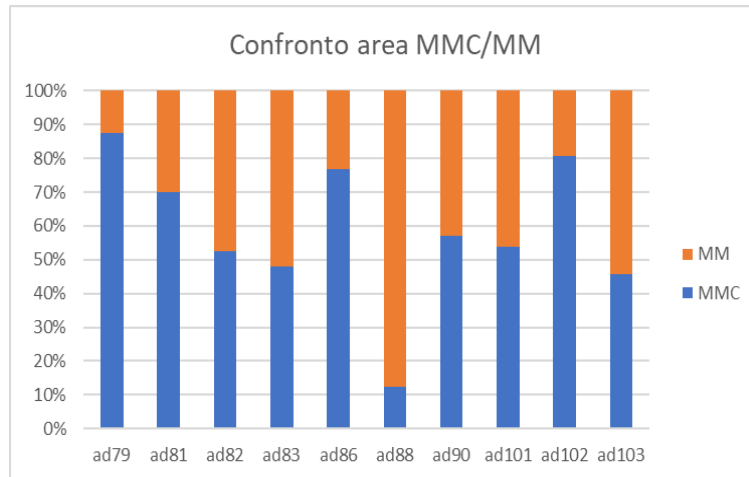
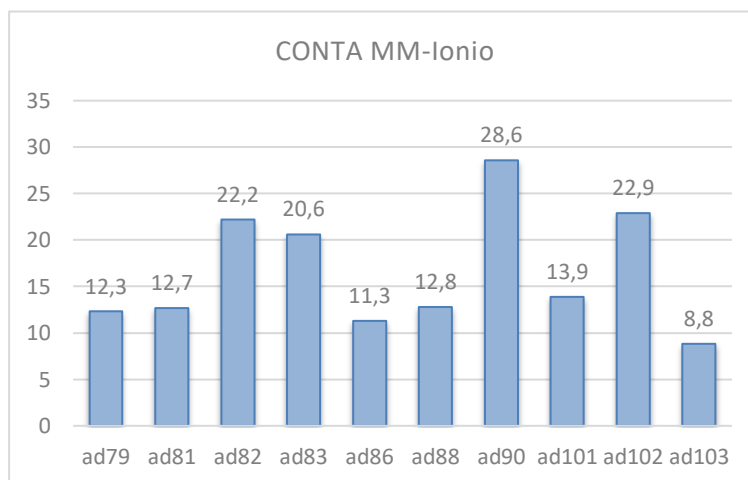


Figura 6 - Grafico confronto area MMCs/MMs Ionio

Per quanto riguarda la conta invece, sono state analizzate delle differenze nel numero dei melanomacrofagi singoli tra i diversi individui. I MMCs invece mostrano un trend stabile tra tutti i 10 organismi analizzati (Figura 7).



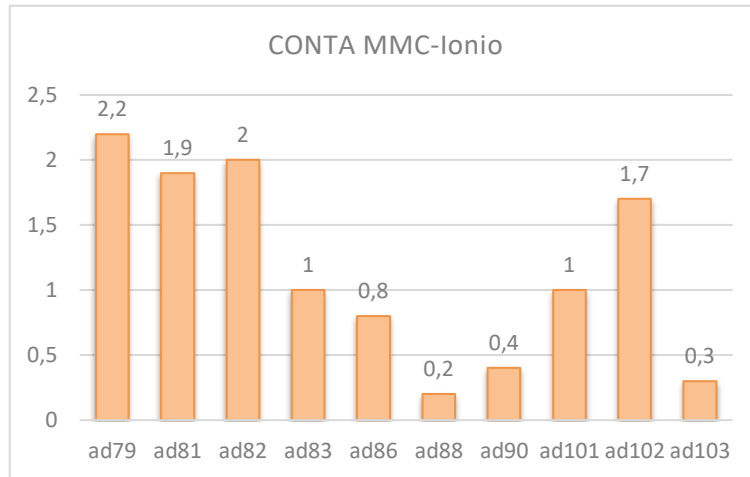


Figura 7 - Grafici conta MMs e MMCs Ionio

Il grafico in Figura 8 invece mostra che in tutti gli individui è presente un numero nettamente maggiore di MM rispetto ai MMCs.

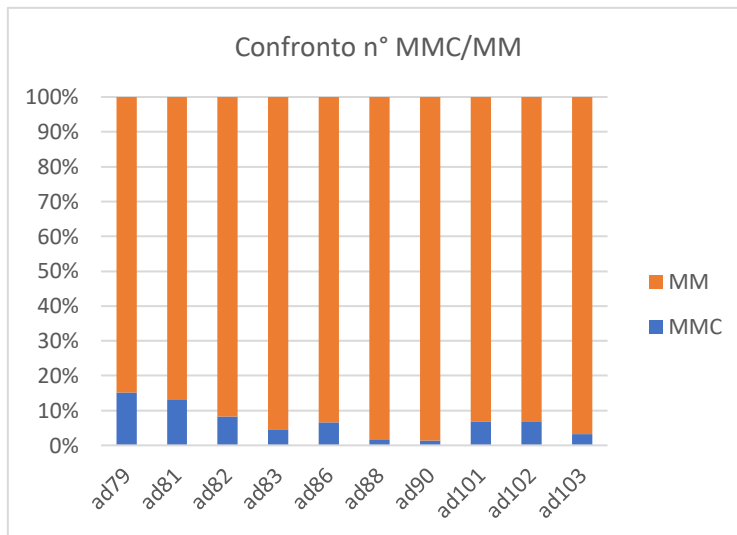


Figura 8- Grafico confronto numero MMC/MM Ionio

La quantificazione dei melanomacrofagi negli individui pescati in Sardegna mostra delle differenze tra gli individui, sia per quanto riguarda i MMs che i MMCs (figura 9).

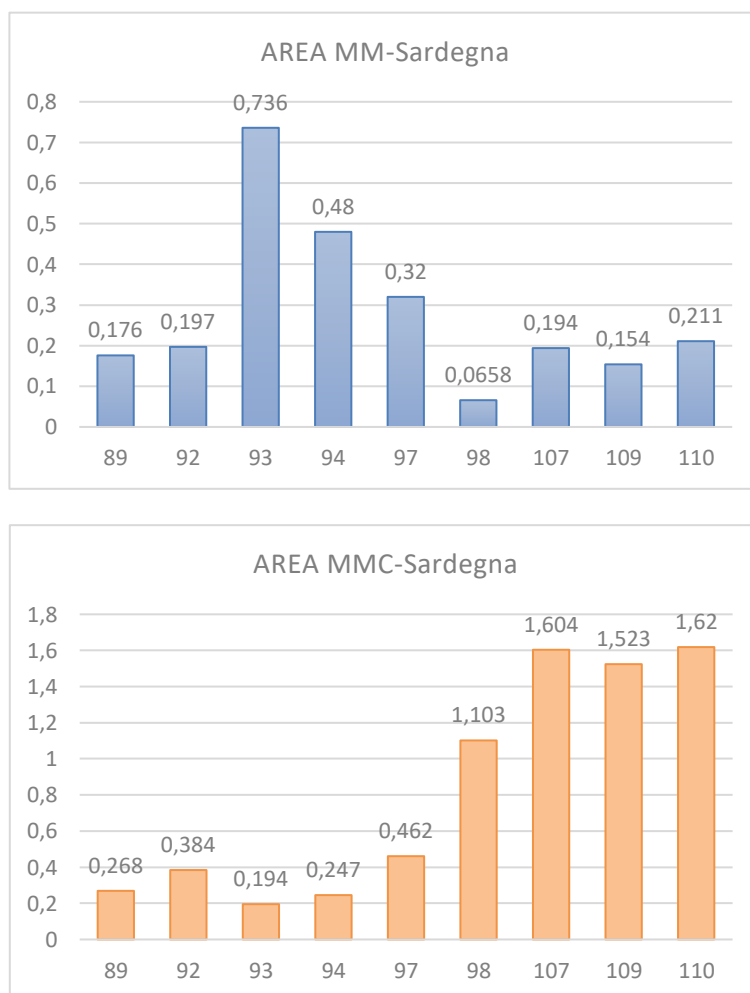


Figura 9 - Grafici area MMs e MMCs Sardegna

Il confronto tra area occupata da MM e MMC in ciascun individuo non è omogeneo. Sono infatti presenti individui in cui l'area è occupata principalmente da MMs (es. ind. 93) mentre altri da MMCs (es. ind. 98) (Figura 10).

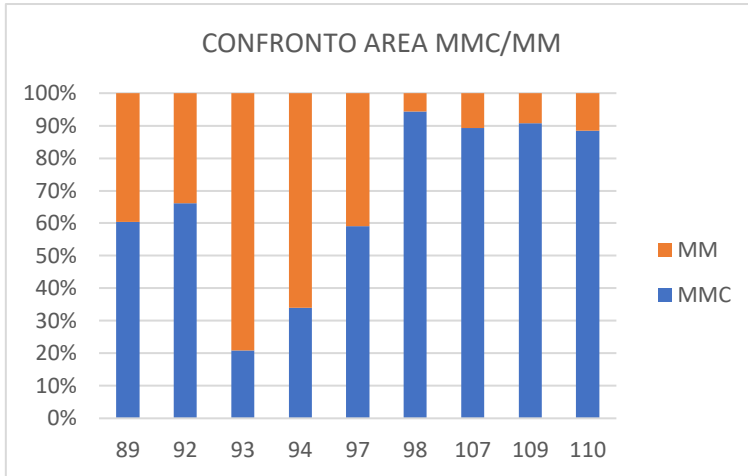


Figura 10 – Grafico confronto area MMC/MM Sardegna

La conta dei centri di melanomacrofagi mostra dei risultati stabili tra gli organismi della Sardegna. Per quanto riguarda i singoli invece è presente un solo individuo che si discosta dalla media (ind. 94) (Figura 11).

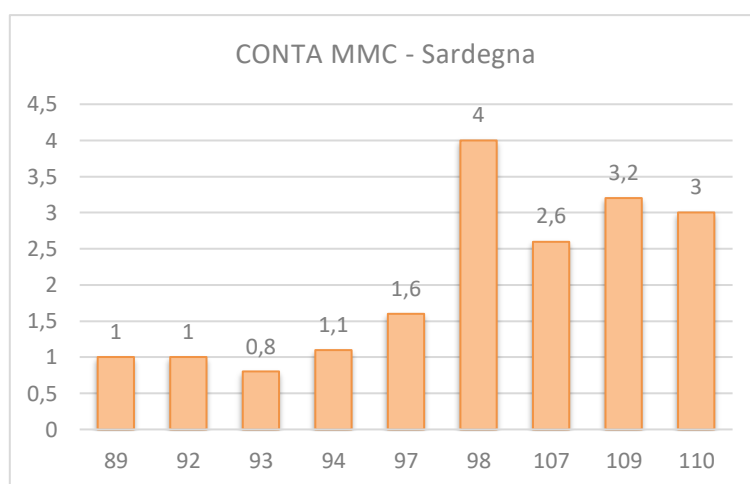
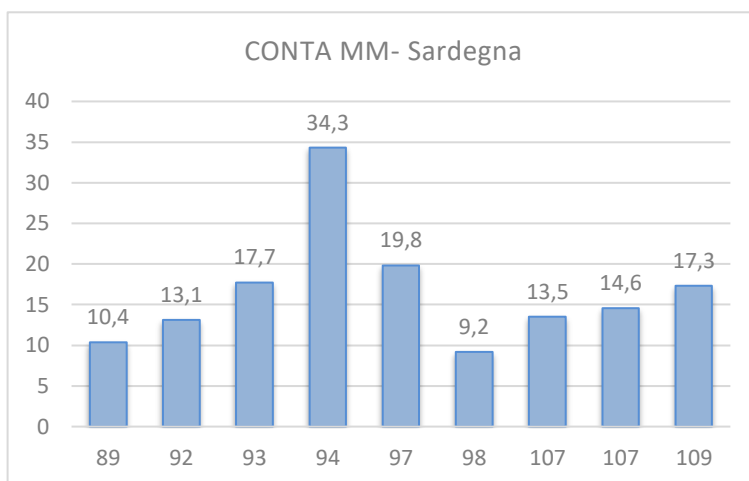


Figura 11 - Grafici conta MMs e MMCs Sardegna

Il confronto tra il numero di MMs e MMCs in ciascuno individuo mostra invece un trend stabile per tutti gli organismi pescati in quest'area, con una netta maggioranza di melanomacrofagi singoli (Figura 12).

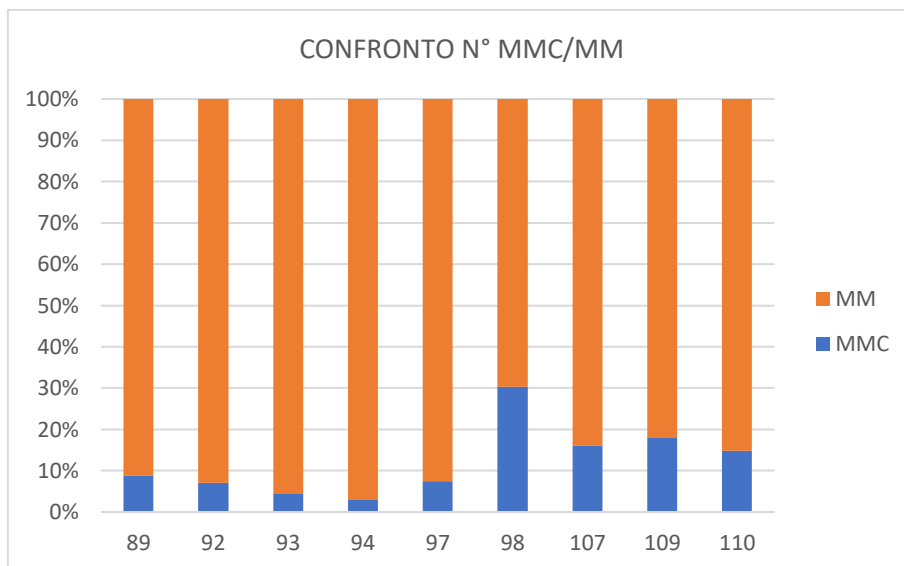


Figura 12- Grafico confronto numero MMC/MM Sardegna

Per quanto riguarda gli individui pescati in Spagna c'è una forte stabilità nell'andamento dell'area dei melanomacrofagi singoli, sono presenti invece delle piccole differenze in riferimento all'area dei centri tra i diversi individui (Figura 13).

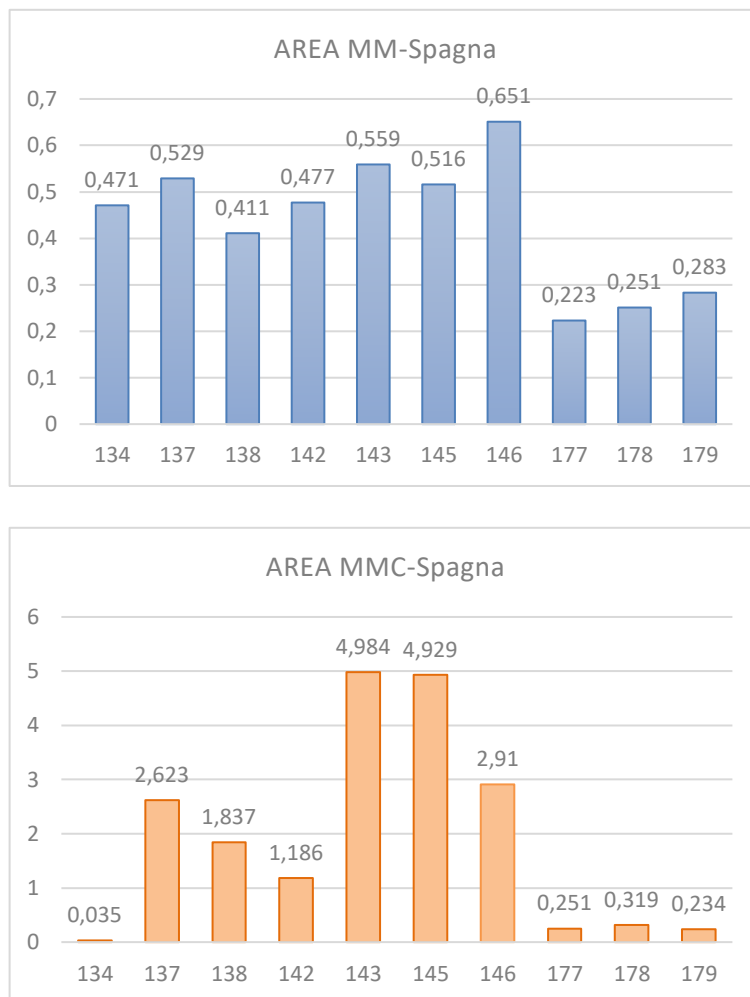


Figura 13 - Grafici area MMs e MMCs Spagna

La maggior parte dell'area dei melanomacrofagi è occupata da MMs in quasi tutti gli individui ad eccezione del 134 (Figura 14).

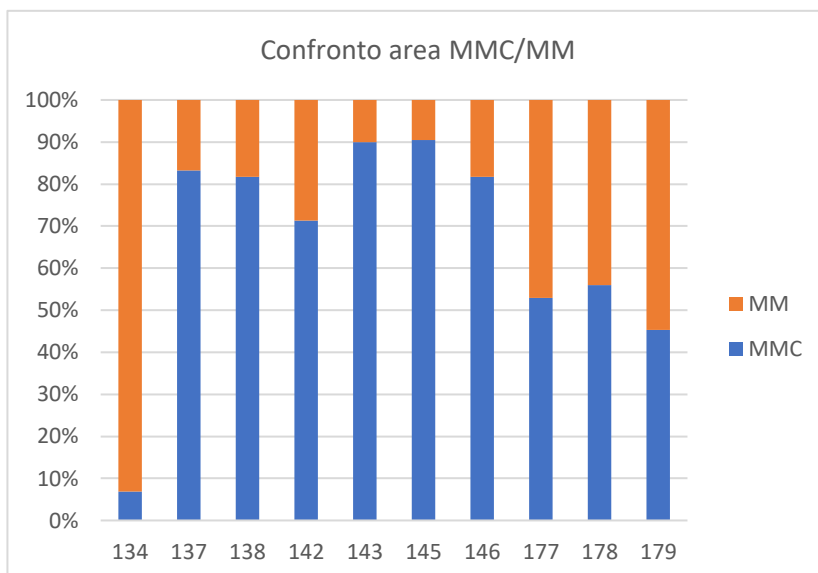


Figura 14 - Grafico confronto area MMC/MM Spagna

Sono state individuate piccole differenze tra ciascun individuo per quanto riguarda la conta dei centri di melanomacrofagi. Invece il numero dei melanomacrofagi singoli ha un andamento stabile, eccezion fatta per un individuo (146) che presenta un alto quantitativo (Figura 15).

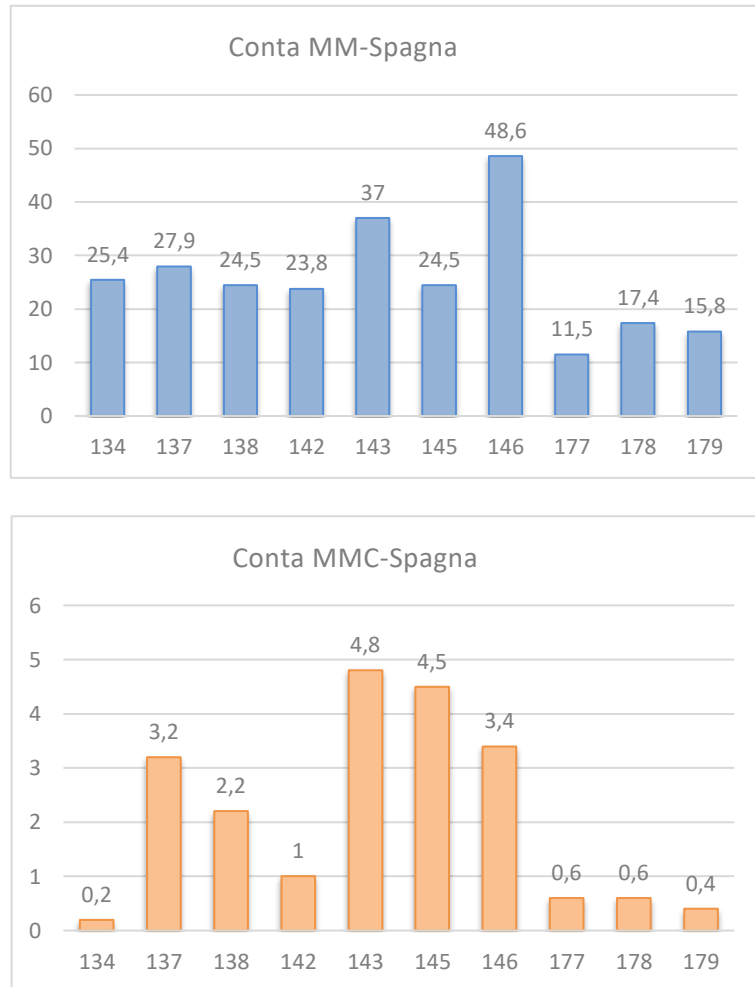


Figura 15 - Grafici confronto numero MMs e MMCs Spagna

Riferendoci al confronto dell'area occupata dai melanomacrofagi in ciascun individuo è stato osservato un andamento stabile, senza differenze rilevanti tra le sezioni (Figura 16).

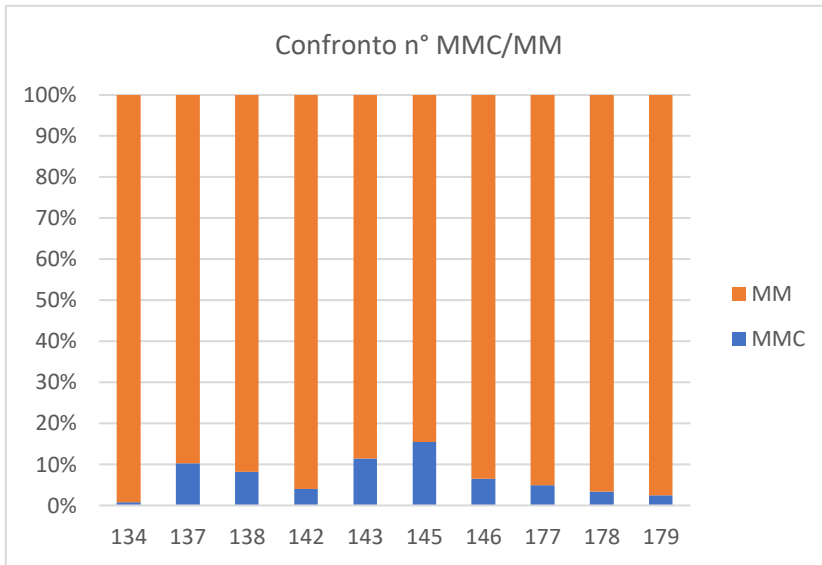


Figura 16 - Grafico confronto numero MMs e MMCs Spagna

L'analisi dell'area dei melanomacrofagi singoli nella zona della Sicilia mostra una forte stabilità nell'andamento, mentre per quanto riguarda l'area dei centri è presente un individuo (ma3) che si discosta dai valori medi riferiti agli altri individui (Figura 17).

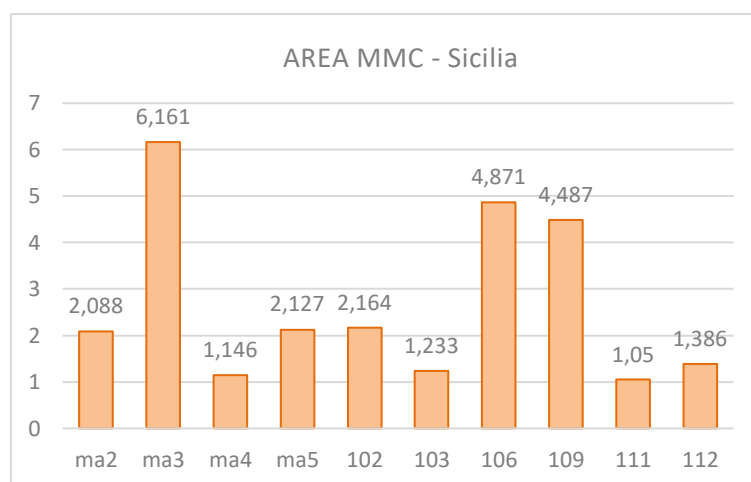
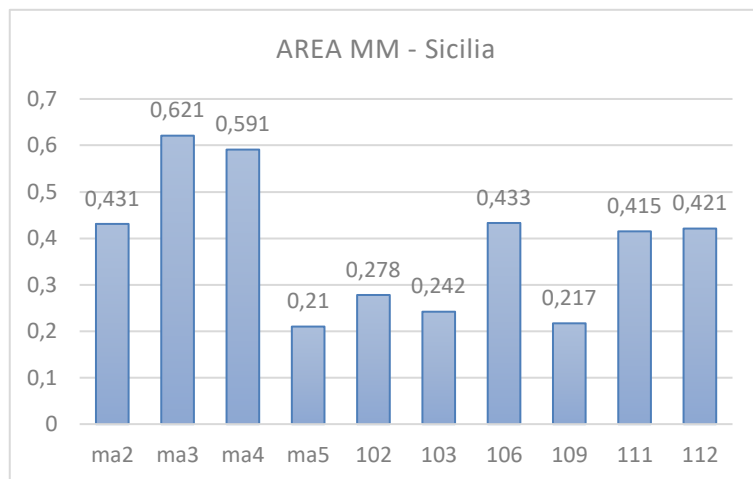


Figura 17 – Grafici area MMs e MMCs Sicilia

Il confronto tra area di MMs e MMCs mostra che l'area è principalmente occupata da MMCs in tutti gli individui (Figura 18).

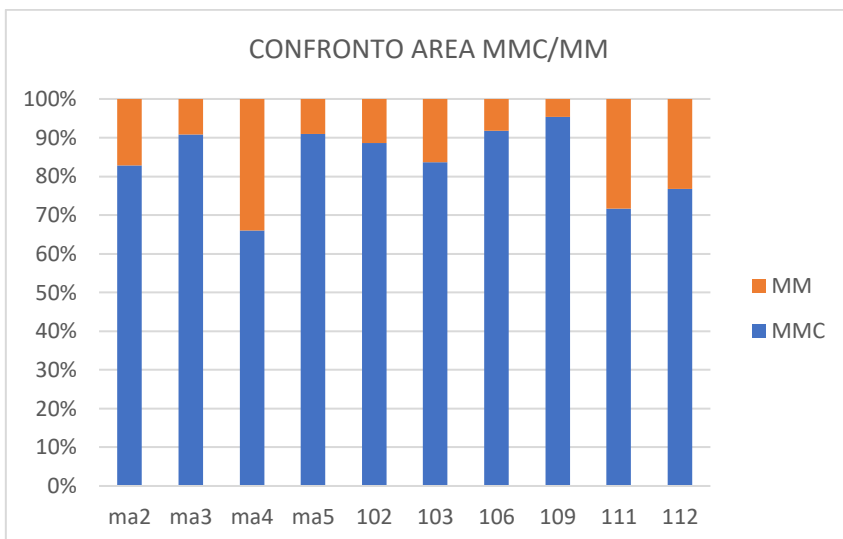


Figura 18- Grafico confronto area MMC/MM Sicilia

Il numero di MMs è molto variabile tra gli organismi. È presente un numero di melanomacrofagi singoli molto superiore nell'individuo ma3 rispetto a tutti gli altri (Figura 19).

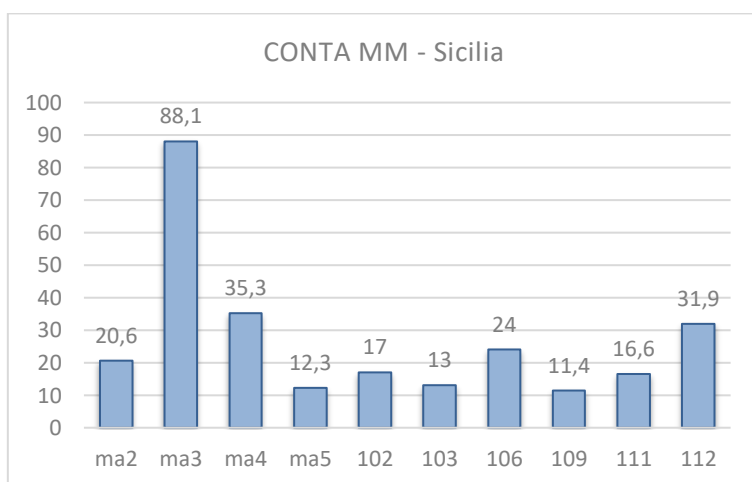


Figura 19 - Grafico conta MMs Sicilia

In riferimento alla conta dei melanomacrofagi si può notare come il numero di MMC sia coerente tra tutti gli individui (Figura 20).

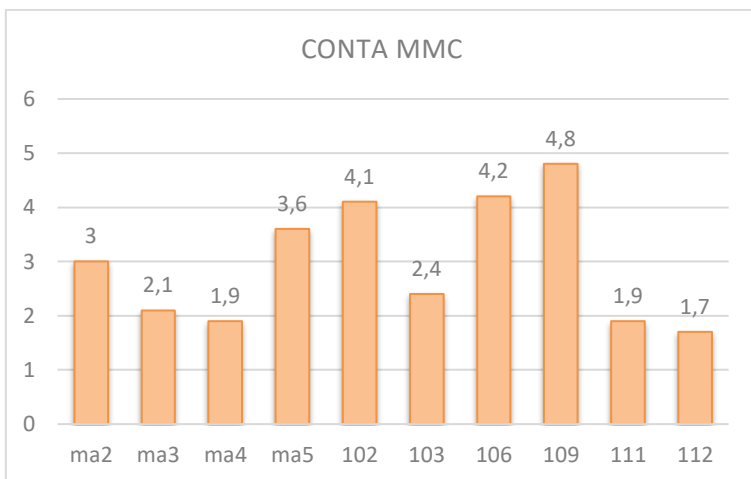


Figura 20 - Grafico conta MMCs Sicilia

La maggior parte dell'area dei melanomacrofagi totali è occupata da melanomacrofagi singoli in tutti gli individui (Figura 21). Alcuni, tra cui ma3, presentano la quasi totalità del numero di melanomacrofagi sotto forma di MMs.

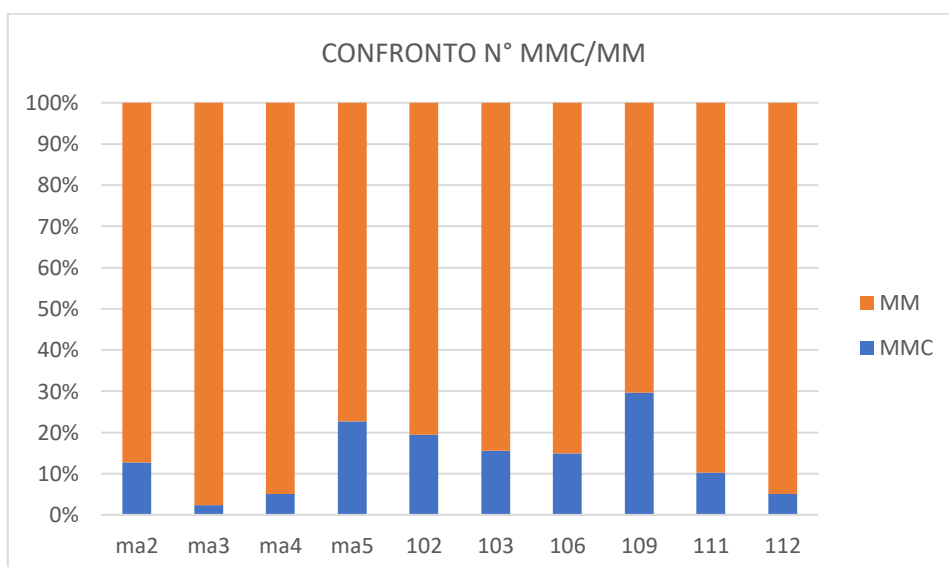


Figura 21 – Confronto numero MMs e MMCs Sicilia

In questo studio, è stato utilizzato il test statistico ANOVA per valutare le differenze tra i vari siti di pesca.

Nei grafici che verranno riportati in seguito è stata presa in considerazione l'area occupata dai singoli melanomacrofagi, dai centri e l'area totale (MMs+MMCs).

L'analisi dell'area dei MMs non mostra significatività statistica tra le diverse zone di pesca (Figura 22).

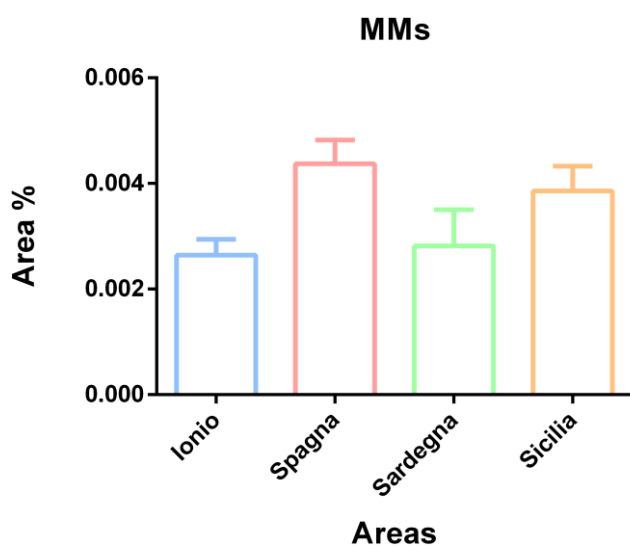


Figura 22 – Grafico area % MMs nelle diverse zone di pesca

Sia per le aree dei centri che per le aree totali è stata dimostrata significatività tra Sardegna e Sicilia, e una ancora maggiore significatività tra Ionio e Sicilia (Figura 23).

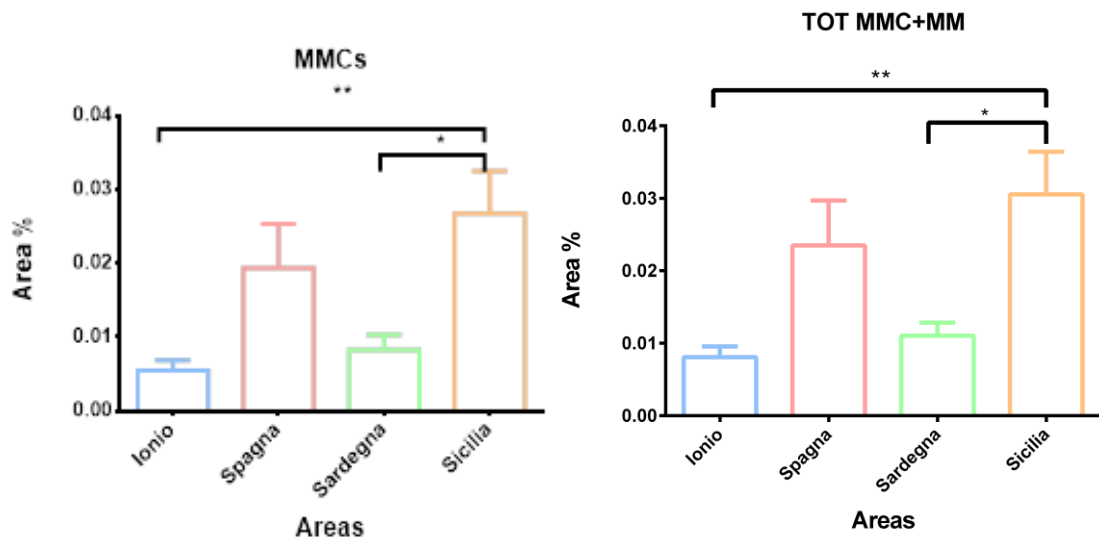


Figura 23 – Grafici area % MMCs (a sinistra) e totale (a destra) nelle diverse zone di pesca

In questi grafici è stata analizzata la conta dei singoli melanomacrofagi, dei centri e la conta totale (MMs+MMCs).

Non c'è significatività per quanto riguarda la conta dei MM e la conta TOT (Figura 24).

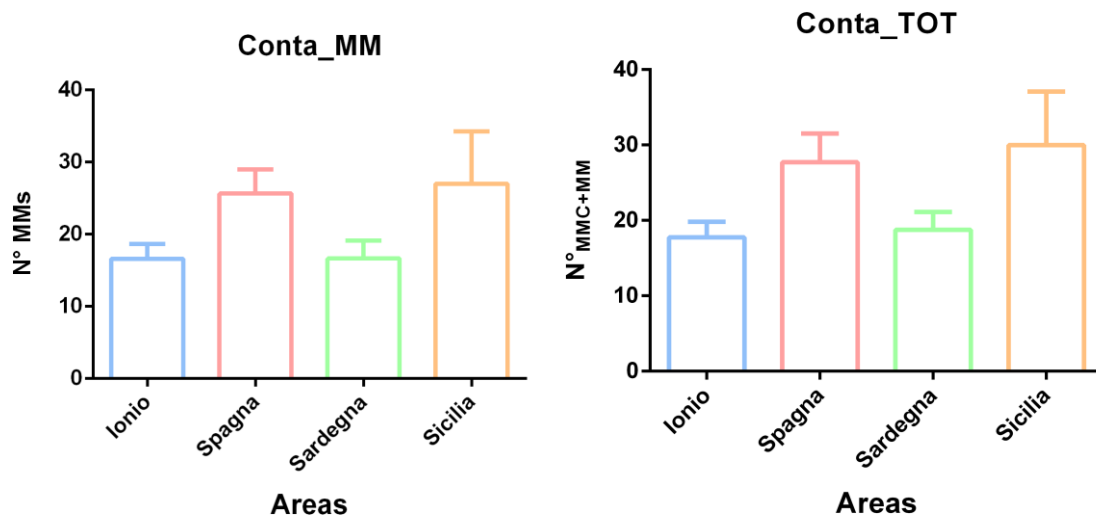


Figura 24 – Grafici conta MMs (a sinistra) e totale (a destra) nelle diverse zone di pesca

La conta dei MMC invece mostra significatività statistica tra Ionio e Sicilia, come era già stato osservato anche per l'area (Figura 25).

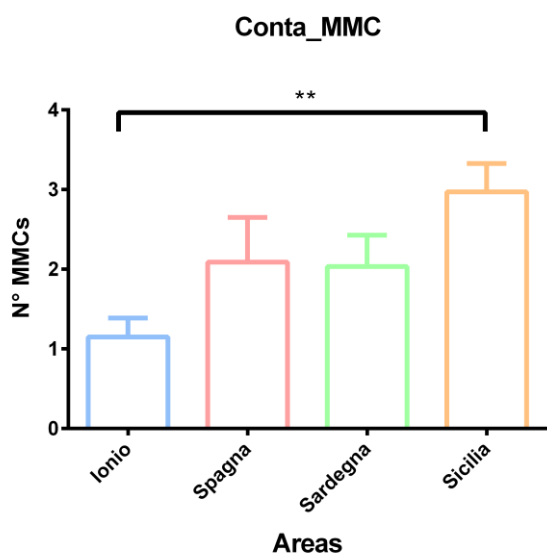


Figura 25 – Grafico conta MMCs nelle diverse zone di pesca

Dopo aver valutato la distribuzione e la concentrazione di melanomacrofagi sulla base delle zone di pesca, è stato svolto un test di correlazione tra l'area

degli MMs e MMCs, e la loro conta, con altri parametri biometrici quali peso e lunghezza degli animali stessi

Nella Tabella 1 vengono riportati tutti i valori del p-value e del coefficiente di correlazione tra tutte le coppie di parametri che sono stati considerati per l'analisi svolta.

Tabella 1 – Valori p-value (in alto) e coefficienti di correlazione (in basso)

p-values								
	peso	lunghezza	area_mmc	area_mm	area_tot	n_mmc	n_mm	n_tot
peso	NA	0,0000	0,0100	0,7170	0,0076	0,0092	0,7388	0,8529
lunghezza	0 NA		0,0069	0,8635	0,0082	0,0038	0,6329	0,9038
area_mmc	0,0100	0,0069	NA	0,0107	0,0000	0,0000	0,0332	0,0019
area_mm	0,7170	0,8635	0,0107	NA	0,0009	0,2416	0,0000	0,0000
area_tot	0,0076	0,0082	0,0000	0,0009	NA	0,0000	0,0027	0,0000
n_mmc	0,0092	0,0038	0,0000	0,2416	0,0000	NA	0,3881	0,0567
n_mm	0,7388	0,6329	0,0332	0,0000	0,0027	0,3881	NA	0,0000
n_tot	0,8529	0,9038	0,0019	0,0000	0,0000	0,0567	0,0000	NA
Coefficienti di correlazione								
	peso	lunghezza	area_mmc	area_mm	area_tot	n_mmc	n_mm	n_tot
peso	1,0000	0,9582	0,4075	0,0599	0,4208	0,4117	-0,0551	0,0307
lunghezza	0,9582	1,0000	0,4255	0,0285	0,4173	0,4523	-0,0789	0,0200
area_mmc	0,4075	0,4255	1,0000	0,4043	0,9648	0,8809	0,3419	0,4819
area_mm	0,0599	0,0285	0,4043	1,0000	0,5093	0,1920	0,8845	0,8852
area_tot	0,4208	0,4173	0,9648	0,5093	1,0000	0,8480	0,4676	0,6061
n_mmc	0,4117	0,4523	0,8809	0,1920	0,8480	1,0000	0,1421	0,3077
n_mm	-0,0551	-0,0789	0,3419	0,8845	0,4676	0,1421	1,0000	0,9748
n_tot	0,0307	0,0200	0,4819	0,8852	0,6061	0,3077	0,9748	1,0000

Nel grafico in Figura 26 viene rappresentata la correlazione significativa tra l'area dei centri di melanomacrofagi con il peso degli individui analizzati.

All'aumentare del peso aumenta anche l'area dei MMC (Figura 26).

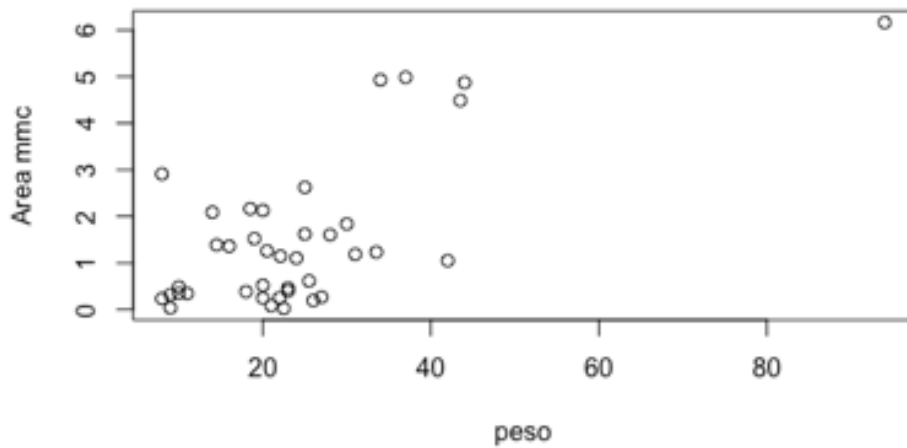


Figura 26 – Grafico area MMCs in correlazione al peso

In questo secondo grafico viene analizzata la stessa relazione ma escludendo l'individuo ma3 della Sicilia, che viene considerato outlier a causa delle dimensioni molto maggiori rispetto agli altri (Figura 27).

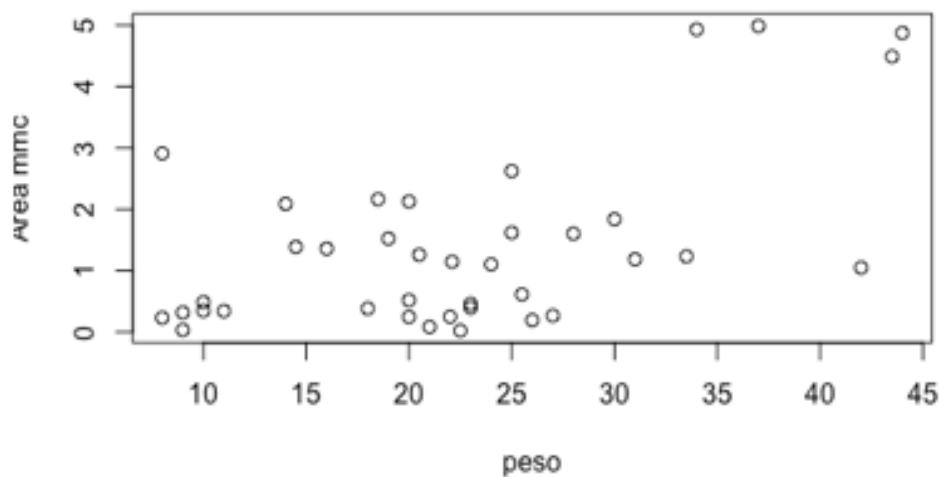


Figura 27 – Grafico area MMCs in correlazione al peso (escluso ma3)

Viene preso poi in considerazione il numero dei melanomacrofagi singoli in relazione al peso dell'animale.

Il valore del p-value è di 0,7388, quindi non c'è significatività tra i due parametri messi in relazione (Figura 28).

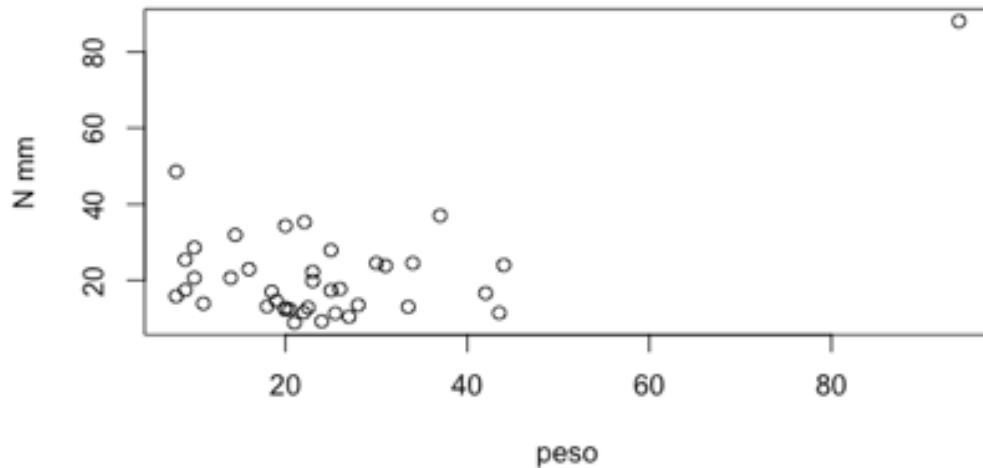


Figura 28 – Grafico numero MMs in correlazione al peso

Escludendo l'individuo ma3 il valore del p-value è leggermente più basso ma comunque non significativo.

In questo grafico viene messo in relazione il numero di centri di melanomacrofagi con il peso.

Il valore del p-value è di 0,0092, quindi molto significativo a livello statistico.

C'è una forte correlazione tra peso e il numero dei MMC (Figura 29).

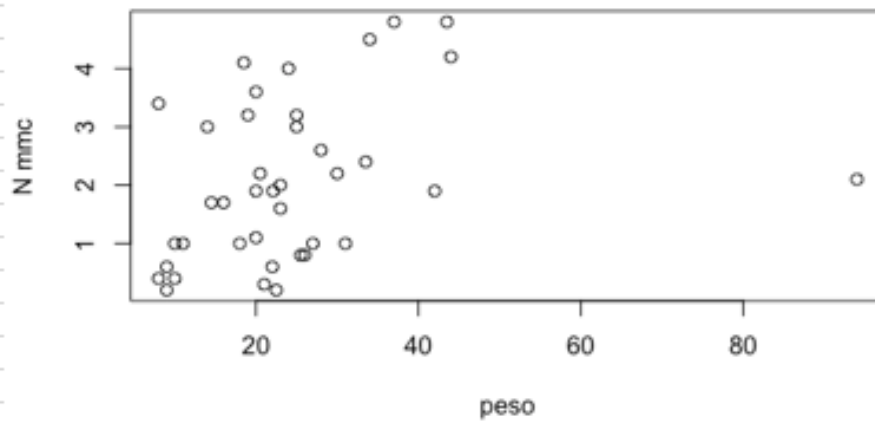


Figura 29 – Grafico numero MMCs in correlazione al peso

Escludendo ma3 il valore del p-value è di 0,0091, ugualmente significativo statisticamente (Figura 30).

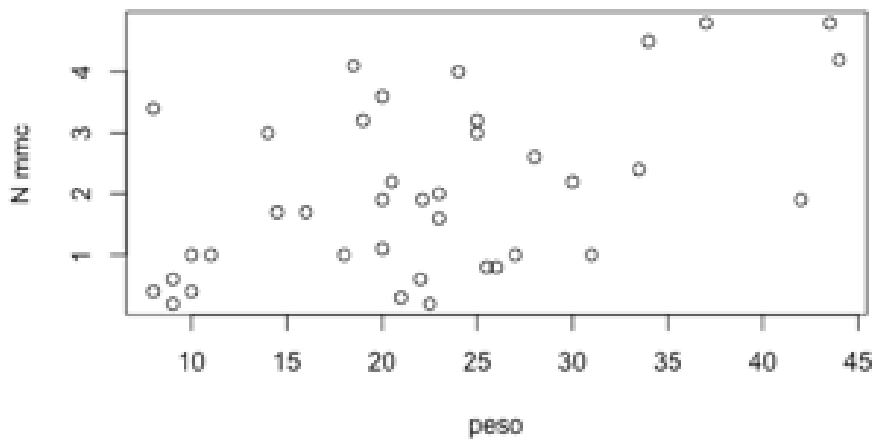


Figura 30 – Grafico numero MMCs in correlazione al peso (escluso ma3)

Infine, i dati di quantificazione dei melanomacrofagi sono stati messi in correlazione con il mese in cui gli organismi analizzati sono stati pescati. Cambiamenti significativi sono stati riscontrati per l'area dei MMCs e non per

i MM, mentre al contrario focalizzando sulla conta, cambiamenti significativi sono stati riscontrati per il numero dei MMs e non per i MMCs. Per entrambi i parametri (area MMCs e numero MMs) è stato evidenziato un andamento crescente nei primi tre mesi con un picco ad agosto seguito da una drastica diminuzione nel mese di settembre.

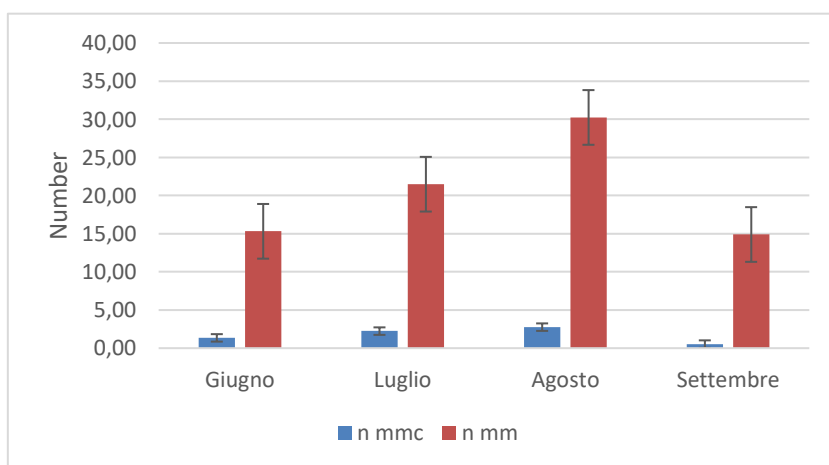
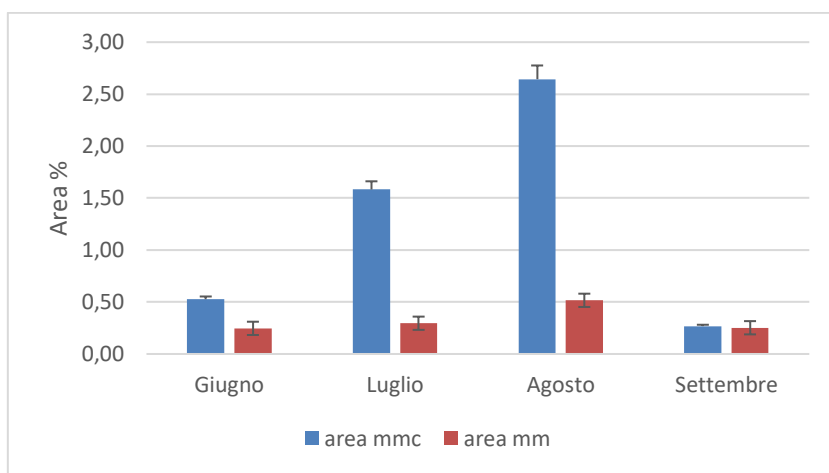


Figura 31 – Grafico area % melanomacrofagi in relazione al mese di pesca (in alto); grafico numero melanomacrofagi in relazione al mese di pesca (in basso)

Per quanto riguarda i lipidi è stata svolta un'analisi e una quantificazione della percentuale totale di lipidi presenti in ciascuna sezione di ciascuno dei 10 organismi pescati nelle 4 zone di pesca.

La percentuale totale dei lipidi negli individui del Mar Ionio è variabile, con valori che cambiano da 14,925% nell'individuo ad82 all'1,084% di ad90 (Figura 32).

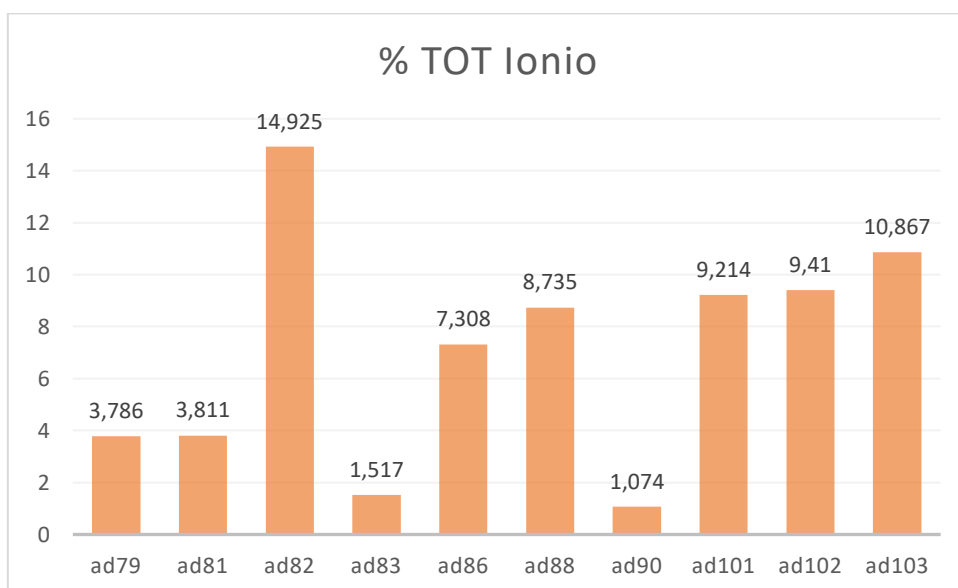


Figura 32 – Grafico % totale di lipidi Ionio

A differenza del Mar Ionio, gli individui provenienti dalla Sardegna mostrano valori della quantità di lipidi meno variabili e più omogenei tra di loro (Figura 33).

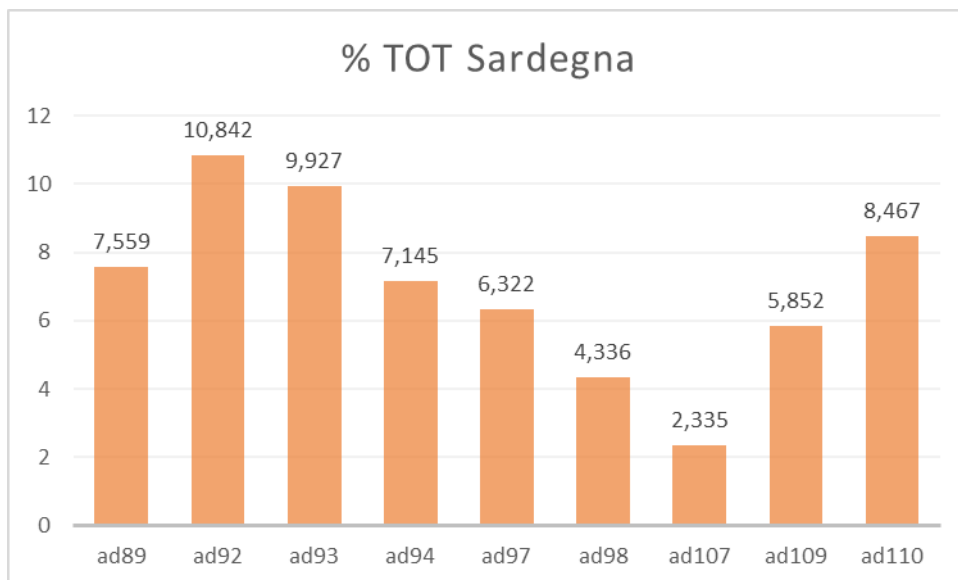


Figura 33 – Grafico % totale lipidi Sardegna

La Spagna presenta una netta distinzione nei valori di 3 individui rispetto agli altri. Gli individui 177, 178 e 179 mostrano infatti delle percentuali molto più alte rispetto agli altri organismi (Figura 34).

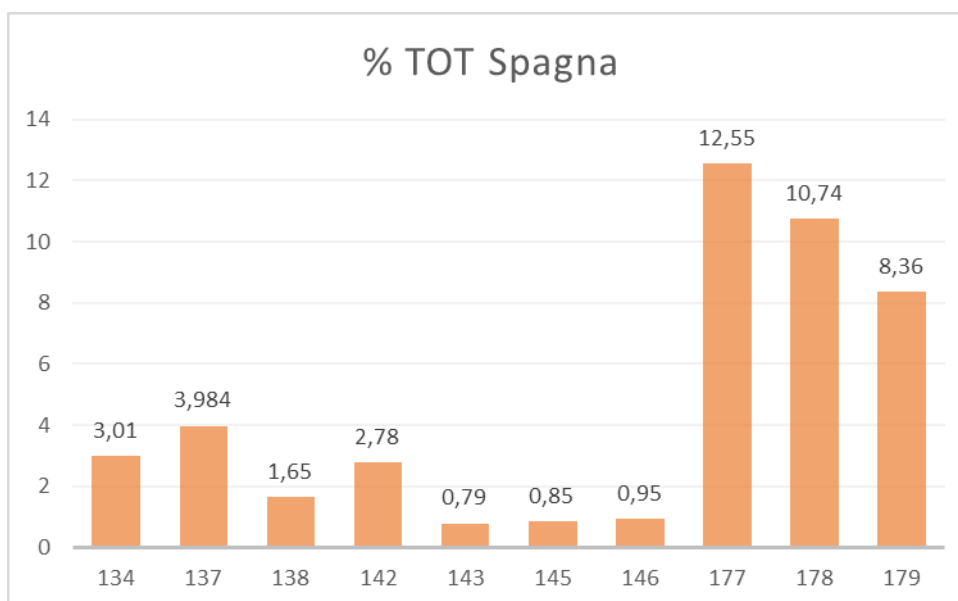


Figura 34 – Grafico % totale lipidi Spagna

L'area di pesca della Sicilia è stata divisa in nord e sud, dal momento in cui gli individui pescati a nord mostravano delle notevoli differenze rispetto a quelli del sud.

Sono state fatte analisi per comprendere se ci fossero effettivamente delle differenze significative.

Considerando la Sicilia invece dal grafico con le percentuali si nota chiaramente la differenza tra gli individui della Sicilia Sud e della Sicilia Nord. Gli individui ma2, 3, 4 e 5 infatti presentano una % di lipidi molto alta rispetto agli altri appartenenti alla zona sud (Figura 35).

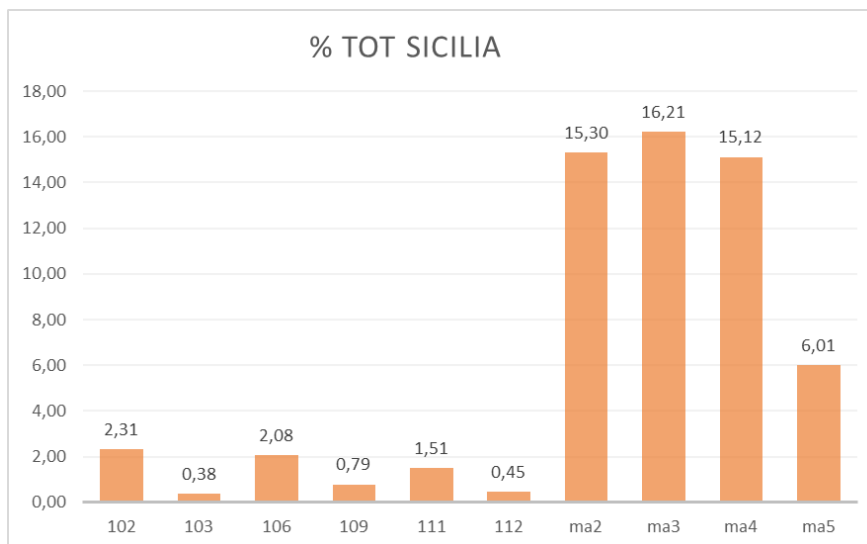


Figura 35 – Grafico % totale lipidi Sicilia 31

Successivamente, è stata analizzata l'area totale di lipidi nelle quattro zone di pesca, la quale non evidenzia differenze statisticamente significative.

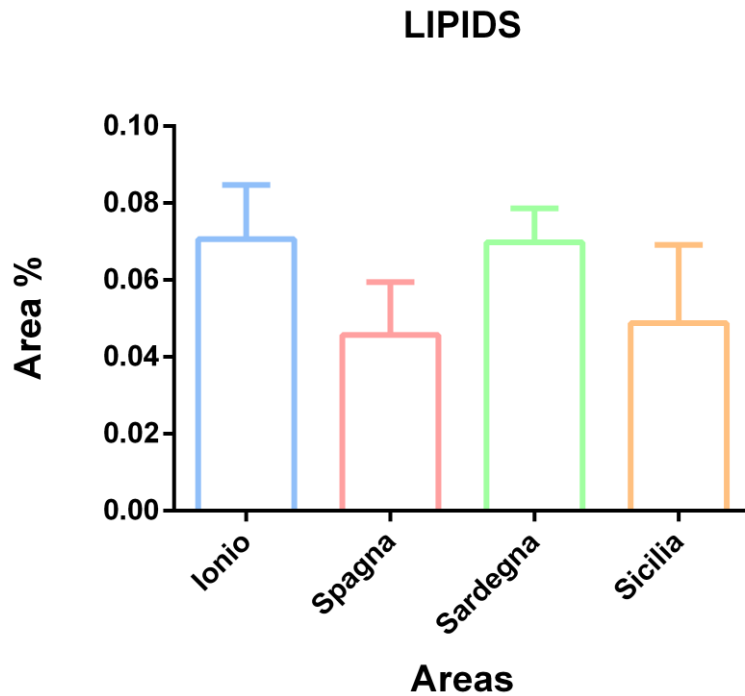


Figura 36 – Grafico area % totale di lipidi nelle diverse zone di pesca

Viste le differenze tra i campioni pescati in Sicilia è stata divisa in Nord e Sud. Dividendo così la Sicilia, sono state apprezzate delle differenze statisticamente significative: Ionio – Sicilia sud, Spagna – Sicilia nord, Sardegna – Sicilia sud e Sicilia sud – Sicilia nord (Figura 37).

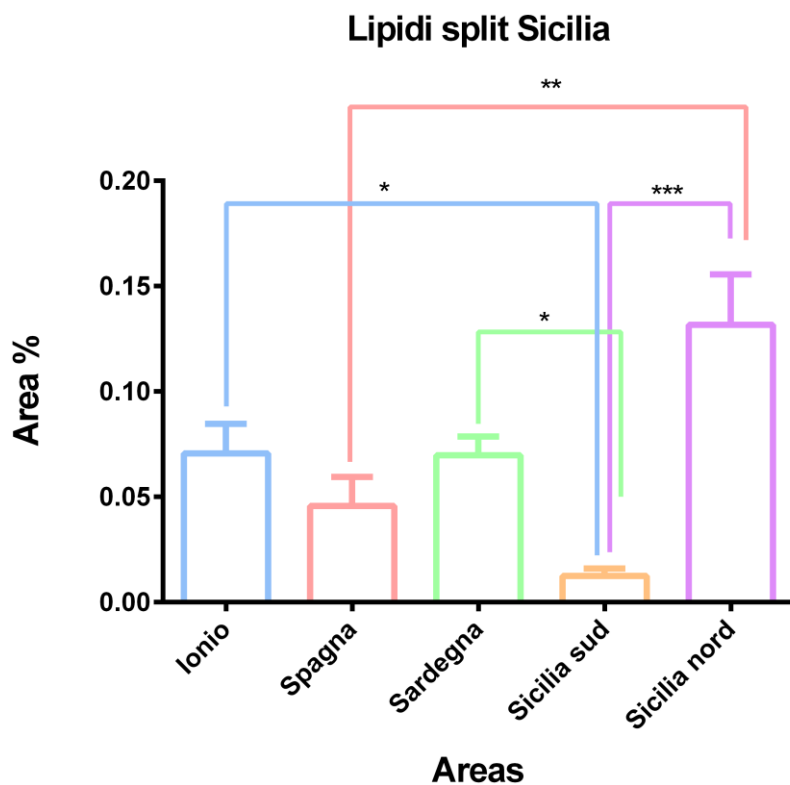


Figura 37 – Grafico area % totale di lipidi nelle diverse zone di pesca (Sicilia divisa in Nord e Sud)

Per quanto riguarda i test di correlazione, sono stati messi in correlazione l'area dei lipidi con lunghezza e peso.

In Tabella 2 sono mostrati tutti i valori di p-value e coefficiente di correlazione per le coppie di parametri analizzate.

coefficienti di correlazione			
	peso	lunghezza	area_tot_lipidi
peso	1,0000	0,9600	0,0300
lunghezza	0,9600	1,0000	0,0300
area_tot_lipidi	0,0300	0,0300	1,0000
p-values			
	peso	lunghezza	area_tot_lipidi
peso		0	0,8399
lunghezza	0		0,8481
area_tot_lipidi	0,8399	0,8481	

Tabella 2 – Valori coefficienti di correlazione (in alto) e p-values (in basso)

Tra l'area totale dei lipidi e il peso degli organismi non è stata evidenziata una correlazione significativa. (Figura 38).

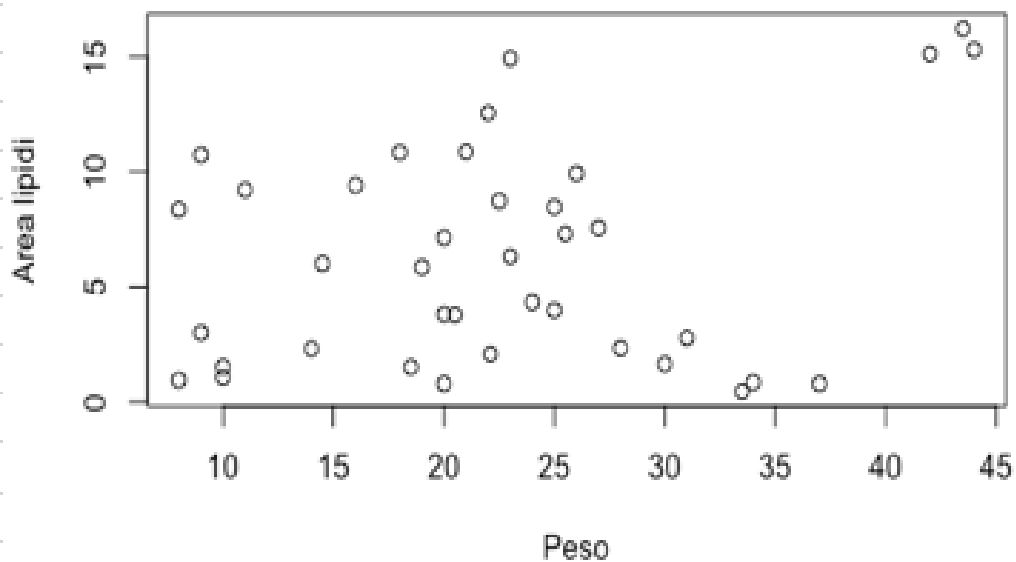


Figura 38

Infine, l'area totale occupata dai lipidi nei diversi campioni è stata messa in correlazione con il mese in cui sono stati pescati, mostrando una correlazione significativa tra agosto e settembre (Figura 39).

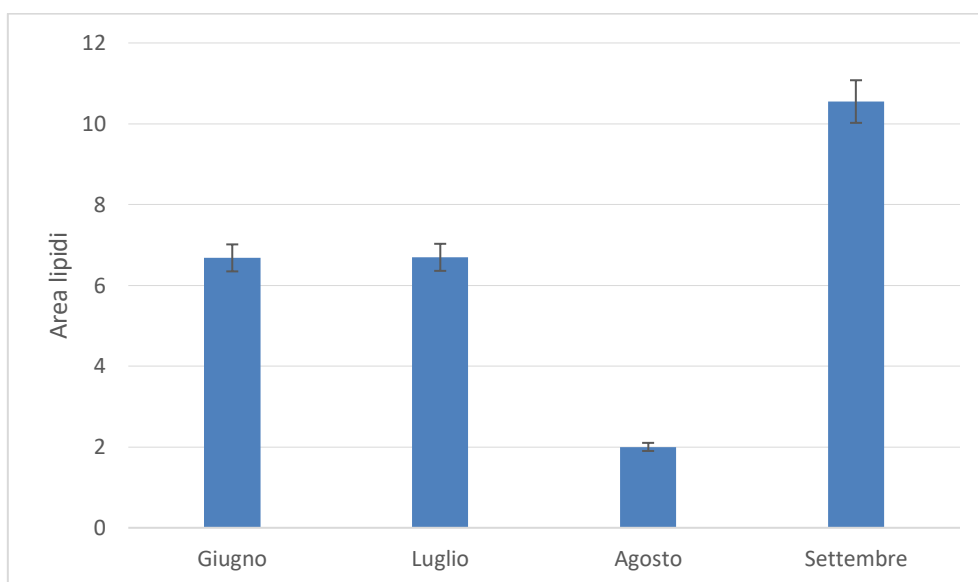


Figura 39 – Grafico area totale lipidi in relazione al mese di pesca

4. DISCUSSIONI

Xiphias gladius è una specie ittica considerata di alto interesse commerciale ed attualmente soggetta ad overfishing nel Mediterraneo.

La conservazione degli stocks ittici di pesce spada ha indotto l'ICCAT ad attuare, nel 2016, un piano di gestione della pesca di questa specie in Mediterraneo.

Questo studio è volto a caratterizzare e quantificare l'incidenza della presenza di melanomacrofagi e la quantità di contenuto lipidico nel fegato di maschi campionati in 4 aree di pesca del Mediterraneo: Mar Ionio, Sardegna, Sicilia e Spagna.

Dalla quantificazione dei melanomacrofagi, sia essi MMs sia MMCs, sono emerse delle differenze significative tra questi quattro gruppi sperimentali.

In particolare, gli animali pescati nelle zone dello Ionio e della Sardegna mostrano un'area occupata da MMCs minore rispetto alle altre aree, mentre il numero dei centri di melanomacrofagi resta costante nelle quattro diverse zone analizzate. Questo potrebbe dipendere dalle condizioni di stress degli animali pescati, dalla loro lunghezza e quindi dalla loro età.

Un risultato analogo è stato descritto da Basilone et al., (2018) in cui vengono analizzati i centri di melanomacrofagi nel fegato di *Engraulis encrasicolus*

pescati in diverse aree, sia inquinate che aree marine protette. In questo studio è stato riscontrato un aumento nell'area e nel numero di MMCs negli esemplari pescati in aree sottoposte a maggiori concentrazioni di inquinanti derivanti dall'agricoltura e prodotti industriali. Al contrario, gli individui pescati in aree di riserva marina mostrano invece un numero minore di MMCs, meno contaminate dalle attività umane.

Un aumento di MMCs è stato inoltre riscontrato in esemplari di *Thunnus thynnus* sottoposti a diverse concentrazioni di inquinanti organici persistenti e metalli pesanti, come i PCBs (Polychlorinated biphenyls) (Corriero et al., 2013).

L'aggregazione di MMs a formare MMCs potrebbe dipendere dal perdurare di una condizione di forte stress, incrementando le dimensioni di questi centri ed a formarne di nuovi.

I centri di melanomacrofagi sono stati spesso osservati in *Thunnus thynnus*, ma anche in altre specie, nelle vicinanze dei vasi sanguigni e sono implicati nel riciclo dei composti del ferro e degli eritrociti danneggiati. Per questo, in presenza di inquinamento ambientale, viene riscontrata un'augmentata attività di fagocitosi ed un conseguente aumento di MMCs (Passantino et al., 2014).

I centri di melanomacrofagi possono essere quindi utilizzati come biomarkers dell'esposizione degli individui a particolari tipologie di inquinanti ambientali.

Lo studio di Sayed et al., (2019) ha rilevato un aumento di MMCs epatici in *Clarias gariepinus* sottoposto ad esposizione a distruttori endocrini e 4 NP (4-nonilfenolo), rispetto ai pesci tenuti in condizioni di controllo. Il 4 NP ha la capacità di indurre emolisi e distruzione dei tessuti che portano ad una aumentata fagocitosi da parte dei melanomacrofagi, che possono di conseguenza aumentare di numero e di volume.

Nel presente lavoro di tesi i test di correlazione evidenziano come gli MMCs, sia in termini di area coperta che di numero effettivo, aumentino con l'aumentare del peso e della lunghezza degli individui.

Un analogo risultato è stato evidenziato in fegato di *Myoxocephalus scorpius* (Dang et al., nel 2019).

Organismi di peso e lunghezza maggiore, corrispondono anche ad organismi più vecchi, per cui il più alto numero di MMCs potrebbe dipendere da processi legati all'aging o da una esposizione prolungata ad agenti stressanti.

Nello studio di Passantino et al. (2014) è stato riscontrato un aumento dell'area di MMCs nel fegato di esemplari di *Thunnus thynnus* in relazione alla lunghezza degli esemplari. In questo lavoro di tesi non è stata evidenziata

nessuna correlazione positiva tra area e numero di melanomacrofagi singoli con peso e lunghezza degli organismi. Il loro numero è inoltre molto simile nelle diverse aree di pesca, sono leggermente più bassi ma non in maniera significativa, soltanto nelle aree dello Ionio e della Sardegna.

Infine, considerando la relazione tra area totale dei melanomacrofagi (MMC+MM) con il mese in cui gli organismi sono stati pescati è stato evidenziato un trend in aumento dell'area totale dal mese di giugno con un picco massimo nel mese agosto, diminuendo poi drasticamente a settembre.

lo stesso andamento è stato riscontrato anche per il numero dei melanomacrofagi singoli.

Questo potrebbe essere determinato dal fatto che luglio e agosto sono i mesi in cui avviene un picco nell'intensità di spawning. Le energie degli individui vengono perciò concentrate ed utilizzate per portare a termine questo processo, per cui sono più suscettibili agli stress e di conseguenza aumenta il numero di melanomacrofagi.

In molti studi questo aumento viene riscontrato esclusivamente negli individui di sesso femminile e non nei maschi.

Ad esempio, nell'analisi svolta da Passantino et al. (2019) sono stati quantificati i MMCs nel fegato di *Seriola dumerili* e sono state riscontrate delle

differenze tra maschi e femmine allevati in cattività. Le femmine mostrano infatti un aumento nel numero e nell'area di MMCs dalla gametogenesi fino allo spawning, mentre negli individui maschi questo non viene rilevato. È stato quindi ipotizzato che le femmine subiscano un aumento di MMCs anche in seguito ad atresia follicolare in cui il fegato viene sovraccaricato di prodotti relativi al metabolismo di questo processo e ad un riassorbimento del tuorlo.

Per quanto riguarda l'analisi dei lipidi nelle diverse zone di pesca è stata osservata una maggior variabilità nell'area siciliana rispetto alle altre, ma non ci sono differenze significative.

Avendo notato delle differenze nel contenuto lipidico tra gli individui pescati in Sicilia, questa zona è stata divisa tra nord e sud, 4 individui pescati a nord e 6 a sud, per valutare se le differenze osservate dipendano dalla diversa zona di pesca.

La percentuale totale di area coperta da lipidi è nettamente superiore nell'area nord rispetto all'area sud della Sicilia.

I risultati mostrano un andamento di immagazzinamento relativo all'inizio del periodo riproduttivo (giugno – luglio), con un drastico abbassamento del contenuto lipidico nel mese di agosto. Fine agosto e inizio settembre indicano

il termine degli eventi riproduttivi, osserviamo perciò una minima quantità di lipidi perché essi sono stati tutti consumati per portare a termine lo spawning.

Nel mese di settembre il contenuto lipidico è maggiore nei diversi organismi rispetto ai mesi precedenti. Questo nuovo aumento potrebbe essere determinato dal fatto che gli organismi hanno ripreso a nutrirsi dopo aver esaurito le loro riserve lipidiche. Questo andamento riflette la necessità del pesce spada di avere una maggior quantità possibile di lipidi a disposizione sia prima dello spawning sia durante.

In questo studio si evince che la quantità dei lipidi non varia a seconda delle zone di pesca ma solo a seconda del periodo in cui gli organismi sono stati pescati.

Un risultato analogo è stato dimostrato nello studio di Huynh et al. (2007), in cui viene quantificato il contenuto lipidico in esemplari di *Clupea harengus pallasi* sia nel periodo riproduttivo che non riproduttivo. Il quantitativo di lipidi presente negli individui in periodo di spawning è significativamente inferiore in tutti i tessuti ed organi rispetto all'altro gruppo analizzato.

Zudaire et al. (2014) hanno invece confrontato il contenuto lipidico nel fegato di individui di *Thunnus albacares* immaturi con quello di individui maturi. I risultati ottenuti mostrano un quantitativo di lipidi maggiore negli esemplari

immaturi. Questo potrebbe dipendere dal fatto che gli individui maturi, essendo andati incontro a riproduzione, hanno utilizzato le riserve lipidiche per la gametogenesi e lo spawning.

In conclusione, la positiva correlazione tra la quantità e la qualità di melanomacrofagi sia con le dimensioni dell'animale che con il sito di pesca dimostrano chiaramente che anche in questa specie gli MMC possono essere considerati indicatori dello stato di salute dell'organismo, di processi di aging e di presenza di stress cronici.

5. BIBLIOGRAFIA

Abascal, F.J., Mejuto, J., Quintans, M., Ramos-Cartelle, A., 2010. Horizontal and vertical movements of the swordfish in the Southeast Pacific. *ICES Journal of Marine Science*, Vol. 67 (3), 466-474

Agius, C., Roberts, R. J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, Vol. 26 (9), 499-509

Albo-Puigserver, M., Muñoz, A., Navarro, J., Coll, M., Pethybridge, H., Sánchez, S., Palomera, I., 2017. Ecological energetics of forage fish from the Mediterranean Sea: Seasonal dynamics and interspecific differences. *Deep Sea Research Part II*, Vol. 140, 74-84

Arocha, F., 2007. Swordfish Reproduction in the Atlantic Ocean: An Overview. *Gulf and Caribbean Research* Vol 19(2), 21–36

Basilone, G., Gargano, A., Corriero, A., Zupa, R., Santamaria, N., Mangano, S., Ferreri, R., Pulizzi, M., Mazzola, S., Bonanno, A., Passantino, L., 2018. Liver melanomacrophages centres and CYP1A expression as response biomarkers to environmental pollution in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) from the western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 131, 197-204.

Binod, K., Pokhrel, H., Aktar, H., 2019. Development of melano-macrophage centres (MMCs) in Indian major carps. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, Vol.7 (2), 745-747.

Canese, S., Romeo, T., Consoli, P., Greco, S., Andaloro, F., 2009. Swordfish (*Xiphias gladius*, Teleostea: Xiphiidae) surface behaviour during reproductive period in the central Mediterranean Sea (southern Tyrrhenian Sea). *Marine Biodiversity Records*, Vol. 2 (1).

Carey, F. G. 1982. A brain heater in the swordfish. *Science*, 216(4552), 1327-1329

Carey, F.G., Robison, B.H., 1981. Daily patterns in the activities of swordfish, *Xiphias gladius*, observed by acoustic telemetry. *Fishery Bulletin*, Vol. 79 (2), 277-385.

Corriero, A., Zupa, R., Pousis, C., Santamaria, N., Bello, G., Jirillo, E., Carrassi, M., De Giorgi, C., Passantino, L., 2013. Increased liver apoptosis and tumor necrosis factor expression in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) reared in the northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 71, 23-28.

Corsolini, S., Guerranti, C., Perra, G., & Focardi, S., 2008. Polybrominated diphenyl ethers, perfluorinated compounds and chlorinated pesticides in

swordfish (*Xiphias gladius*) from the Mediterranean Sea. *Environmental science & technology*, 42(12), 4344-4349.

Dang, M., Nowell, C., Nguyen, T., Bach, L., Sonne, C., Nørregaard, R., Stride, M., Nowak, B., 2019. Characterisation and 3D structure of melanomacrophage centers in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus Scorpius*). *Tissue and Cell*, Vol.57, 34-41.

De Metrio, G., Corriero, A., Desantis, S., Zubani, D., Cirillo, F., Deflorio, M., ... & Kime, D. E., 2003. Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L.). *Marine pollution bulletin*, 46(3), 358-361.

De Metrio, G., Ditrich, H., & Palmieri, G. 1997. Heat-producing organ of the swordfish (*Xiphias gladius*): A modified eye muscle. *Journal of morphology*, 234(1), 89-96.

Desantis, S., Corriero, A., Cirillo, F., Deflorio, M., Brill, R., Griffiths, M., ... & De Metrio, G., 2005. Immunohistochemical localization of CYP1A, vitellogenin and Zona radiata proteins in the liver of swordfish (*Xiphias gladius* L.) taken from the Mediterranean Sea, South Atlantic, South Western Indian and Central North Pacific Oceans. *Aquatic Toxicology*, 71(1), 1-12.

Habegger, M.L., Dean, M.N., Dunlop, J.W.C., Mullins, G., Stokes, M., Huber, D.R., Winters, D., Motta, P., 2015. Feeding in billfish: inferring the role of the rostrum from a biomechanical standpoint. *Journal of Experimental Biology*, 218, 824-836

Hazin, F.H.V., Hazin, H.G., Boeckmann, C.E., Travasson, P., 2002. Preliminary study on the reproductive biology of swordfish, *Xiphias gladius* (Linnaeus, 1758), in the southwestern equatorial Atlantic ocean. *Collective Volumes of Scientific Papers, ICCAT*. Vol.54 (5), 1560-1569.

Huynh, M. D., Kitts, D. D., Hu, C., Trites, A. W., 2007. Comparison of fatty acid profiles of spawning and non-spawning Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 146 (4), 504-511.

ICCAT. Report for biennial period, 2016-17 part ii (2017)- vol. 2 english version

Kirsten, K., For, D., Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., 2018. First description of behavior and immune system relationship in fish. *Scientific reports*, Vol.8 (846).

Lazo-Andrade, J., Guzmàn-Rivas, F., Barrià, P., Ortega, J., Mora, S., Urzù, A., 2021. Seasonal dynamics of biochemical composition and fatty acids of

swordfish (*Xiphias gladius*) in the Southeast Pacific Ocean off the coast of Chile. *Marine Environmental Research*, Vol.169.

Lubzens, E., Bobe, J., Young, G., & Sullivan, C. V., 2017. Maternal investment in fish oocytes and eggs: the molecular cargo and its contributions to fertility and early development. *Aquaculture*, 472, 107-143.

Macias, D., Hattour, A., De la Serna, J.M., Gòmez-Vives, M.J., Godoy, D., 2005. Reproductive characteristics of swordfish (*Xiphias gladius*) caught in the southwestern Mediterranean during 2003. *Collective Volumes of Scientific Papers, ICCAT*. Vol.58(2), 454-469.

Maradonna, F., & Carnevali, O., 2018. Lipid metabolism alteration by endocrine disruptors in animal models: an overview. *Frontiers in endocrinology*, 9, 654.

Martins, A. M. C., Cassiano, L. L., Braga Catroxo, M. H., Hipòlito, M., Costa, R., 2020. Bleaching of Melanomacrophages from Tissues of Ectothermic Vertebrates for Later Use of Immunohistochemical and in Situ Hybridization Technique. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, Vol. 6 (9).

Mehouel, F., Bouayad, L., Berber, A., Van Hauteghem, I., & Van de Wiele, M. 2019. Analysis and risk assessment of arsenic, cadmium and lead in two fish

species (*Sardina pilchardus* and *Xiphias gladius*) from Algerian coastal water.

Food Additives & Contaminants: Part A, 36(10), 1515-1521.

Mehouel, F., Bouayad, L., Hammoudi, A. H., Ayadi, O., & Regad, F., 2019.

Evaluation of the heavy metals (mercury, lead, and cadmium) contamination of sardine (*Sardina pilchardus*) and swordfish (*Xiphias gladius*) fished in three Algerian coasts. *Veterinary World*, 12(1), 7.

Nakamura, I., 1985. *Billfishes of the World. An annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes know to date.* FAO Species Catalogue Vol.5. Food and Agriculture Organization, Rome.

Palko, B. J., Beardsley, G. L. & Richards, W.J. 1981. *Synopsis of the biology of the swordfish, Xiphias gladius Linnaeus.*

Passantino, L., Santamaria, N., Zupa, R., Pousis, C., Garofalo, R., Cianciotta, A., ... & Corriero, A., 2014. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *Journal of Fish Diseases*, 37(3), 241-250.

Passantino, L., Zupa, R., Pousis, C., Mylonas, C. C., Hala, E., Jirillo, E., Corriero, A., 2019. Increased melanomacrophage centres in the liver of reproductively dysfunctional female greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *Journal of Fish Diseases*, Vol. 43 (4), 503-514.

Piatkowski, U., Pierce, G.J., Morais da Cunha, M., 2001. Impact of cephalopods in the food chain and their interaction with the environment and fisheries: an overview. *Fisheries Research*, Vol.52, 5-10.

Potthoff, T. & Kelley, S., 1982. Development of the vertebral column, fins and fin supports, branchiostegal rays, and squamation in the swordfish, *Xiphias gladius*. *Fishery Bulletin*, NOAA. Vol. 80, N.2.

Qualhato, G, Teixeira de Sabòia-Morais, S.M., Damacena Silva, L., Rocha, T.L., 2018. Melanomacrophage response and hepatic histopathologic biomarkers in the guppy *Poecilia reticulata* exposed to iron oxide (maghemite) nanoparticles. *Aquatic Toxicology*, Vol.198, 63-72.

Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525-539.

Sayed, H., Abd-Elkareem, M., Abou Khalil, N. S., 2019. Immunotoxic effects of 4-nonylphenol on *Clarias gariepinus*: Cytopathological changes in hepatic melanomacrophages. *Aquatic Toxicology*, Vol. 207, 83-90.

Steinel, N. C., & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in immunology*, 8, 827.

Stosik, M. P., Tokarz-Deptuła, B., & Deptuła, W., 2018. Specific humoral immunity in Osteichthyes. *Central-European Journal of Immunology*, 43(3), 335.

Videler, J. J., Haydar, D., Snoek, R., Hoving, H. J. T., & Szabo, B. G., 2016. Lubricating the swordfish head. *Journal of Experimental Biology*, 219(13), 1953-1956.

Zudaire, I., Murua, I., Grande, M., Pernet, F., Bodin, N., 2014. Accumulation and mobilization of lipids in relation to reproduction of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the Western Indian Ocean. *Fisheries Research*, Vol. 160, 50-59.