



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
in
Biologia Marina

**La risposta alle condizioni di allevamento del tonno rosso
(*Thunnus thynnus*): effetti dell'età e dello stato
riproduttivo**

**Bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) response to farming
condition: the effect of age and reproductive status**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Alessio Zambetti

Relatore:
Prof.ssa **Giorgia Gioacchini**

Correlatore:
Prof.ssa **Oliana Carnevali**
PhD **Sara Filippi**

**Sessione Straordinaria
Anno Accademico 2020/2021**

Indice

1 Introduzione	4
<i>1.1 Thunnus thynnus</i>	4
<i>1.2 Classificazione tassonomica</i>	5
<i>1.3 Morfologia</i>	6
<i>1.4 Alimentazione e tasso di accrescimento</i>	9
<i>1.5 Habitat e distribuzione</i>	11
<i>1.6 Migrazione</i>	13
<i>1.7 Aspetti sociali ed economici</i>	15
<i>1.8 Gestione della risorsa</i>	18
<i>1.9 Allevamento del tonno rosso</i>	22
<i>1.10 La riproduzione del tonno rosso</i>	26
<i>1.11 Il fegato e il metabolismo lipidico</i>	33
<i>1.12 Sistema immunitario</i>	35
<i>1.13 Melanomacrofagi</i>	37
2. Scopo della tesi	41
3. Materiali e metodi	42
<i>3.1 Campionamento</i>	42
<i>3.2 Analisi istologiche</i>	44
<i>3.3 Analisi statistiche</i>	46
4. Risultati	48

<i>4.1 Melanomacrofagi</i>	49
<i>4.2 Lipidi</i>	58
5. Discussione _____	63
6. Conclusioni _____	69
7. Ringraziamenti _____	71
8. Bibliografia _____	72

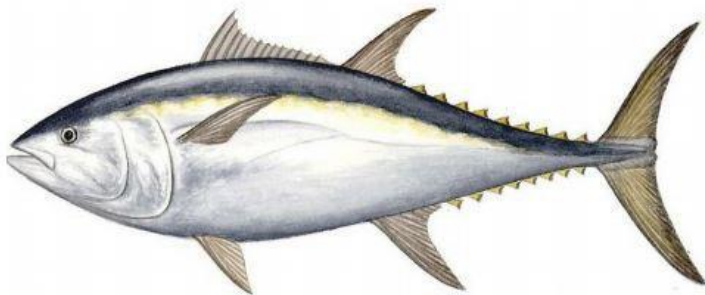
1. INTRODUZIONE

1.1 - Thunnus thynnus

La parola *Thon* fu utilizzata dai Fenici, primo popolo navigante del XXX secolo a.C., per identificare grandi animali marini che popolano il Mar Mediterraneo. *Thon* deriva dal greco “σειώ”, che letteralmente significa “muoversi con impeto” (Società Italiana di Biologia Marina). Da *Thon*, per evoluzione linguistica, si ha la parola *thynnus* in latino; secoli dopo, Linneo, padre della moderna classificazione scientifica degli organismi viventi, ne introduce il nome scientifico: il *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), il “Re del Mediterraneo”. In Italia, tale specie è conosciuta comunemente col nome di Tonno rosso, nome che prende origine dal colore rosso del muscolo (Johnston, 1981). In inglese viene identificato con la dicitura ABFT, acronimo di *Atlantic Blue Fin Tuna*, per la colorazione della 1° pinna dorsale bluastra e per la particolare colorazione bluastra della livrea: questi elementi sono importanti nell’identificazione della specie per evitare frodi alimentari per *counterfeiting*.

1.2 - Classificazione

Thunnus thynnus (Linnaeus, 1758) è un pesce osseo marino, appartenente alla famiglia degli Scombridi, il quale rappresenta la specie con la taglia maggiore. L'esemplare più grande è stato ritrovato in Nuova Scozia, nelle acque del Nord Atlantico settentrionale, misurando 340 cm (SFL) per quasi 680 kg (Claro et al., 2014)



Classificazione tassonomica:

Phylum: *Chordata*

Subphylum: *Vertebrata*

Superclasse: *Gnathostomata*

Classe: *Actinopterygii*

Sottoclasse: *Neopterygii*

Infraclasse: *Teleostei*

Superordine: *Acanthopterygii*

Ordine: *Perciformes*

Famiglia: *Scombridae*

Sottofamiglia: *Scombrinae*

Genere: *Thunnus*

Specie: *Thunnus thynnus*

Nome comune: Tonno rosso o Tonno Pinna Blu

1.3 Morfologia

Il tonno rosso presenta un corpo fusiforme e robusto, di forma romboidale se visto di profilo, mentre i giovanili presentano un corpo meno rotondeggiante e allungato. Gli occhi sono di piccola dimensione rispetto alla testa. La testa è di forma conica e presenta una fessura branchiale molto ampia che si sviluppa dalla base della bocca al dorso. Sia la mascella che la mandibola hanno la stessa dimensione, prive di scaglie e sono protrusibili, consentendo al tonno di afferrare le prede durante il nuoto (Mather et al., 1995). La bocca è costituita da una sola linea di denti, appuntiti e conici. La pelle appare liscia, con file di piccole scaglie cicloidi che si ingrandiscono al corsaletto. Nella regione dorsale, le pinne sono due: la prima è alta anteriormente con circa quindici raggi e durante il nuoto si appiattisce per non creare attrito con l'acqua spostata

durante il nuoto, mentre la seconda è falcata e di minori dimensioni. La prima pinna dorsale viene anche utilizzata per determinare l'età. Le due pinne dorsali sono separate da uno spazio ristretto. Le pinne pettorali, durante il nuoto, vengono addossate al corpo, conferendo al tonno un assetto stabile. Queste sono sorrette da circa 30-36 raggi spinosi, con una dimensione compresa tra il 15 e il 20% della lunghezza totale dell'esemplare (SFL). Tra la seconda pinna dorsale e la pinna caudale e tra la pinna anale e quella caudale, si trovano due serie di pinnule: 8-10 nella parte dorsale e 7-9 in quella ventrale, importanti durante il nuoto per ridurre la turbolenza e stabilizzare l'assetto. La pinna caudale è falcata ed è molto ampia. Nella porzione del peduncolo caudale, sono presenti le chiglie coriacee disposte in modo simmetrico, le quali, come dimostrato precedentemente, hanno una funzione idrodinamica (Zhang et al., 2011). La colorazione del tonno rosso segue l'adattamento cromatico tipico dei pesci pelagici: la colorazione del dorso è blu scuro in modo da confondere i predatori se visto dall'alto mentre la parte ventrale è grigio-argentea, per mimetizzarsi con il riflesso dell'acqua, se visto dal basso. A circa metà del corpo, la livrea sfuma in un blu acciaio fino al tono più chiaro della parte ventrale. I giovanili, invece, presentano striature iridescenti verticali lungo tutto il corpo. La sua morfologia rispecchia un adattamento al nuoto chiamato *di*

crociera, compiendo grandi migrazioni in senso latitudinale e longitudinale e raggiungendo la velocità di 115 km/h (Fromentin & Powers, 2005).

1.4 Alimentazione e tasso di accrescimento

I giovanili hanno un tasso di crescita elevato: si stima che l'accrescimento corporeo varia tra i 2,0- 3,0 mm/giorno (Dewar & Graham, 1994) e in 4 anni raggiungeranno la taglia minima di cattura, circa 115 cm (SFL) / 30 kg (Ailloud et al., 2017). L'accrescimento corporeo e l'età del tonno rosso sono stimati grazie allo studio della microstruttura degli otoliti, tramite i quali è possibile conoscere l'età e correlarla al peso (Busawon et al., 2015). Il tasso di crescita non dipende solo dall'età ma anche dallo stadio riproduttivo e dal metabolismo lipidico. In particolare, il sistema IGF-1 controlla l'accrescimento sia nei primi anni di vita (YOY) che negli individui adulti (4+Y), diversamente nei maschi e nelle femmine: le femmine hanno un tasso di crescita minore rispetto ai maschi. I giovanili si accrescono più velocemente rispetto agli adulti: ciò è dovuto ad una assimilazione dei nutrienti molto più rapida avendo anche un tasso metabolico più elevato. Il tonno rosso è una specie opportunistica: studi condotti sul contenuto stomacale hanno rilevato prede provenienti da 22 taxa differenti di pesci, 10 taxa di molluschi e 8 taxa di crostacei, tra cui sardina (*Sardina pilchardus*) acciughe (*Engraulis encrasicolus*) aringa (*Clupea harengus*) sgombri (*Scomber scombrus*) e cefalopodi (*Illex*, *Loligo spp*) dimostrando di essere una specie chiave nella catena alimentare dell'ambiente pelagico (Dragovich, 1970). Lungo la catena alimentare si posiziona tra i *top*

predator, in quanto non teme predatori ad eccezione dell'uomo e dei grandi cetacei come le orche (*Orcinus orca*). Allo stadio larvale, il tonno rosso si nutre di zooplancton, crostacei e piccoli cefalopodi (Chase, 2002) e, per la sua inclinazione gregaria per taglia, si mimetizza con i banchi di alici o sgombri, divenendo una potenziale preda ed abbassando il tasso di vitalità.

1.5 Habitat e distribuzione

Thunnus thynnus è una specie migratoria ampiamente distribuita tra i 45° N e 45° S, popolando l'intero sistema epi- mesopelagico dell'Oceano Atlantico, il Mar Nero, Mar di Marmara, Mar Mediterraneo e Mar d'Azof. (Mather et al., 1995).

ICCAT MANUAL, 1st Edition (January 2010)

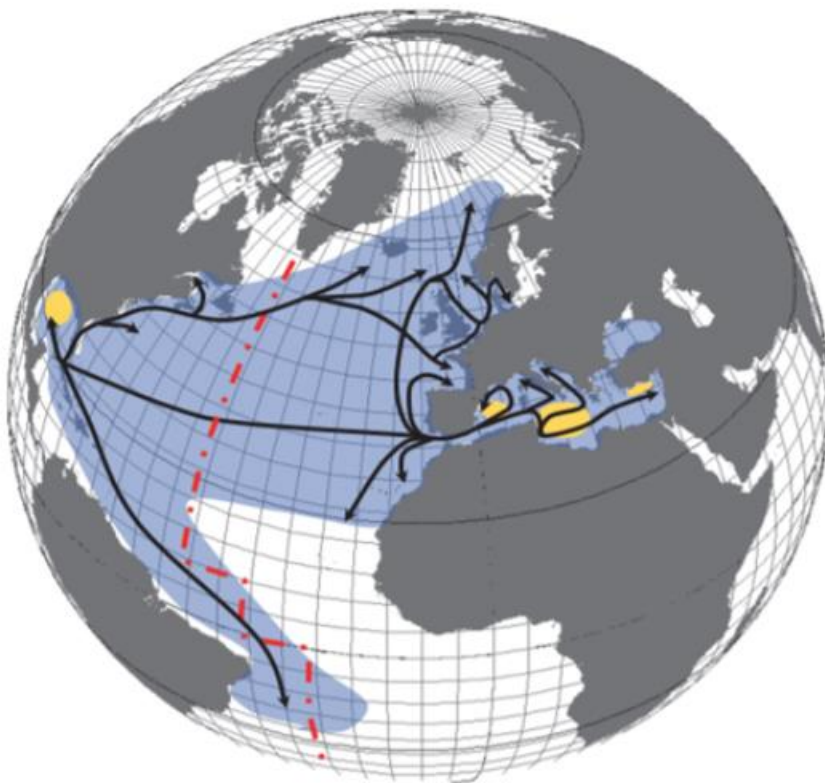


Figure 2 Mappa della distribuzione spaziale delle principali rotte migratorie dell'ABFT e delle principali zone di riproduzione. La linea tratteggiata verticale rappresenta la delimitazione dello stock tra le due attuali unità di gestione dell'ICCAT (Fromentin & Powers 2005).

Gli studi di tagging confermano che il tonno rosso riesce ad adattarsi ad un ampio range di temperatura, grazie ad un sistema di termoregolazione (Dewar & Graham, 1994) chiamato *rete mirabilis*, che irrorata il tessuto muscolare di sangue a partire dalla colonna vertebrale fino alla testa consentendo a questi pesci di mantenere la temperatura corporea di 10° C superiore a quella dell'ambiente esterno. Utilizzando questo sistema di termoregolazione, il tonno rosso può tollerare un gradiente termico compreso tra i 3°C-30°C, adattandosi a differenti ambienti e ottemperando anche alla variazione di temperatura che attualmente minaccia l'ecosistema marino (Fromentin & Powers, 2005). Il tonno rosso è in costante movimento, poiché, essendo sprovvisto di opercoli branchiali, deve costantemente nuotare per rifornire le branchie di ossigeno attraverso il flusso d'acqua. Questo processo è definito *ram ventilation*. Il tonno rosso, in Oceano Atlantico, per la teoria del foraggiamento ottimale, si sposta lungo le sponde oceaniche caratterizzate dal fenomeno dell'*upwelling*, zone dove la risalita dei nutrienti dal fondo determina un ecosistema acquatico complesso in cui abbondano prede come piccoli pesci pelagici e cefalopodi. In particolare, ritroviamo il tonno rosso lungo le sponde occidentali del Nord Africa (Marocco, Mauritania) e del Nord Europa (Portogallo, Golfo di Biscaglia) (Mather et al., 1995).

1.6 Migrazione

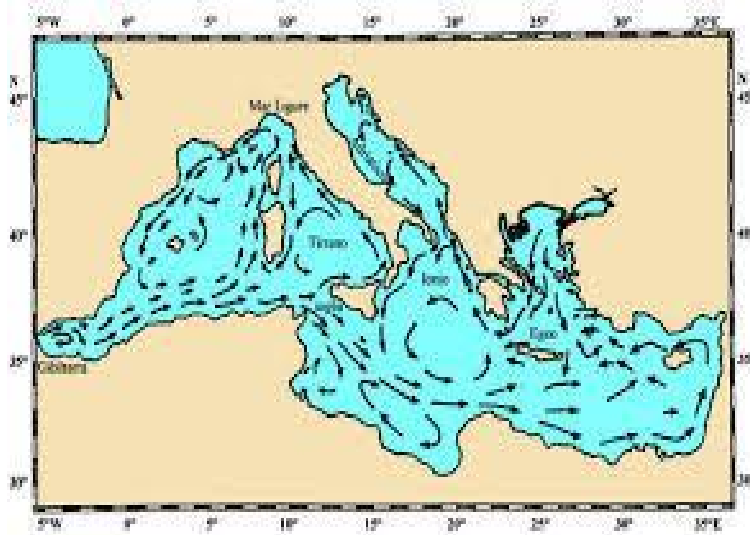
Il tonno rosso è una specie migratoria, compiendo due migrazioni distinte: la prima è una migrazione di tipo riproduttivo, per consentire la maggiore percentuale di sopravvivenza delle larve, e la seconda per il foraggiamento. Durante il periodo riproduttivo, questa specie effettua una migrazione per raggiungere due principali aree di spawning: il Mar Mediterraneo e il Golfo del Messico, rispettivamente dal mese di maggio ad agosto e da marzo a giugno (Rooker et al., 2007). Le zone del Mediterraneo in cui convergono le acque atlantiche MAW (*Modified Atlantic Water*) e le acque salate del Mediterraneo MDW (*Mediterranean Deep Water*), formano microambienti con fronti di salinità differenti, in cui si trovano condizioni ideali per ospitare un numero elevato di larve di tonno rosso (Karakulak et al., 2004).



Fig. 2. Aree di spawning del tonno rosso. I cerchi in giallo rappresentano le zone di riproduzione (Fromentin et al., 2005)

Nel Mediterraneo, le aree di spawning accertate sono le Isole Baleari nel Mediterraneo Occidentale, lo Stretto di Sicilia nel Mediterraneo centrale e le isole minori nel Mediterraneo meridionale. Alcuni studi, però, sostengono

che una quarta zona di spawning sia presente nel Mar Levantino (Karakulak et al., 2004). I tonni, durante la migrazione riproduttiva, cosiddetta *ammatticcata* di andata, entrano nel bacino del Mediterraneo seguendo le correnti atlantiche,



che una quarta zona di spawning sia presente nel Mar Levantino (Karakulak et al., 2004). I tonni, durante la migrazione riproduttiva, cosiddetta *ammatticcata* di andata, entrano nel bacino del Mediterraneo seguendo le correnti atlantiche,

che per reotropismo positivo, risultano essere i vettori principali della migrazione dei tonni. In Atlantico, alcuni studi di tagging sostengono la presenza di tre aree di spawning: il Golfo del Messico, lo stretto della Florida e le Bahamas (Teo et al., 2007).

L'ICCAT ha stabilito due aree di management diverse per l'Atlantico settentrionale e per l'Atlantico orientale/Mediterraneo, visto il risultato di alcuni studi che indicano il Mediterraneo come area di spawning di esemplari atlantici. Infatti, la popolazione del tonno rosso è gestita come due stock differenti, uno con area di spawning in Golfo del Messico e uno nel Mediterraneo (Block et al., 1998).

1.7 Aspetti sociali ed economici

Il tonno rosso è una delle specie ittiche che vanta una tradizione alieutica millenaria: le prime attività di pesca risalgono al periodo del Neolitico, come dimostra la pittura rupestre all'interno della grotta del Genovese, a Levanzo. Nel corso della storia, i greci e i romani sono stati i primi pescatori ad usare la tecnica della *Magna Retia*, un antenato della odierna tonnara volante. Ancora prima di loro, i Fenici sono stati i veri protagonisti della pesca del tonno rosso, utilizzando il sistema delle reti combinate, le *archeotonnare* fisse, che sfruttavano la conoscenza delle correnti mediterranee durante la migrazione

riproduttiva nel bacino del Mediterraneo. La tonnara fissa, ancora oggi utilizzata, è un sistema di pesca antico, costituito da un complesso sbarramento di reti, prima di fibra vegetale ed ora in fibra sintetica, collocate verticalmente dalla superficie al fondo, raggiungendo in genere la distanza di circa due chilometri. I tonni intercettati durante la migrazione, nel periodo primavera-estate, seguono lo sbarramento come un percorso, con alla fine la cosiddetta *camera della morte*, in cui tutte le azioni destinate al sacrificio del tonno sono coordinate dalla ciurma di tonnarotti sotto la visione del *Rais*, il capitano che conduce le operazioni. La plusvalenza di produzione da parte delle tonnare spinse verso forme di industrializzazione e di lavorazione del prodotto pescato, provocando un indotto straordinario in termini economici, con un notevole sviluppo sia sociale che lavorativo. Nel 1800, c'erano 85 tonnare fisse solo in Sicilia e più di 100 sparse in tutta la penisola (Pavesi, 1887). Al momento, in Italia, è operativa una sola tonnara fissa in Sardegna, precisamente a Carloforte. L'incremento del *noise acoustic pollution* e del traffico diportistico ha contribuito alla riduzione dell'efficienza delle tonnare. Un'altra tecnica che ha subito un notevole cambiamento evolutivo è il palangaro, attrezzo di pesca professionale e sportiva di origine giapponese, lungo max 30 NM, con al massimo 1500 ami. La pesca con il palangaro nella stagione 2005 ha fatto registrare uno sbarcato di 310t e quella con tonnara fissa 69t (Scarpato &

Simeone, 2005). Oggi la maggior parte del tonno rosso viene pescato con un metodo di pesca di rete a circuizione noto con il termine di *tonnara volante* o *Purse Seiner* (PS). Più del 70% del tonno rosso pescato in Mediterraneo è catturato con questo metodo, anche per essere trasportato vivo negli impianti di allevamento. Se da un lato questa tecnica ha permesso di ottimizzare il processo di cattura, riducendo lo sforzo di pesca, dall'altro ha portato a una pesca eccessiva, spesso incontrollata e quindi ad una drammatica riduzione di questa specie. Lo scenario è cambiato grazie ad un maggior controllo della pesca e un continuo monitoraggio delle condizioni di salute dello stock (ICCAT, 2017). Gli aspetti sociali ed economici, le migrazioni trofiche e riproduttive di questo teleosteo, sono fattori che travalicano gli interessi nazionali ed internazionali (FAO, 2005). Le attività di pesca e di acquacoltura, in maniera sinergica e nel pieno rispetto delle regole economiche e ambientali, consentono di soddisfare la domanda sempre crescente di prodotti ittici, in particolare del tonno rosso soprattutto da parte di paesi che vantano una lunga e forte tradizione culinaria, come il Giappone, il più importante mercato del tonno rosso, con un consumo annuale pro-capite di 5 kg (Scarpato & Simeone, 2005).

1.8 La gestione della risorsa

L'aumento del consumo globale del tonno rosso, combinato all'aumento dello sforzo di pesca e al prelievo di questa risorsa, hanno portato alla fondazione nel 1966 della Commissione Internazionale per la Conservazione dei Tonnidi dell'Atlantico (*International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas*, ICCAT), deliberata a Rio de Janeiro.

L'ICCAT è un'organizzazione intergovernativa di pesca responsabile che si occupa della conservazione, ricerca e il management degli stock di grandi pelagici ed assicurare il massimo rendimento sostenibile (MSY). Tale organizzazione internazionale si avvale di 53 CPC (*paesi cooperanti non contraenti*) interessati alla pesca del tonno rosso ed ogni CPC è obbligato ad adempiere alle disposizioni della raccomandazione vigente, agendo sull'intero Oceano Atlantico ed i suoi mari adiacenti. Ogni paese cooperante, annualmente, fornisce dati statistici in termini di cattura e sforzo di pesca del tonno rosso, ed in seguito alle analisi di valutazione degli stock eseguite dallo *Standing Committee on Research and Statistics* (SCRS) si redigono le nuove strategie di gestione, modificando le raccomandazioni vigenti. Nel caso del tonno rosso, nel periodo 2007-2018, è stato redatto un piano di ricostituzione dello stock, dal regolamento (CE) n.302/2009, poiché i dati forniti sullo stato di salute dello stock hanno indicato che è soggetto a sovrasfruttamento, dato

che la capacità della flotta peschereccia è superiore alla capacità riproduttiva dello stock.

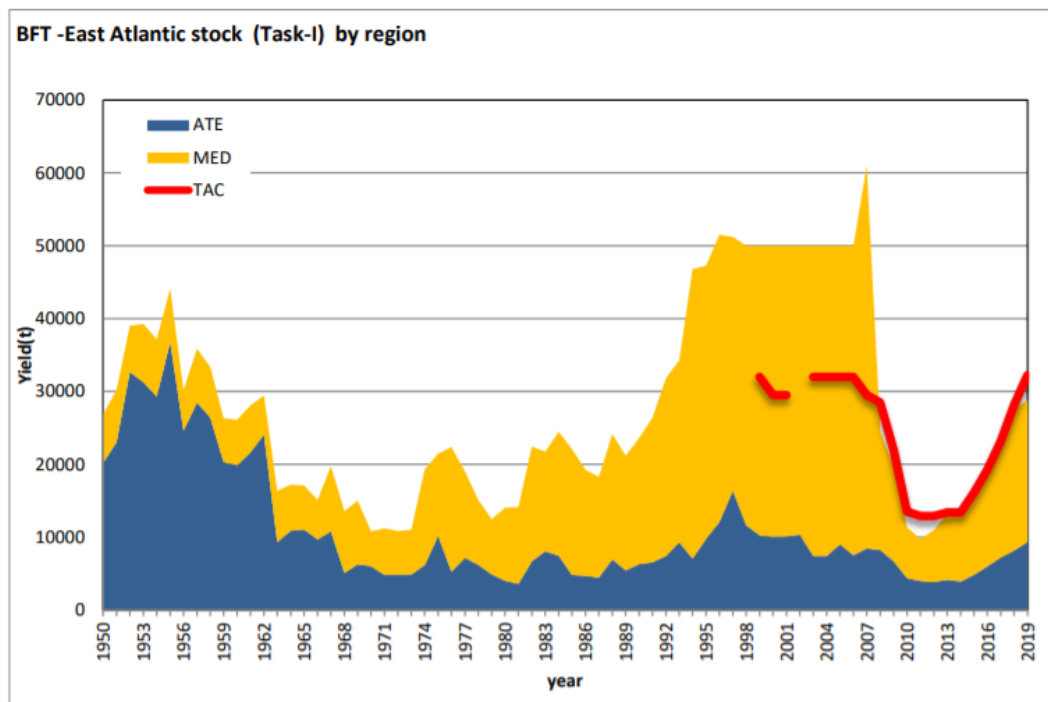


Figura 4: Catture totali dello stock orientale di *Thunnus thynnus*, divisi per aree geografiche, con il totale ammissibile di catture (TAC) (ICCAT, 2019)

Il piano di recovery del tonno rosso prevede che siano adottate diverse misure: sono state inserite le TAC (*Total Admissible Capture*), ovvero il quantitativo massimo di cattura al fine di ridurre la pressione sullo stock in un periodo di pesca che coincide con l'apertura della stagione riproduttiva, diversamente Atlantico e Mar mediterraneo: per i palangari va dal 1° gennaio al 31° maggio, e per le tonnare volanti dal 26° maggio al 1° luglio ad eccezione del Mar Adriatico che è prorogata fino al 15 luglio. Le catture ammesse devono

rispettare le disposizioni in materia di taglie minime di cattura, stabilita in 30kg o 115 cm SFL. Inoltre, altre disposizioni riguardano il divieto di utilizzo di aeroplani o elicotteri.

Le attuali raccomandazioni hanno avviato un progetto ICCAT, al fine di garantire l'efficacia e il rispetto di tali pratiche, istituendo un controllo di osservatori in tutte le operazioni in cui vi è trasferimento o trasbordo di tonno rosso.

Dalle statistiche dell'ultimo report del SCRS 2020, in base ai parametri utilizzati atti a valutare il potenziale di crescita della popolazione ha dimostrato

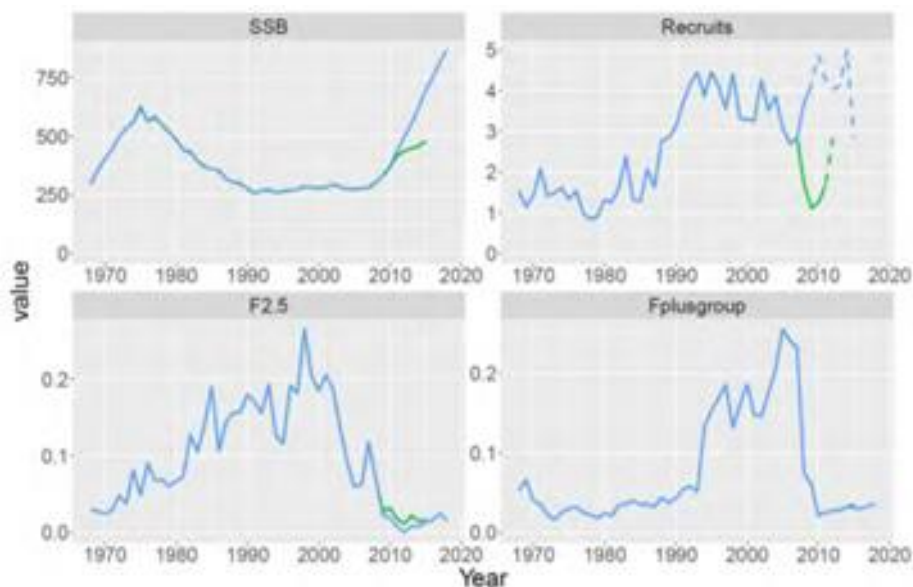


Figura 5. Biomassa riproduttiva, reclutamento, mortalità per pesca, dati statistici forniti dal RAPPORTO SCRS 2020.

l'efficacia del sistema di monitoraggio e i risultati ottenuti hanno permesso l'aumento della TAC per il biennio 2019-2020, stabilito in 32.240 t per il 2019 e 36.000 t per il 2020. La raccomandazione 19-04 istituisce un piano di gestione pluriennale per il tonno rosso nell'Atlantico Orientale e Mar Mediterraneo. Il termine "gestione", e non di "ricostituzione", indica che le misure di controllo applicate allo stock sono state efficaci al fine del raggiungere il *maximum sustainable yield* sulla biomassa disponibile e che quindi tale stock non è più soggetto a un'azione di recovery.

1.9 Allevamento del tonno rosso

L'attività di ingrasso del tonno rosso nel Mar Mediterraneo è una attività stagionale che prevede il prelievo di individui vivi dallo stock selvatico e il loro successivo allevamento in gabbie (ICCAT, 2008a).

La maggior parte dei tonni rossi catturati nelle aree di spawning dalle *purse seiner*, sia quelli che entrano nel Mar Mediterraneo sia quelli che vi risiedono abitualmente, sono generalmente maturi, con un peso compreso tra i 30-400 kg. Il tonno rosso selvatico viene trasportato in gabbie galleggianti per l'ingrasso, per un periodo che oscilla da 3 a 5 mesi, come nel caso delle *farm* di Malta e Spagna, o fino a 2 anni nel caso della Croazia (Ottolenghi, 2008).

Dal punto di vista nutrizionale, il tonno rosso selvatico presenta delle carni poco grasse, poiché il grasso muscolare è stato utilizzato come riserva energetica e l'alimentazione in ambiente selvatico non apporta grandi quantità di nutrienti. Alcuni mercati, concentrati soprattutto sul tonno rosso, prediligono esemplari con un maggior quantitativo di grasso accumulato nel muscolo (170-280 kg), come il mercato giapponese, dove il prezzo del tonno rosso sale a valori molto alti (Aguado et al., 2004). L'allevamento del tonno rosso consente di ottenere individui con un contenuto di lipidi nei muscoli molto più alto rispetto al

selvatico e consente di rifornire il mercato per un periodo di tempo più lungo, regolando su scala temporale il sacrificio degli esemplari in base alla richiesta di tonno rosso, riducendo potenzialmente la pressione sullo stock selvatico.

La lunga rotta del tonno rosso verso la stazione di ingrasso comincia dalla geolocalizzazione del banco, con conseguente cattura di individui vivi da parte delle *purse seiner*, che verranno trasferiti in una gabbia vuota collegata ad un rimorchiatore (TUG). La gabbia al rimorchio ha un diametro medio di 30-40 m e una profondità di 50 m (Belmonte & de la Gandara, 2008), mentre la gabbia di ingrasso ha un diametro del 25% maggiore rispetto a quella di trasporto e può contenere una densità media di individui pari a 5-6.2 kg/m³ (Farwell, 2003). La gabbia al rimorchio, se piena, viene trasportata con una velocità di navigazione di massimo 1 miglio/h per permettere ai tonni di non perdere l'orientamento sistematico, permanentemente circolare, e così evitare che si scontrino con la gabbia o fra loro. Alcuni studi attestano che, nel 1995, la mortalità causata dal trasporto si aggirasse intorno al 21%, per poi diminuire negli anni 2000 al 4%, fino ad arrivare 1-2% di oggi (Ottolenghi, 2008). Tutte le operazioni in mare, sia di trasferimento sia di sacrificio, sono supervisionate da ispettori della pesca e da osservatori a bordo, col fine di far rispettare la raccomandazione ICCAT 19-04. Arrivato alla stazione di ingrasso, il tonno rosso viene trasferito in una gabbia di allevamento e affronta un periodo di

acclimatazione, al fine di ridurre lo stress e aumentare il benessere dell'animale. Il periodo di ingrasso si estende da giugno a febbraio. L'alimentazione giornaliera è a base di pesci ricchi di grasso, come la sardina (*Sardina pilchardus*), aringa (*Clupea harengus*), sgombro (*Scomber scombrus*) e alcuni cefalopodi rigorosamente congelati, per mantenere la catena del freddo e ridurre il deterioramento del mangime causato dall'ossidazione lipidica (Munday et al., 2003).



Fig.6 Transfer Caging operation fotografata da un drone, in questa operazione ci sono osservatori a bordo dell'unità che controllano gli esemplari in trasferimento

L'allevamento del tonno rosso presenta dei punti critici, i quali vanno migliorati per raggiungere gli obiettivi della crescita blu sostenibile. Uno tra questi è il

parametro FCR, ovvero il rapporto di conversione dei mangimi, ed è generalmente alto per esemplari grandi (intorno a 15–20:1) mentre per pesci più piccoli si aggira intorno a 10–15:1. Gli animali sono nutriti mediamente 1-3 volte al giorno (Graham & Dickson, 2001), in maniera dipendente dalla temperatura e dalla composizione per taglia degli individui nella gabbia. Gli esemplari vengono saziati *ad libitum*, sotto l'attenta supervisione di un subacqueo che riprende le attività con sistemi di telecamere stereoscopiche. La sovralimentazione può innescare processi di eutrofizzazione delle aree circostanti le gabbie: per tale motivo le gabbie sono poste, dove possibile, a circa 3-4 NM dalla costa (Ottolenghi et al., 2004). Tutti gli esemplari all'ingrasso sono identificati dal documento di cattura del tonno rosso redatto dall'ICCAT, ovvero il BCD. Se gli esemplari non vengono identificati con il BCD, si procede liberando gli esemplari presenti in gabbia.

1.10 La riproduzione del tonno rosso

Secondo alcuni studi condotti sulle gonadi di individui pescati in Mar Mediterraneo durante la stagione riproduttiva, il tonno rosso raggiunge la maturità sessuale all'età approssimativa di 3-4 anni con un peso tra i 30-40 kg (Fromentin & Powers, 2005). Invece, lo stock dell'Oceano Atlantico, che si riproduce nel Golfo del Messico, raggiunge la maturità sessuale intorno agli 8 anni, con un peso compreso tra i 130-170 kg (Mather et al., 1995; Schaefer, 2011).

Il tonno rosso è una specie che non mostra dimorfismo sessuale e hanno uno sviluppo ovarico di tipo asincrono (Schaefer, 2001). È una specie, come tutti i teleostei, ovipara con rilascio delle uova che avviene in condizioni ambientali favorevoli per la fecondazione esterna e la sopravvivenza larvale. Il tonno rosso rilascia i gameti femminili e maschili lungo la colonna d'acqua nei giorni di alta escursione mareale (Medina et al., 2002).

Questa specie si riproduce numerose volte durante la propria vita: è una specie iteropara e sia il potenziale riproduttivo sia il numero delle uova aumentano in relazione all'età ed alle sue dimensioni (McBride et al., 2015, Api et al., 2018; Grande et al., 2016). Studi eseguiti su esemplari selvatici di tonno rosso hanno stimato che il numero di un singolo batch di uova sia di circa 93.000 per kg di peso corporeo (Medina et al., 2002).

Lo sviluppo gonadale presenta quattro stadi che sono differenziati in base allo stadio dei follicoli ovarici e sul riassorbimento degli oociti vitellogenici (atresia), regolati dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonade. I fattori di crescita e gli ormoni promuovono l'inizio della pubertà, agendo su più livelli . L'ipotalamo produce il GnRH (ormone di rilascio delle gonadotropine) che darà inizio alla cascata di eventi dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade (Carnevali et al., 2019; Medina et al., 2016). Il GnRH dovrà legarsi ai recettori presenti sulle cellule gonadotrope dell'ipofisi: il legame ormone-recettore stimolerà la trascrizione e la traduzione di due gonadotropine ipofisarie, il FSH (ormone follicolo stimolante), con alta concentrazione durante l'inizio della pubertà e nelle prime fasi dello stadio riproduttivo e stimola l'attività delle cellule della granulosa e promuove la crescita dei follicoli ovarici, e l'ormone LH (ormone luteinizzante), avente un ruolo predominante nella crescita delle cellule della teca e più in generale nella maturazione gonadica e nel periodo di spawning (Weltzien et al., 2004).



Fig. 7 - Macroarea in cui è situato l'asse ipotalamo-ipofisi, zona d' origine delle gонатроpine (Knapp et al., 2014).

I due ormoni sono riversati nel circolo ematico, tramite il quale raggiungeranno la gonade, dove verranno riconosciuti dai loro recettori inducendo il processo di gametogenesi e la sintesi di due ormoni steroidei: l'estradiolo, ormone che induce la sintesi della vitellogenina nel fegato e il trasporto degli acidi grassi neutri che verranno internalizzati negli ovociti pre-vitellogenici, e l'ormone 11-ketotestosterone (Carnevali & Maradonna et al., 2018). La vitellogenina è una lipoglicofosfo-proteina, che viene internalizzata gradualmente durante l'oogenesi e che formerà il tuorlo, importante per la sopravvivenza delle larve. La regolazione endocrina, durante la maturazione degli ovociti, è stata studiata

in modo più approfondito. Studi condotti su sistemi in vitro ed in vivo hanno rivelato che la maturazione degli ovociti nei pesci è regolata da tre mediatori endocrini: LH, MIH, MPF (Nagahama et al., 2008). La maturazione degli oociti avviene dopo il corretto completamento della vitellogenesi e comprende ulteriori cambiamenti nucleari e citologici che predispongono la cellula agli altre due stadi principali: ovulazione e successiva fecondazione (Nagahama et al., 1983). La crescita degli ovociti primari inizia con la prima divisione meiotica e si arresta nella fase diplotene (Le Menn et al., 2007). L'ovocita primario inizialmente estende i microvilli, che in comunicazione con le cellule della granulosa (GC) hanno un ruolo chiave per gli scambi di molecole intracellulari per le fasi successive (Le Menn et al., 2007). Nella parte più esterna, vi si trova la corona radiata, o zona radiata (ZR) che ha una funzione protettiva e comunicativa, costruita attraverso la deposizione delle cellule della granulosa ed una matrice extra-ovocitaria; in sequenza vi si formano anche i granuli corticali. Queste molecole sono fondamentali per la fase previtellogenica, che prepara la cellula alla maturazione (Carnevali et al., 2020). Se la vitellogenesi progredisce correttamente, gli oociti subiscono la FOM, in cui il nucleo migra verso la parete dell'ovocita e le proteine del tuorlo vengono ulteriormente scisse formando una notevole quantità di amminoacidi. L'aumento della pressione osmotica, per mezzo delle acquaporine (AQPS) e la

presenza degli amminoacidi, facilita il processo di idratazione dell'ovocita. La FOM comporta anche la fusione delle gocce lipidiche e i globuli lipoproteici del tuorlo con la rottura della membrana nucleare (Lubzens et al., 2010). L'ovocita vitellogenico viene arrestato nella profase 1 delle meiosi e sono ovulati con i cromosomi bloccati in metafase 2,concludendo la divisione meiotica al momento della fecondazione (Goetz, et al., 1983). Di seguito si mostrerà in modo sequenziale gli stadi che attraversano gli ovociti, indicando la fase presa in esame.

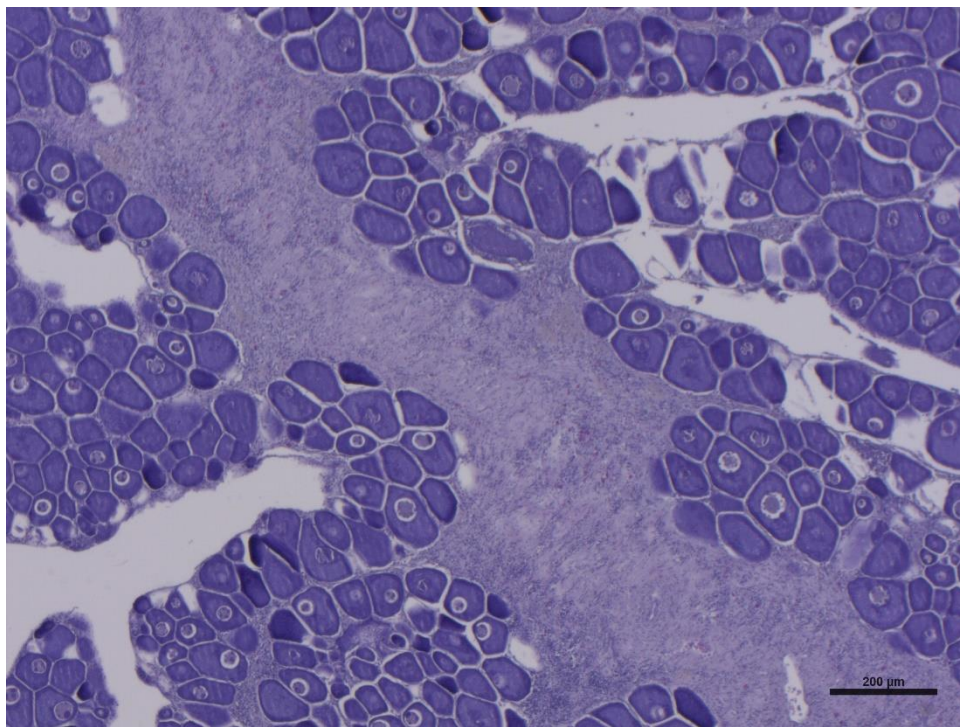


Fig. 8 - Microfotografia della gonade femminile di un esemplare di tonno rosso, campionato durante l'elaborazione della presente tesi

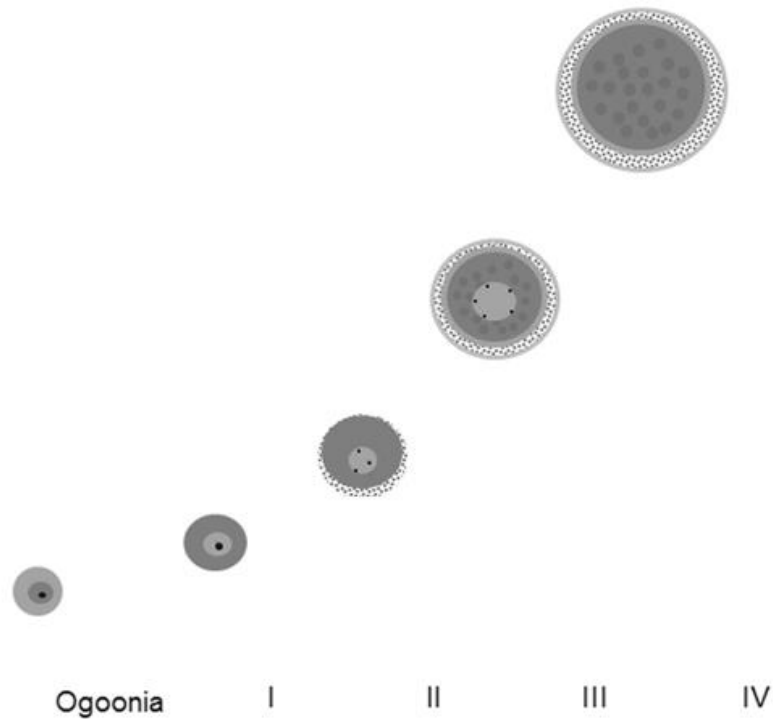


Fig. 9 - Oogenesi mostrata in maniera sequenziale (1°- 4° stadio).

Il primo stadio IM (Inactive mature) presenta gli oociti pre-vitellogenicici e con residui oociti vitellogenicici in fase di riassorbimento (atresia), oogoni e ovociti, prima dell'inizio della fase di crescita primaria che si trovano sotto lo strato epiteliale confinante con le lamelle ovariche. Hanno un diametro compreso tra i 10-40 μm , corrisponde stagionalmente nella fase post-riproduttiva da agosto a novembre.

Nella fase ANS (Active No-Spawning), il citoplasma degli ovociti è ricco di sostanze granulari, dovute ad una abbondanza di ribosomi. I nucleoli si mostrano inizialmente dispersi nel nucleoplasma e poi vi è un'aggregazione

verso l'involucro nucleare. Presentano una percentuale inferiore del 50% di atresia ovarica, gli oociti si trovano in fase di late-vitellogenic e in pre-vitellogenic e il volume dell'ovocita aumenta a causa della proliferazione di organelli membranosi e all'accumulo di ribonucleoproteine nel citoplasma, raggiungendo un diametro di 40-120 μm .

Nella fase AS (Active Spawning) ci sono oociti in lipid-stage e/o la presenza di alveoli corticali. Gli oociti sono idratati e sono presenti follicoli post ovulazione (POF=post-ovulatory follicle). L'inizio di questa fase è caratterizzato dalla migrazione del nucleo verso la parete dell'ovocita. Questa fase avviene nel periodo che va da fine giugno ad inizio luglio.

Nella fase R (Resting), sono presenti solo ovociti immaturi o precoci e nessun segno di atresia (Carnevali et al., 2019).

1.11 Il fegato e il metabolismo lipidico

Il fegato è un organo importante per i processi di immagazzinamento dei lipidi ed è correlato direttamente al ciclo riproduttivo.

L'accumulo di lipidi più consistente avviene prima della maturazione sessuale e nella prima fase dello sviluppo gonadale (Sheridan, 1994).

Il tonno rosso accumula grandi quantità di lipidi non solo per la riproduzione, ma anche per altri processi fisiologici dovuti all'elevato tasso metabolico e al fine di consentire il corretto funzionamento del processo di *Ram Ventilation* e della *rete mirabilis* (McBride et al., 2015; Grande et al., 2016). Il fegato è direttamente correlato con il tasso di accrescimento del BFT, dato che il sistema IGF-1 prodotto nel fegato, controlla l'ipertrofia e l'iperplasia delle cellule muscolari (Mommensen et al., 2001). Lo stoccaggio dei lipidi nel tonno rosso è distinguibile in tre tipologie: grasso mesenterico gonadico, grasso epatico e grasso muscolare.

Il fegato, dal punto di vista riproduttivo, ha un ruolo predominante come accumulo di riserva lipidica: è l'organo da cui deriva il colesterolo, sintetizzato a partire dall'Acetil Co-A, precursore dell'estradiolo che stimola la sintesi della vitellogenina.

Nel fegato si sintetizzano gli acidi grassi, il colesterolo, le lipoproteine e si immagazzinano gli acidi grassi neutri che raggiungeranno la gonade per essere internalizzati negli oociti pre-vitellogeni.

Il fegato del tonno rosso presenta delle variazioni stagionali nel contenuto lipidico: essendo una specie *capital breeding* accumula notevoli riserve lipidiche nel periodo non riproduttivo, al fine di utilizzarle durante la stagione riproduttiva successiva (Lubzens et al., 2010).

Il tessuto epatico è considerato un buon bioindicatore dello stato di salute di un organismo, perché ha un ruolo importante nei processi anabolici e catabolici e nel metabolismo delle sostanze xenobiotiche.

1.12 Sistema immunitario

Il sistema immunitario ha il compito di rispondere a potenziali agenti esterni dannosi (virus, batteri, funghi, molecole chimiche estranee) e di eliminarli, attraverso l'induzione di una varietà di cellule e fattori secreti che lavorano in maniera sinergica e che vanno a costituire questo meccanismo di difesa e protezione. Il processo di stimolazione della risposta immunitaria comincia con il riconoscimento dell'antigene specifico e, in seguito, sono necessarie ulteriori cellule accessorie per l'elaborazione e la regolazione. Gli organi principalmente coinvolti nel sistema immunitario sono il rene, il tratto digestivo e il fegato: quest'ultimi ospitano cellule immunitarie coinvolte nella fagocitosi o la produzione di immunoglobuline.

La risposta immunitaria può essere di due tipi: la prima è una risposta innata (naturale e non specifica) e la seconda è acquisita o adattativa.

La risposta immunitaria innata riconosce sostanze nocive inorganiche ed organiche o l'ingresso di patogeni già noti: vengono riconosciuti attraverso i PRRs (*pattern recognition receptors*) che hanno un ruolo chiave nella segnalazione intracellulare del sistema immunitario. L'immunità acquisita o adattativa, invece, è indotta dalla presenza di xenobiotici e/o patogeni nuovi: è caratterizzata dall'elevata specificità degli anticorpi e dalla capacità di memorizzazione cellulare. Questa immunità adattativa consta di due risposte:

una umorale, mediata dai linfociti B, e cellulare, mediata dai linfociti T, implicati direttamente nella regolazione del sistema immunitario e l'attivazione di differenti immunoglobuline (Igm, IgD, IgH). Gli organi linfoidi primari sono il rene anteriore e posteriore, i tessuti linfoidi associati alla mucosa dell'intestino e della pelle (MALT, GALT e SALT) (Salinas, 2015). Le cellule linfocitarie e mielocitarie sono prodotte dagli organi linfoidi ed esercitano una funzione immunitaria (Stosik et al., 2018)

Il fegato è un organo complesso dal punto di vista immunitario, sulla superficie esterna sono presenti i linfociti B in grado di riconoscere determinati agenti.

Il fegato è responsabile della produzione di proteine deputate alla risposta infiammatoria a partire dai linfociti durante la fase acuta, ad esempio regola la produzione di citochine rilasciate dal TFH (*T follicular helper cells*), coinvolte nell'immunità adattativa, le quali stimolano l'attivazione e la proliferazione di altri linfociti o richiamano in sede di infezione altre cellule coinvolte nella risposta immunitaria come i macrofagi o i neutrofilo o IgM e IgD (Nguyen et al., 2008).

1.13 Melanomacrofagi

Nel fegato, in particolare, vi sono cellule fagocitarie implicate nella risposta immunitaria innata: i melanomacrofagi (MMs) che possono aggregarsi a formare i centri di melanomacrofagi (MMCs). Questi particolari macrofagi presentano tre tipi di pigmenti: la melanina, la lipofuscina/ceroide e l'emosiderina, tutti rispettivamente con diverse funzioni (Agius & Roberts, 2003). La melanina deriva dalla fagocitosi dei melanociti che contengono melanina e si ipotizza che sia coinvolta nella neutralizzazione dei radicali liberi formati a seguito della rottura delle membrane cellulari. Wolke et al., nel 1985, suggeriscono che la melanina potrebbe essere coinvolta nella produzione di composti ad azione battericida, tra cui il perossido di idrogeno e i loro precursori chinonici. Questi composti risultano essere importanti per i pesci eterotermi visto che la loro attività enzimatica può essere molto ridotta alle basse temperature (Agius & Roberts, 2003).

La lipofuscina deriva dalla polimerizzazione ossidativa degli acidi grassi polinsaturi, prodotto di scarto della disgregazione dei lisosomi ed è ritrovata anche in pesci con carenze nutrizionali.

L'emosiderina è un pigmento marrone, granulare, relativamente insolubile contenente una proteina e un ferro componente (ferrico), in stretta associazione con i granuli di lipofuscina. Tale pigmento deriva da due meccanismi

principali: aumento del contenuto emosiderina-ferro in seguito al catabolismo degli eritrociti danneggiati e dall'aumento di ferro all'interno dei MMC con funzione di protezione (Agius & Roberts, 2003). Studi evidenziano che gli MMC e MM sono presenti nei tessuti ematopoietici e, attraverso meccanismi di diapedesi e migrazione all'interno dei vasi sanguigni, anche nelle gonadi (Roberts & Agius, 2008; Agius & Roberts),

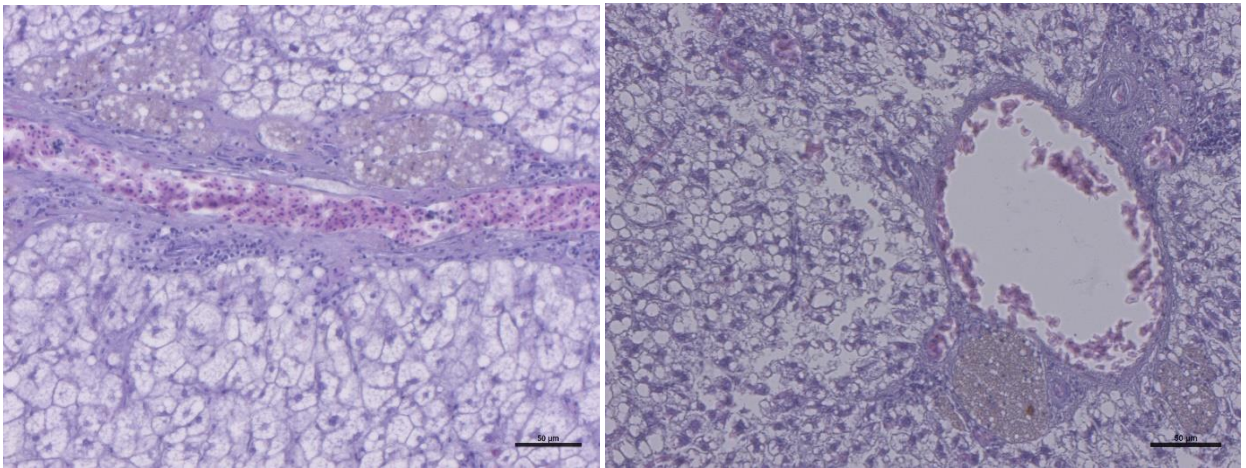


Fig. 10 Tessuto epatico del tonno rosso campionato, in cui si notano i MMC presenti nelle vicinanze dei vasi sanguigni

In un interessante studio sulla caratterizzazione 3D dei MMC in *Myoxocephalus scorpius*, gli autori hanno analizzato gli MMC nel fegato, nel pancreas e nelle branchie: è stato osservato che i centri erano ben strutturati e la maggior parte dei centri nel fegato erano strettamente associati alla parete dei vasi sanguigni o ai numerosi dotti biliari o ad aree necrotiche (Mai Dang et al., 2019).

I centri di melanomacrofagi sono degli aggregati di MMs capaci di fagocitare le sostanze endogene, come adipociti ed eritrociti, sostanze esogene xenobiotiche e sostanze non metabolizzate. Nel fegato del *Thunnus thynnus*, gli MMC sono osservabili in prossimità dei vasi sanguigni: per questo motivo si può dedurre che una delle loro funzioni possa essere lo stoccaggio e la raccolta degli agenti patogeni provenienti dal sangue ed essere coinvolti nel riciclo del ferro fagocitando gli eritrociti danneggiati (Roberts & Agius, 2008; Agius & Roberts, 2003). Uno studio di Qualhatoa et al., 2018 sugli MMCs di *Poecilia reticulata* suggerisce che gli MMC possono essere utilizzati come biomarcatori istopatologici per indicare l'impatto ambientale ed ecotossico degli IONPs, (*Iron Oxide Nanoparticles*) in ambiente acquatico. Gli MMs ed MMCs, quindi, sono utilizzati come biomarkers dello stato di salute degli animali e della qualità dell'acqua. La densità dei melanomacrofagi, sia essa dei singoli o dei centri, è regolata da fattori intrinseci quali l'età, il peso, sesso, condizione nutrizionale e la presenza di infezioni (batteriche, virali e/o parassitarie).

Lo studio condotto da Widdicombe et al., 2020 su milza, rene e fegato del *Thunnus maccoyii* ha evidenziato che gli MMC non erano correlati con il *condition index* (formula usata negli allevamenti per monitorare l'aumento di peso degli animali) ma che tra gli stessi individui allevati c'erano delle differenze nella densità e nella struttura degli MMC, probabilmente dovute alla

mancanza di una dieta variegata come in natura. Inoltre, lo stesso studio ha trovato una correlazione significativa tra l'area coperta dagli MMC e la dimensione degli animali (Saha et al., 2002). Uno studio recente del 2021 (Viana et al., 2021) ha valutato il numero di MMC nel fegato di giovanili e adulti di *Sciades herzbergii* provenienti da aree con diversi livelli di inquinamento, riscontrando un numero maggiore di MMC negli animali campionati nelle prime zone più inquinate ed è stata dimostrata una correlazione tra l'aumento di MMC e la stagione delle piogge, visto che nel fiume sono riversate sostanze organiche e tossiche provenienti da attività di acquacoltura, le quali, in questo periodo, causano un decremento dell'ossigeno disciolto, indispensabile per molte specie acquatiche.

2. SCOPO DELLA TESI

Thunnus thynnus è una delle risorse ittiche più importante sul mercato ittico internazionale.

L'obiettivo di questa tesi è acquisire le conoscenze sul sistema immunitario/detossificazione e sull'accumulo lipidico nel periodo post-spawning degli esemplari di tonno rosso tenuti in condizioni di allevamento, focalizzando l'attenzione su individui femminili.

In questo studio, si andranno a valutare se ci sono correlazioni significative tra i parametri biometrici quali il peso e la lunghezza, e il contenuto di lipidi e MMs/MMCs nel fegato, in seguito al trattamento all'ingrasso. A tal proposito, le analisi istologiche del fegato sono necessarie per identificare e quantificare gli MMCs, MMs e l'accumulo lipidico nella valutazione dello stato di salute degli individui in condizione di cattività.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Per questo studio sono stati analizzati 29 femmine di *Thunnus thynnus* catturati con reti a circuizione (*purse seiner*), in Mar Tirreno centrale e in Mar Mediterraneo meridionale (sud di Malta) e ingrassati successivamente nella *farm* di Malta. Il periodo di cattura è avvenuto tra il mese di maggio e quello di giugno 2020, per poi essere trasportati vivi per mezzo di tug alla farm di ingrasso, in cui sono stati nutriti per un totale di circa 6 mesi fino alla data di campionamento sulla factory ship (20/11/2020). In accordo con le linee guida stipulate dall'ente ICCAT, sono stati presi i dati biometrici degli animali e prelevati il fegato e la gonade di 29 femmine di tonno rosso: SFL (Straight fork length), CFL (curved fork length), LD1 (First Dorsal Length) e peso (TBW) (Tab. 1). L'attività di campionamento è stata sincronizzata con la squadra tecnica-scientifica operante per il piano di ricerca annuale GBYP (Grand Bluefin Tuna Year Program 2020, PHASE 10). È stato possibile stimare l'età degli esemplari presi in esame tra i 4 e i 10 anni (Api et al., 2018).

ID sample	Weight (kg)	SFL (cm)	Sex	Site of catching	Stage
21	74	136	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
10	82	146	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
3	94	154	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
15	109	167	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
4	113	172	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
18	113	181	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
5	117	171	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
39	123	174	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)
23	125	156	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
31	130	177	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
14	135	180	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
28	148	182	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)
24	158	189	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)
6	158	178	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
22	170	173	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
34	172	176	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)
25	182	190	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
19	185	200	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
30	187	204	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)
16	195	201	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
29	198	190	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)
35	198	170	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)
7	200	207	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
37	202	207	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)
38	206	210	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)
27	208	210	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)
36	229	207	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)
26	240	214	F	South Mediterranean Sea	Inactive Mature (IM)
40	262	211	F	Central Tyrrhenian Sea	Inactive Mature (IM)

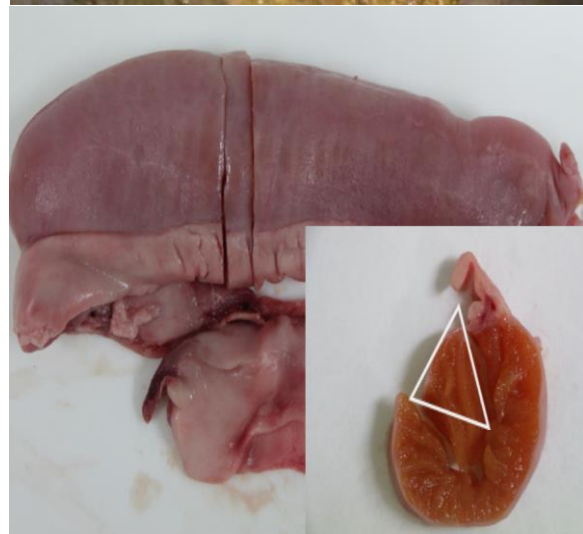
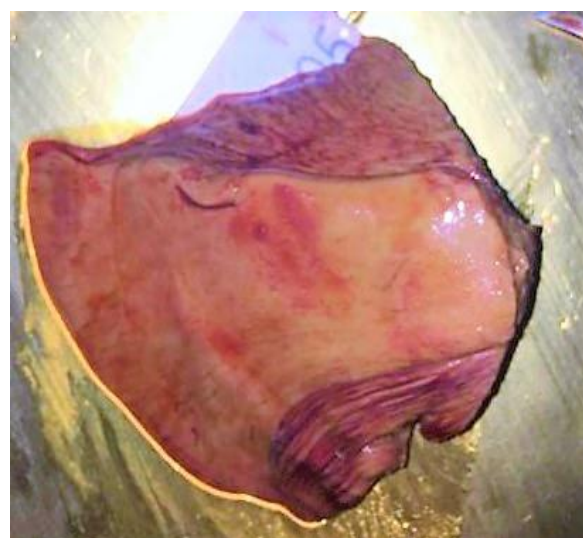
Tab 1. La tabella mostra i dati biometrici, il sesso e sito di cattura degli individui analizzati.

3.2 Analisi Istologiche

Per ogni animale sono state campionate porzioni di 6 mm² di fegato e gonade per le analisi istologiche. I campioni di fegato sono stati presi casualmente, essendo questo un organo regolare ed omogeneo in tutte le sue parti (*fig 12*). I campioni sono stati inseriti in eppendorf da 0,5 ml e fissati in formol (formaldeide/glutaraldeide). La gonade invece è stata campionata in modo trasversale per osservare e prelevare parte della tunica albuginea, delle lamelle ed del lumen ovarico (*fig 11*) per poi essere fissati in formol (formaldeide/glutaraldeide) porzioni di circa 6 mm² e conservati a 4°C fino al loro utilizzo

Successivamente, campioni di fegato e gonade di ogni animale, di circa 3-4 mm², sono stati inseriti in biocassette (Bio-Optica, Milan, Italy) per l'inclusione in paraffina. Al fine di disidratare e rimuovere il fissativo dai ogni campione, ogni biocassetta è stata immersa in concentrazioni crescenti di etanolo (50%,70%, 80%, 95%, 100% I e 100% II) e infine in xilene

per 45 minuti. I campioni, poi, sono stati immersi in paraffina bianca per 2h e



successivamente in paraffina blu per 1.30h. Al termine, i campioni sono stati posti in blocchetti paraffina e lasciati solidificare overnight. Ogni campione è stato tagliato in sezioni di 4 μm con l'utilizzo del microtomo (Leica RM2125 RTS): sono state tagliate 5 sezioni, una ogni 40 μm , per campione di fegato e poste su un vetrino e 3 sezioni, una ogni 40 μm , per ogni campione di gonade. I campioni sono stati sottoposti al processo di colorazione con ematossilina/eosina di Mayer e infine montati, sotto cappa chimica, con l'ausilio di un mezzo di montaggio SafeMount® (Bio-Optica, Milan, Italy).

I campioni di fegato e di gonade sono stati visualizzati con il microscopio ottico Zeiss Axiocam 105 color (Oberkochen, Germany).

I campioni di gonade sono stati osservati al microscopio al 10x per identificare il sesso e lo stadio riproduttivo e scattate 3 microfotografie.

Per ogni campione di fegato sono state scattate 5 microfotografie casualmente ad ingrandimento di 20x e 40x.

Le microfotografie dei campioni di fegato al 20x sono state utilizzate per la quantificazione dell'area coperta dai centri di melanomacrofagi (MMCs) e dai melanomacrofagi singoli (MMs). Mentre per la quantificazione dei lipidi sono state utilizzate le microfotografie al 40x. Per entrambe le quantificazioni è stato utilizzato il programma ImageJ/Fiji (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.3 Analisi Statistiche

I test di correlazione sono stati effettuati usando R-Studio tramite il pacchetto *Stats*, comando *cor.test* con il metodo *Pearson*, per valutare se ci fossero correlazioni tra le aree e le conte dei MMs e MMCs in funzione del peso e della lunghezza. Anche per i lipidi è stato effettuato il test di correlazione usando R-Studio tramite il pacchetto *Stats*, comando *cor.test* con il metodo *Pearson*, per valutare se ci fossero correlazioni tra l'area dei lipidi in funzione del peso e della lunghezza.

La significatività dei risultati acquisiti dal conteggio totale e dalle medie dell'area coperta dai MMCs e dai MMs è stata valutata con il test Anova, previa trasformazione dei valori percentuali in arcoseno utilizzando il software prisma Graphpad (GraphPad Prism version 6.04, La Jolla, California, USA) sia nelle classi di taglia in base al peso che in base alla lunghezza. Le differenze sono state considerate significative per valori di $p\text{-value} < 0.05$.

La significatività dei risultati acquisiti dalla quantificazione dell'area coperta dai lipidi è stata valutata con il test ANOVA, previa trasformazione dei valori percentuali in arcoseno utilizzando il software prisma Graphpad (GraphPad Prism version 6.04, La Jolla, California, USA) sia nelle classi di taglia in base al peso che in base alla lunghezza.

Inoltre, sono state analizzate con il metodo ANOVA, utilizzando il programma GraphPad (GraphPad Prism version 6.04, La Jolla, California, USA) anche le differenze tra gli animali prelevati dai differenti siti di cattura prima di essere portati nella *farm*.

4. RISULTATI

Le sezioni istologiche di fegato dei 29 esemplari di *Thunnus Thynnus* sono state analizzate al fine di evidenziare la risposta utilizzando come biomarker il numero e l'area dei centri di melanomacrofagi (MMCs) e dei melanomacrofagi singoli (MMs). Inoltre, è stato analizzando il contenuto lipidico, calcolandone l'area che occupa nel fegato e per comprendere le variazioni dello stesso all'interno delle varie classi di taglia analizzate.

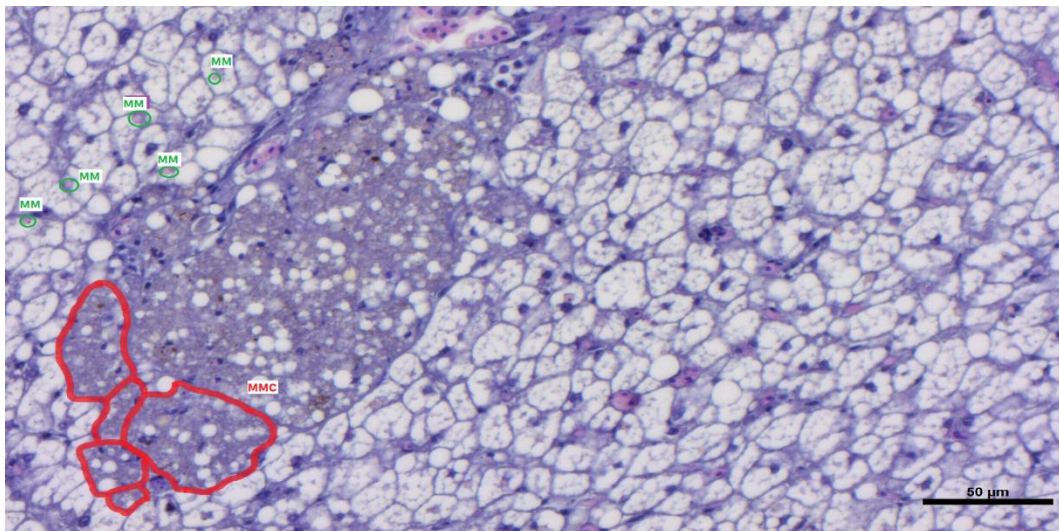


Fig 13. Sezioni di fegato di femmine IM di *Thunnus Thynnus* ad ingrandimento 20x (50 μm): MMCs in rosso e MM in verde

4.1 Melanomacrofagi

La correlazione tra l'area dei MMCs e la lunghezza mostra una relazione positiva e significativa ($r = 0,4238$; $p\text{-value} < 0.05$) (Fig. 14).

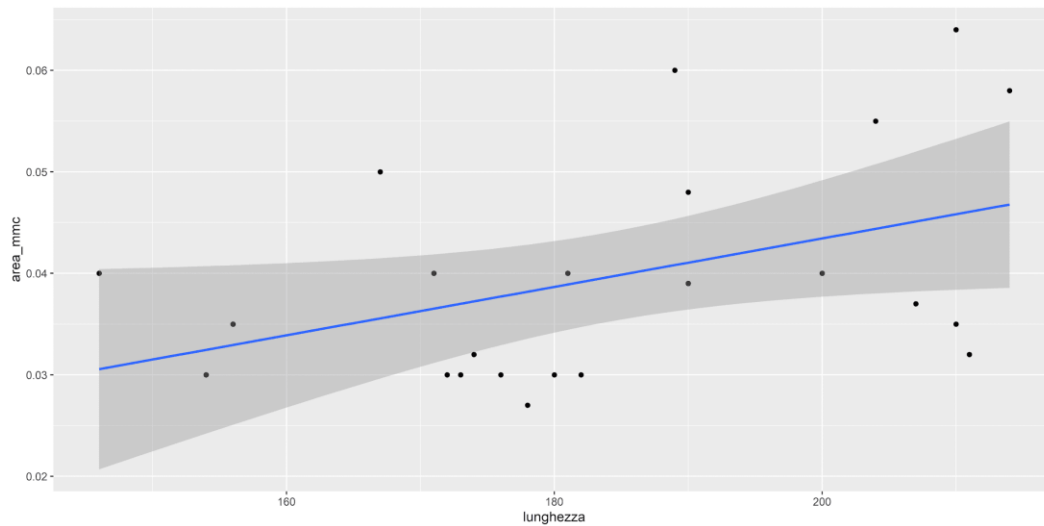


Fig. 14 grafico correlazione relativo all' area dei MMC e la lunghezza

Il test di correlazione tra l'area dei MMs e la lunghezza non evidenzia una relazione significativa ($r = 0,030304$; $p\text{-value} > 0.05$) (Fig. 15).

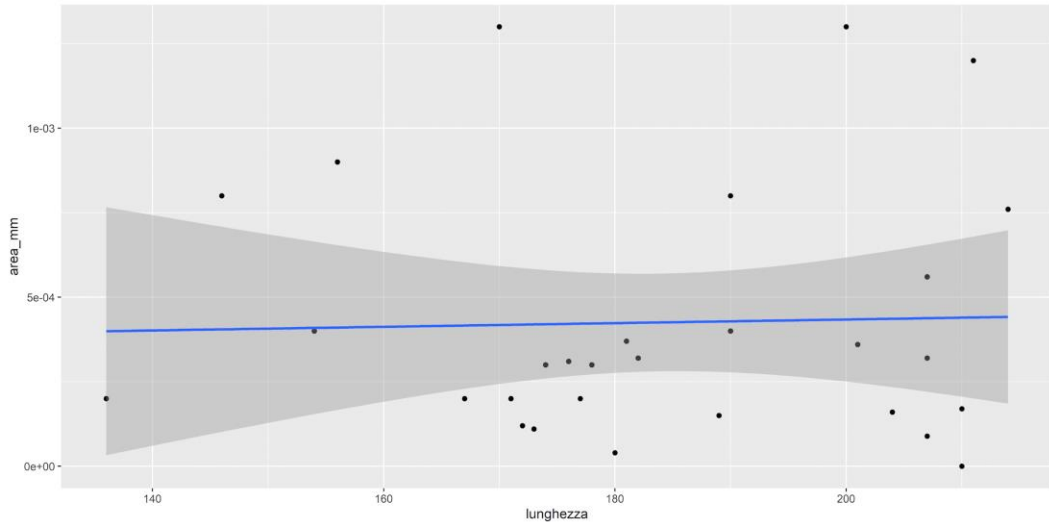


Fig 15. grafico correlazione tra area_mm e lunghezza

Le analisi statistiche effettuate con il metodo ANOVA, in Figura 16, non evidenziano differenze significative tra l'area dei MMCs e l'area dei MMs nelle varie classi di taglia in base alla lunghezza ($p\text{-value} > 0.05$). Si nota inoltre un aumento dell'area coperta dai MMCs all'aumentare della lunghezza.

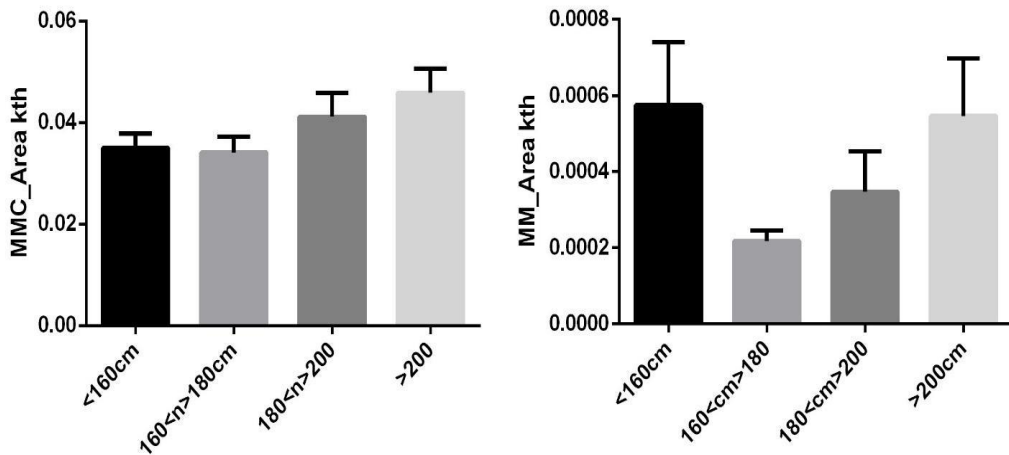


Fig 16 differenze tra l'area di MMs e dei MMCs nelle varie classi di taglia in base alla lunghezza.

Il test di correlazione tra il numero di MMCs e la lunghezza evidenzia una relazione negativa e non significativa ($r = -0,02334$, $p\text{-value} > 0.05$).

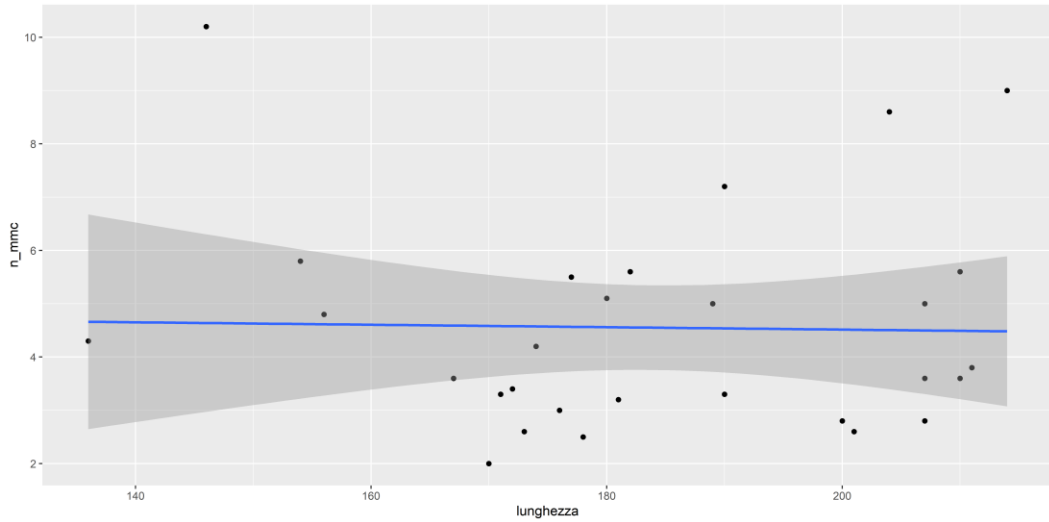


Fig.17 Grafico di correlazione tra il numero di MMCs e la lunghezza

Il test di correlazione tra il numero di MMs e la lunghezza mostra una relazione negativa e non significativa ($r = -0,06056$, $p\text{-value} > 0.05$) (Fig 18).

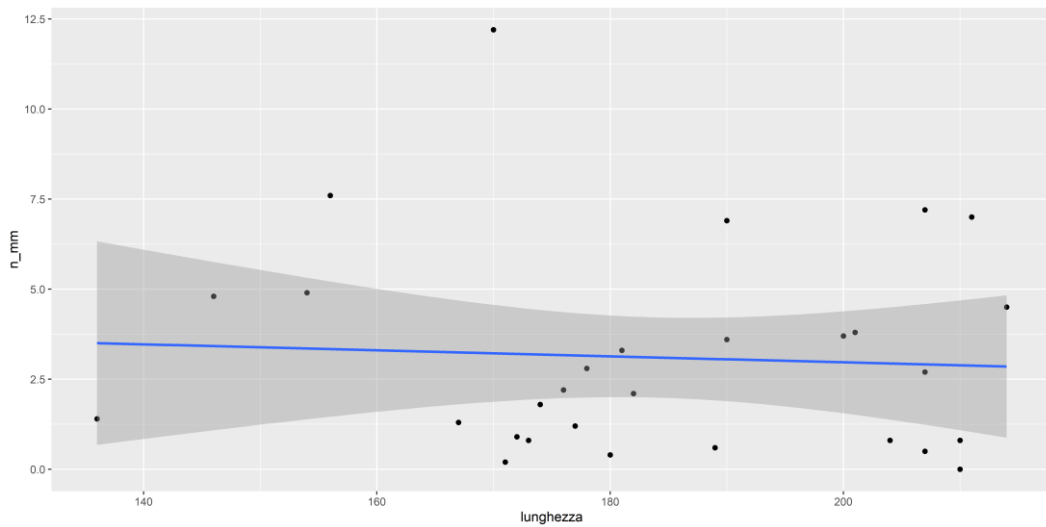


Fig. 18 - Grafico di correlazione tra il n_mm e la lunghezza

Le analisi statistiche effettuate con il metodo ANOVA, in Figura 19, non evidenziano differenze significative tra il numero di MMCs e tra il numero dei MMs nelle varie classi di taglia in base alla lunghezza ($p\text{-value} > 0.05$).

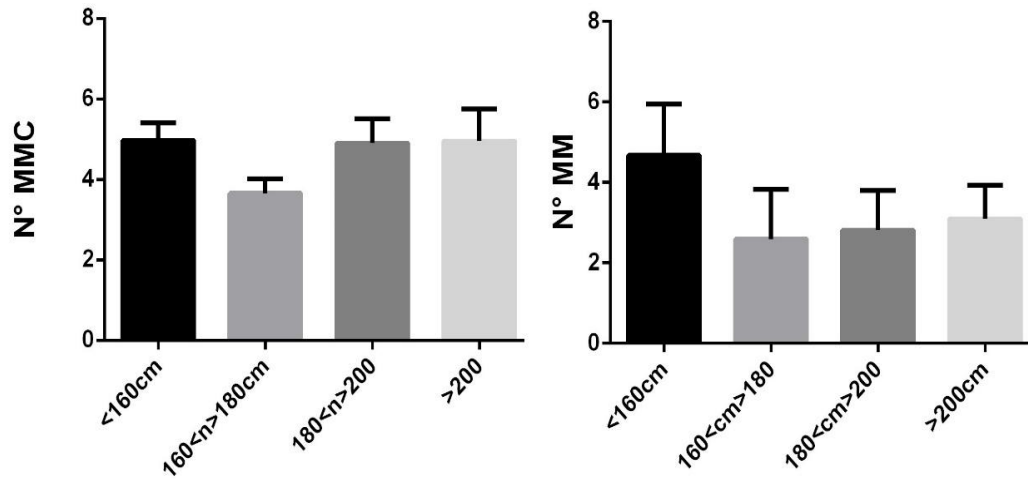


Fig.19 - differenze tra il numero di MMs e il numero di MMCs nelle classi di taglia in base alla lunghezza

Il test di correlazione tra l'area dei MMCs e il peso, in Figura 20, non evidenzia una relazione significativa e diminuisce all'aumentare del peso ($r = -0,093768$, $p\text{-value} > 0,05$).

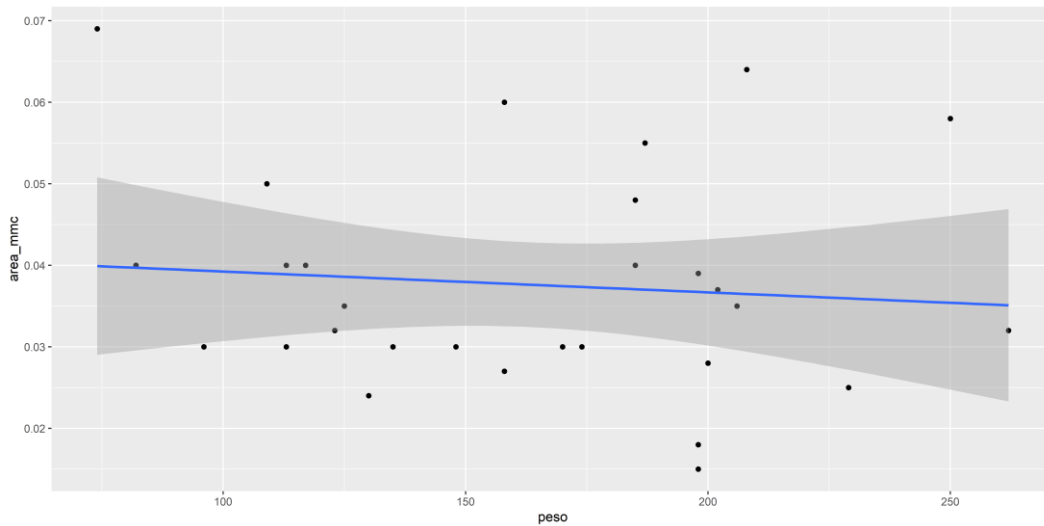


Fig. 20 - Grafico di correlazione tra l'area degli MMC e il peso

Il test di correlazione tra l'area di MMs e il peso mostra una relazione positiva e non significativa ($r= 0,285175$; $p\text{-value}>0.05$) (Fig. 21).

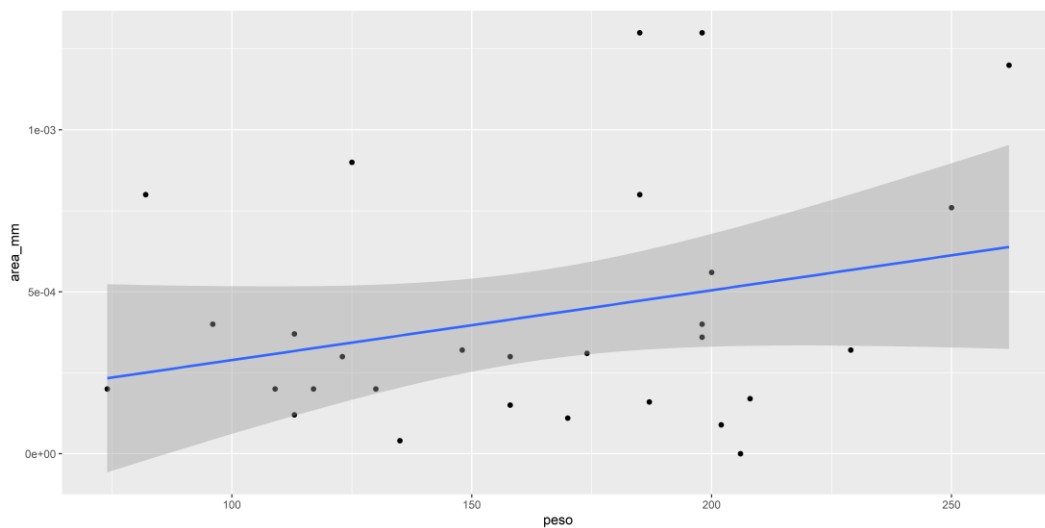


Fig. 21 - Grafico di correlazione tra l'area degli MMs e il peso

Le analisi statistiche effettuate con il metodo ANOVA, in Figura 22, non evidenziano differenze significative tra l'area dei MMCs e l'area dei MMs nelle varie classi di taglia in base al peso ($p\text{-value}>0.05$).

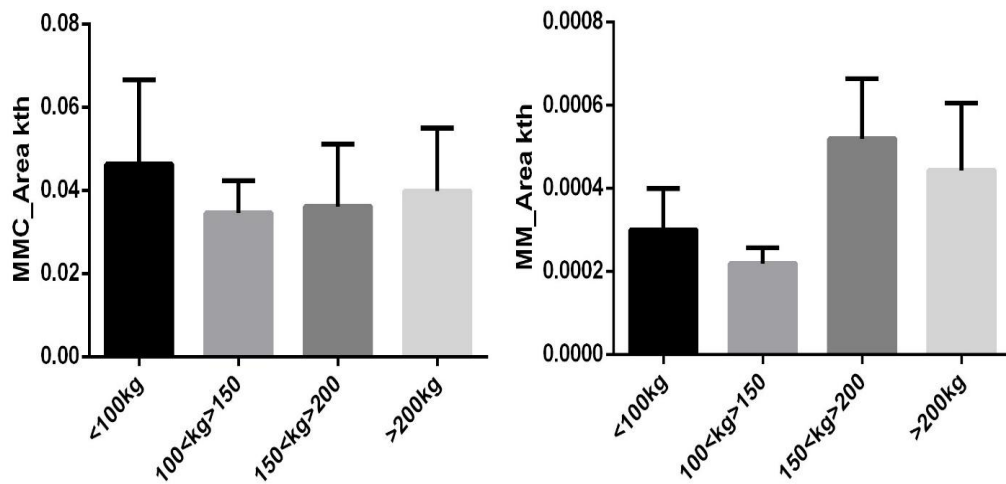


Fig. 22 - differenze tra l'area degli MMs e tra l'area degli MMCs nelle classi di taglia in base al peso

Il test di correlazione tra il numero dei MMCs e il peso non evidenzia una relazione significativa ($r = 0,092946$; $p\text{-value}>0.05$) (Fig. 23).

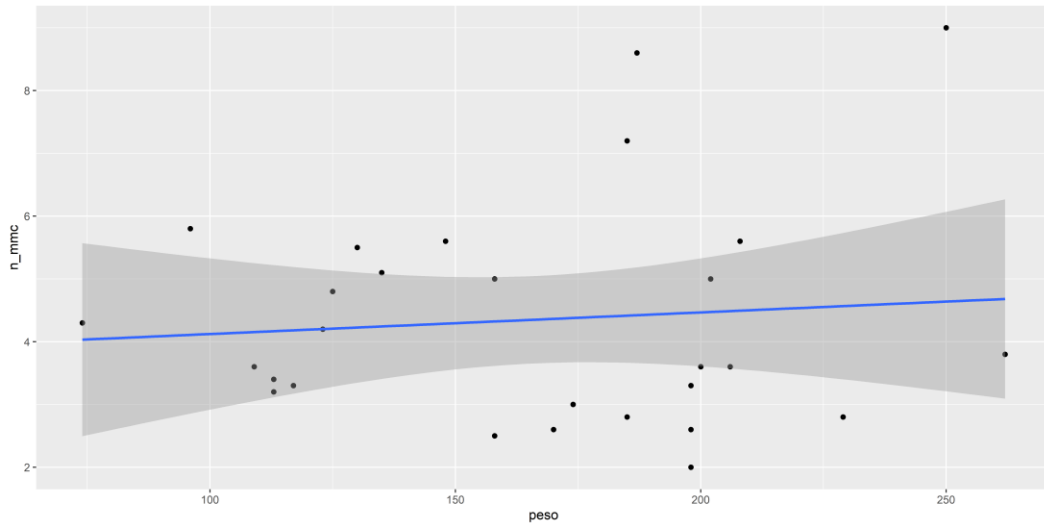


Fig. 23 - Grafico di correlazione tra il numero dei MMC e il peso

Il test La correlazione tra il numero di MMs e il peso mostra una relazione positiva e non significativa ($r = 0,23766$, $p\text{-value} > 0.05$) (Fig. 24).

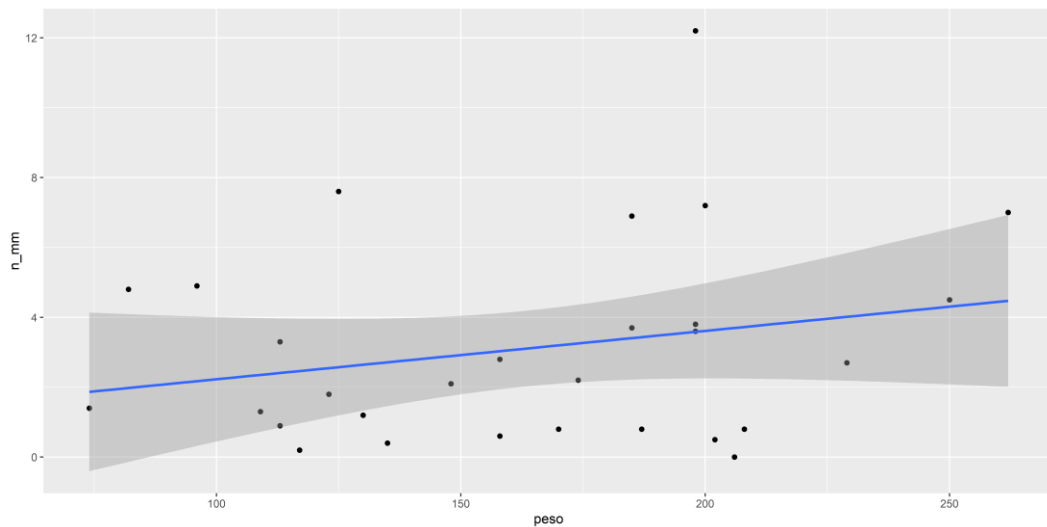


Fig. 24 - Grafico di correlazione tra il numero di MMs e il peso

Le analisi statistiche effettuate con il metodo ANOVA, in Figura 25, non evidenziano differenze significative tra il numero di MMCs e il numero dei MMs nelle varie classi di taglia in base al peso ($p\text{-value} > 0.05$).

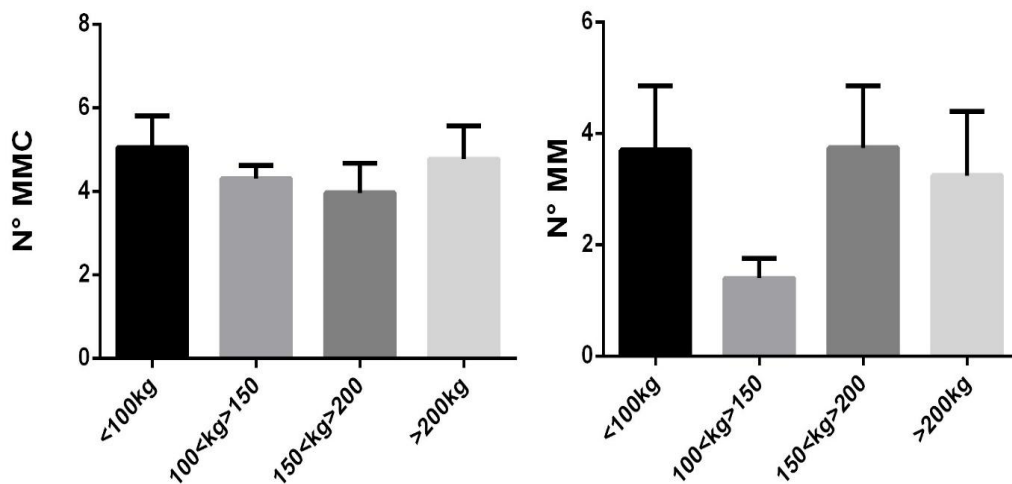


Fig. 25 — differenze tra il numero di MMs e il numero di MMCs nelle classi di taglia in base al peso

Le analisi statistiche effettuate con il metodo ANOVA, in Figura 26, evidenziano una differenza significativa ($p\text{-value} < 0.05$) tra l'area dei MMC degli esemplari proveniente da siti di cattura diversi. Gli esemplari del Mar Mediterraneo Sudorientale presentano un'area coperta dai MMCs maggiore rispetto a quelli provenienti dal Mar Tirreno. L'area dei MMs non mostra differenze significative ($p\text{-value} > 0,05$) tra i siti di cattura (Fig. 26).

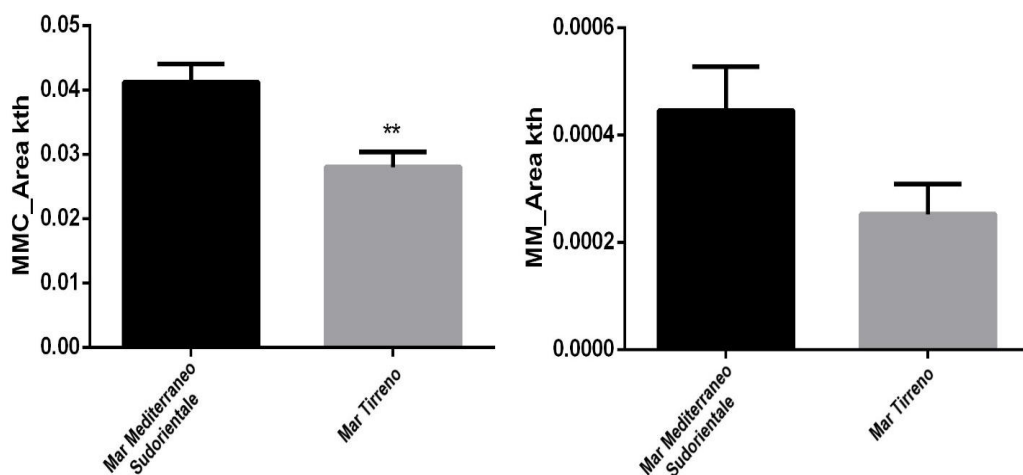


Fig. 26 - differenze tra l'area di MMs e tra l'area degli MMCs nei due siti di cattura

Le analisi statistiche effettuate con il metodo ANOVA, in Figura 27, non evidenziano una differenza significativa tra il numero di MMCs e il numero di MMs degli esemplari provenienti dai due siti di cattura ($p\text{-value} > 0,05$).

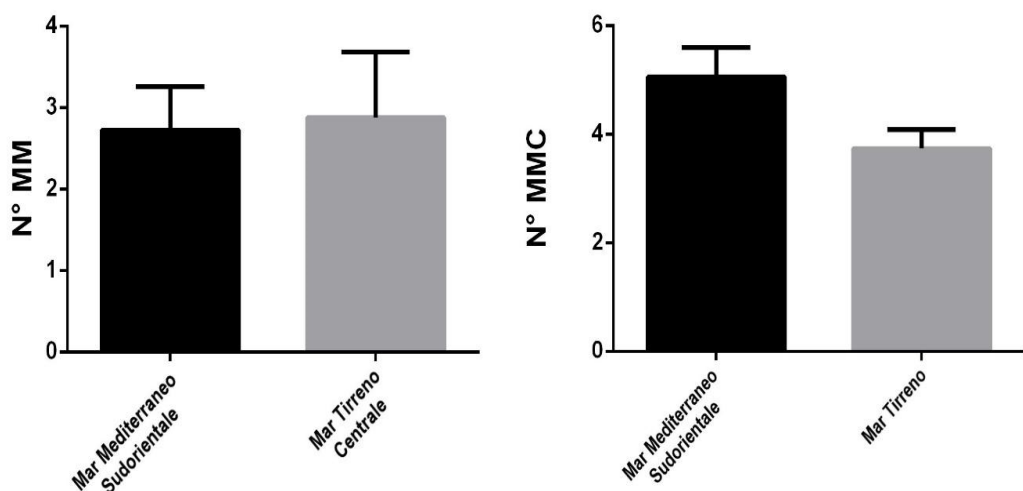


Fig. 27 differenze tra il numero di MMs e il numero di MMCs nei due siti di cattura

4.2 Lipidi

La terza parte del nostro studio si basa sulla quantificazione del grasso epatico per ognuna delle cinque sezioni istologiche di fegato di *Thunnus Thynnus* (Fig. 28).

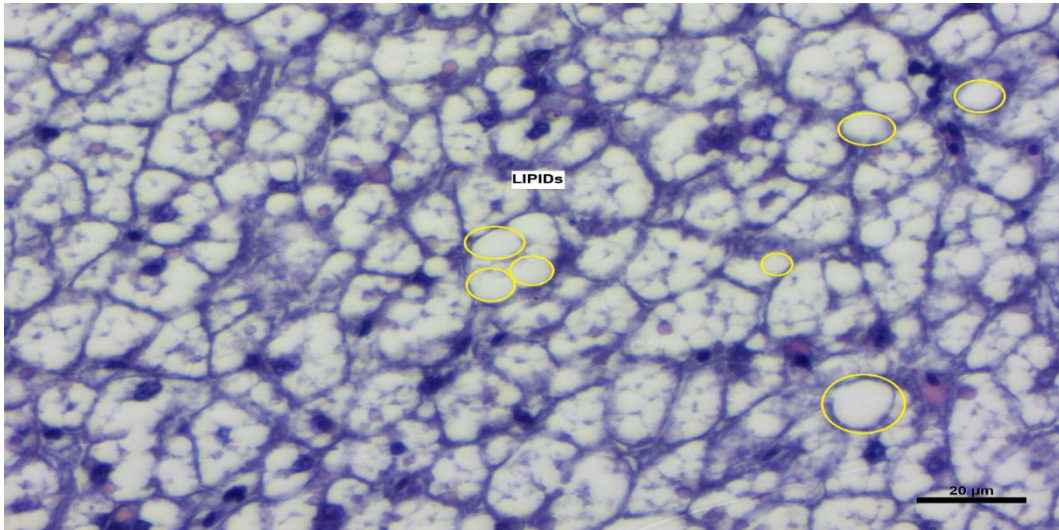


Fig 28. Sezioni di fegato di femmine IM di *Thunnus Thynnus* ad ingrandimento 40x (20 μm): i lipidi sono cerchiati in giallo.

Il test di correlazione evidenzia una relazione tra l'area dei lipidi e il peso positiva e significativa ($r=0,385092$; $p\text{-value}<0.05$) (Fig. 29).

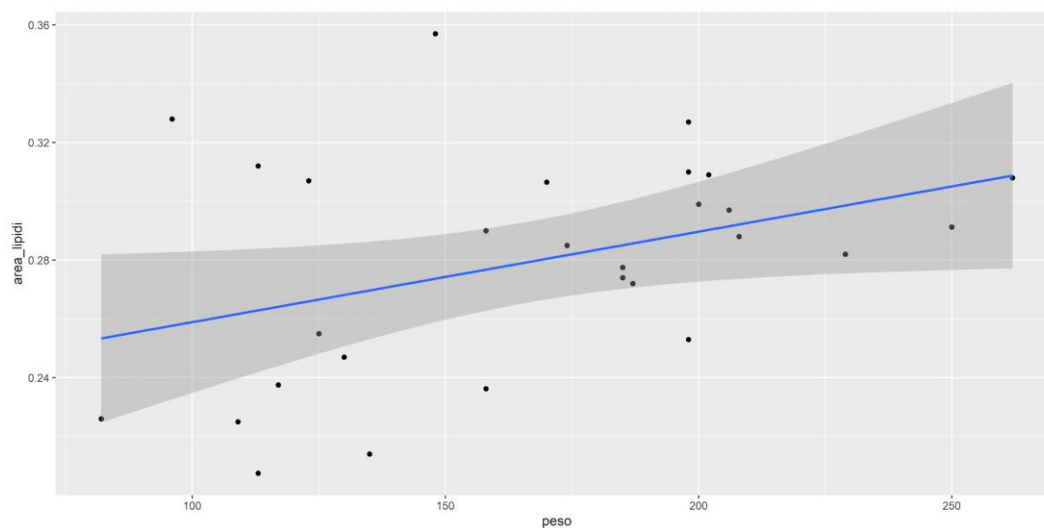


Fig. 29 - Grafico di correlazione tra l'area dei lipidi e il peso

Per quanto riguarda l'analisi dell'area dei lipidi nelle diverse classi di taglia in base al peso, non si riscontrano differenze significative ($p\text{-value} > 0.05$) (Fig. 30).

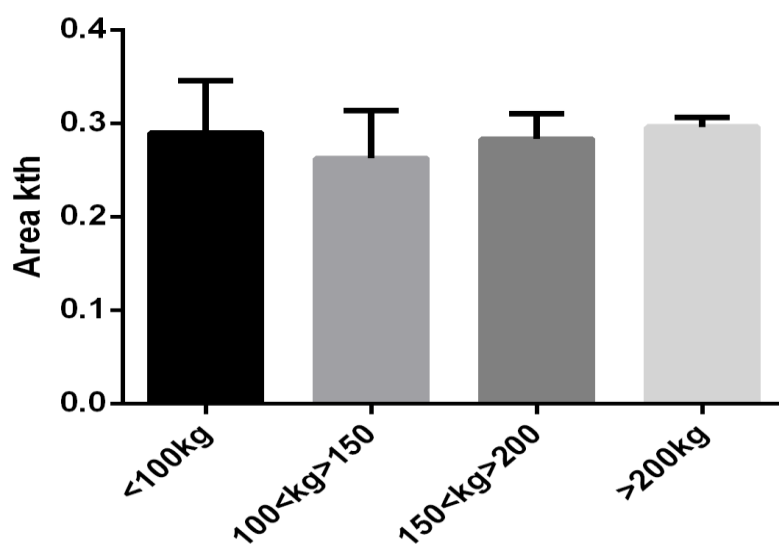


Fig. 30 - differenze dell'area dei lipidi nelle diverse classi di taglia in base al peso.

Il test di correlazione non evidenzia una relazione tra l'area dei lipidi e la lunghezza ($r=0,246009$, $p\text{-value}>0.05$) (Fig. 30).

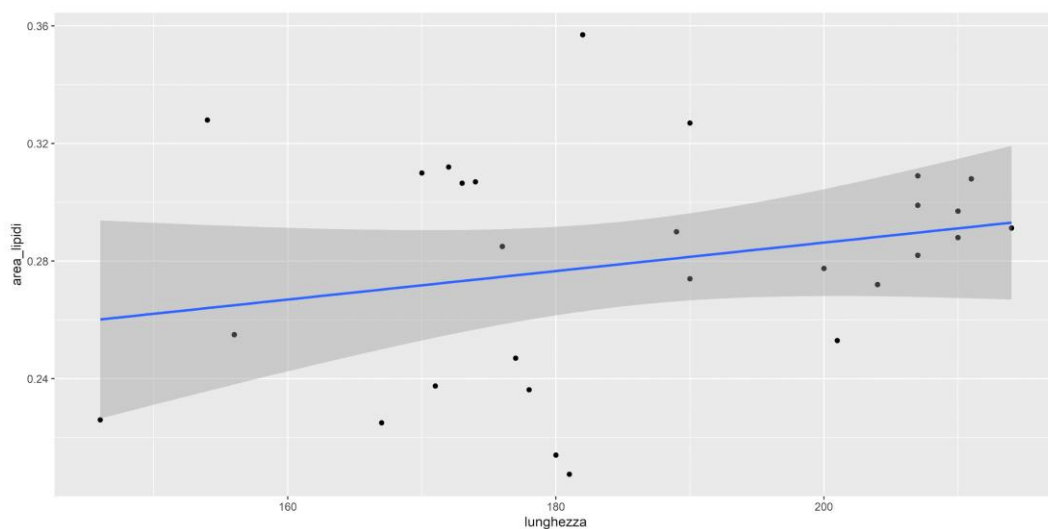


Fig. 30 - Grafico di correlazione tra l'area dei lipidi e la lunghezza

Per quanto riguarda l'analisi dell'area lipidica nelle diverse classi di taglia in base alla lunghezza, non si riscontrano differenze significative ($p\text{-value}>0.05$) (Fig. 31).

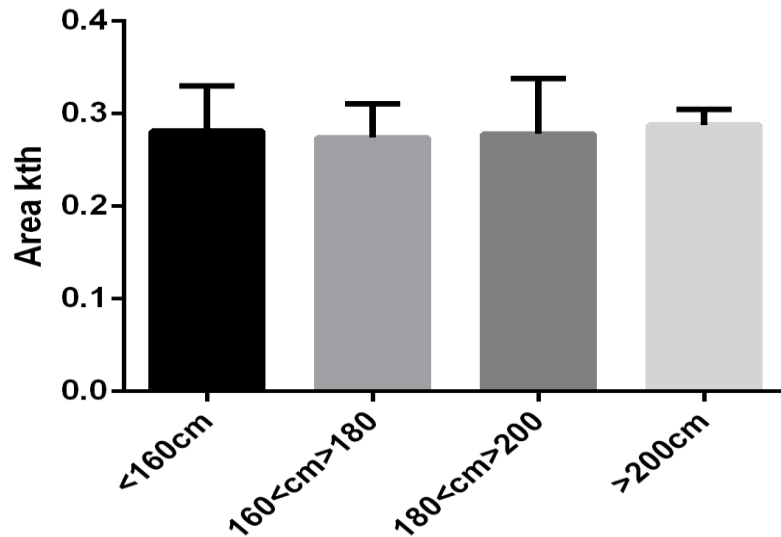


Fig. 31 - differenze dell'area dei lipidi nelle diverse classi di taglia in base alla lunghezza.

Analizzando l'area dei lipidi nei due siti di cattura si evidenzia una differenza significativa: l'area dei lipidi è maggiore nel fegato degli esemplari provenienti dal Mar Tirreno rispetto a quelli del Mar Mediterraneo Sudorientale ($p\text{-value}<0.05$) (Fig. 32).

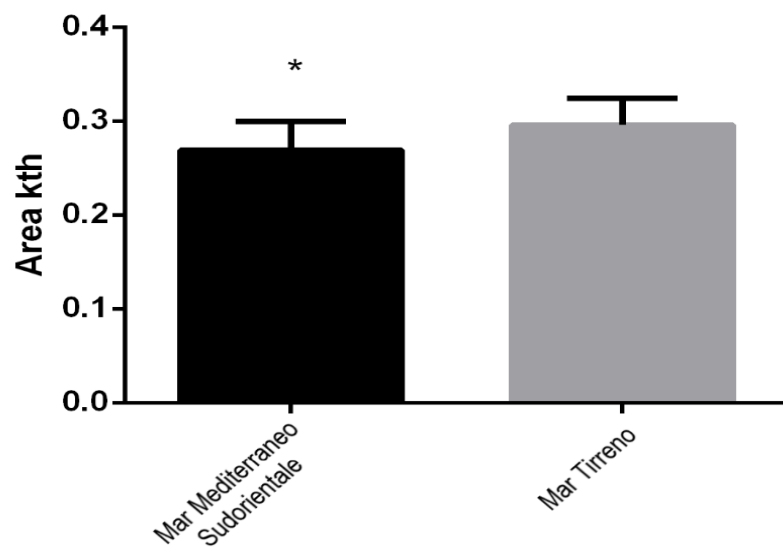


Fig. 32 - differenze dell' area dei lipidi nelle due zone di provenienza

5. Discussioni

Il *Thunnus thynnus* è una risorsa ittica di grande valore commerciale. La domanda sempre crescente di tonno rosso proviene soprattutto dalla commercializzazione di piatti della gastronomia giapponese (Scarpato et al., 2004). La risorsa è gestita dall'ICCAT per garantire un approccio cautelativo in tema di conservazione, ricerca e management degli stock ittici, al fine di assicurare il massimo rendimento sostenibile (MSY). Allo stesso tempo, l'allevamento all'ingrasso del tonno rosso ha un ruolo strategico che consente di ottenere individui con un contenuto di lipidi nei muscoli più alto rispetto al selvatico e consente di rifornire il mercato per un periodo di tempo più lungo. Gli impianti di *fattening* del tonno rosso sono di recente progettazione, operativi dal 2000: è importante, per questi impianti, acquisire ulteriore conoscenza relativamente alle condizioni in cui riversano gli esemplari per ottimizzare le *best-practices*. I risultati ottenuti in questo studio hanno fornito importanti informazioni per valutare la diversa risposta allo stress e le possibili ripercussioni sullo stato di salute al termine del periodo d'ingrasso, confrontando gli individui femminili maturi sulla base del peso, della lunghezza e dell'area di cattura. Le analisi istologiche condotte sul fegato hanno rilevato la presenza di MMCs ed MMs in tutti gli esemplari presi in esame. Le analisi statistiche confermano che l'area dei MMCs aumenta in

maniera proporzionale e significativa alla lunghezza degli esemplari: questo dato è in accordo con altri studi condotti su altre specie di teleostei che hanno evidenziato l'aumento di MMCs con l'aumento dell'età (Agius et al., 2003; Steinel et al., 2017). Inoltre, i centri di MMCs sono utilizzati come biomarker per indicare una risposta allo stress a cui l'animale è esposto in maniera cronica (Agius et al., 2003; Steckert et al., 2018). Gli individui d'età maggiore hanno avuto, durante il ciclo vitale, un'esposizione a fattori di stress più alta rispetto ad individui più giovani: tale esposizione, se prolungata, può indurre cambiamenti nel sistema immunitario, riducendo la capacità immunitaria agli stress (Agius et al., 2003; Passantino et al., 2020). Le femmine con lunghezza minore, quindi più giovani, invece, si ipotizza possiedano un sistema immunitario più efficiente ed una immediatezza di risposta ai fattori di stress acuti (Ribeiro et al., 2011; Widdicombe et al., 2020). L'immunodepressione delle femmine mature potrebbe anche essere giustificata dall'elevato dispendio energetico dovuto alla riproduzione e al numero di eventi di spawning compiuti dall'individuo, con conseguente sottrazione di energie necessarie al sistema immunitario per una risposta efficiente. In accordo con lo studio di Passantino et al., 2014, gli MMCs svolgono un ruolo importante nel riassorbimento a livello epatico dei componenti del tuorlo durante l'atresia follicolare, e che tali MMCs variano nel numero e nelle dimensioni, a seconda del numero di follicoli

atresici. Alla luce di questo risultato, quando si valutano i MMCs come biomarcatore di esposizione a stress o ad inquinanti nelle popolazioni ittiche sia selvatiche che in allevamento (Passantino et al., 2020), è importante il riconoscimento dello stadio riproduttivo e del sesso. Inoltre, gli esemplari di tonno rosso con un'età più avanzata, essendo all'apice della catena alimentare, risultano maggiormente esposti, durante il loro ciclo vitale, alla presenza di sostanze xenobiotiche nell'ambiente marino (POPs e metalli pesanti) prima del mantenimento all'ingrasso (Basilone et al., 2018; Ribeiro et al., 2011; Qualhato et al., 2018). Si suppone, quindi, che questi inquinanti si siano bioaccumulati maggiormente negli individui più grandi rispetto a quelli piccoli (Storelli & Marcotrigiano, 2005). L'area dei MMs non ha riscontrato differenze significative tra il peso, la lunghezza e l'area di cattura, ma si evidenzia un trend in aumento nel numero di MMs negli esemplari più piccoli e quindi più giovani, giustificando l'ipotesi di un loro sistema immunitario più reattivo agli stress acuti (Stosik et al., 2019). Considerando il peso degli individui, non risulta una correlazione significativa con l'area e il numero di MMCs e di MMs. Questo risultato può essere riconducibile al fatto che il peso non può essere considerato una variabile discriminante, essendo esso influenzato dal processo di ingrasso e quindi non coincidente con l'andamento del peso del tonno rosso durante il periodo non riproduttivo in condizioni naturali. Visto e considerato che non

sono state riscontrate differenze significative tra le classi di taglia, sia peso che lunghezza, è stato valutato se ci sono differenze significative nel numero e nell'area dei MMCs ed MMs sulla base dell'area di cattura. È stato possibile effettuare queste analisi poiché i dati di peso e di lunghezza attribuiti agli esemplari sono distribuiti omogeneamente in entrambe le aree di cattura. Dalle analisi statistiche si riscontra una maggiore percentuale di area di MMCs nel fegato delle femmine catturate nel Mar Mediterraneo Sudorientale rispetto a quelle catturate nel Mar Tirreno. Questa differenza potrebbe essere riconducibile al comportamento migratorio del tonno rosso, e quindi alle condizioni antecedenti al periodo di ingrasso. Secondo gli studi di Carlsson et al., 2004 e Riccioni et al., 2010, la struttura della popolazione del tonno rosso è più complessa dell'attuale ipotesi dei due stock: Mediterraneo - Golfo del Messico. Infatti studi di genetica di popolazione hanno evidenziato la presenza di due sotto-popolazioni all'interno del Mediterraneo. Altri studi di tagging elettronici hanno evidenziato che queste due popolazioni hanno comportamenti diversi (Fromentin et al., 2014; Cermeño et al., 2015): una percentuale di esemplari catturati nel Tirreno centrale è riconducibile a individui stanziali in questa zona di mare durante tutto il periodo non riproduttivo, un'altra, più migratoria, nel Mar Ionio, avallando l'ipotesi che la zona del Mar Mediterraneo Sudorientale sia un'area in cui questa specie risiede maggiormente durante la

migrazione riproduttiva. Questo risultato ci spiega che la migrazione provoca un dispendio energetico maggiore a livello metabolico e che può indurre cambiamenti nel sistema immunitario fino a renderlo meno efficiente nella risposta ai fattori di stress negli impianti di *fattening*. La seconda parte di questo studio ha avuto l'obiettivo di valutare le differenze nella quantità di lipidi nel fegato. Il fegato del tonno rosso presenta delle variazioni stagionali nel contenuto lipidico: essendo una specie *capital breeding*, essa accumula notevoli riserve lipidiche nel periodo non riproduttivo. Da questo studio si evince che, nel periodo non riproduttivo, le femmine di tonno rosso tenute in condizioni di ingrasso manifestano delle similarità tra gli esemplari, nonostante le diverse classi di peso e lunghezza. Inoltre, la percentuale è distribuita in modo omogeneo in ogni classe di taglia (peso e lunghezza). Questo dato evidenzia come le pratiche di ingrasso si siano ottimizzate nel tempo, in quanto lo stato di salute non varia in base alla grandezza o all'età degli esemplari. Inoltre, possiamo affermare che tutti gli individui sono alimentati ugualmente senza subire lo stress dovuto alle ridotte dimensioni spaziali o che il comportamento dei più grandi non impedisca l'alimentazione dei più piccoli. A questo punto, possiamo dedurre che gli impianti d'ingrasso off-shore del tonno rosso abbiano raggiunto delle buone pratiche operative nelle tecniche di ingrasso. Inoltre, le analisi statistiche hanno evidenziato una differenza

statisticamente significativa nella percentuale lipidica riscontrata nel fegato delle femmine mature provenienti dal Mar Tirreno centrale. Gli esemplari del Mar Tirreno sembrano accumulare ingenti quantità di lipidi nel fegato. Questi dati ci suggeriscono che queste differenze siano antecedenti al periodo d'ingrasso e non dovute alle pratiche di allevamento. Ogni individuo, sia grande che piccolo, ha ricevuto lo stesso trattamento e ha risposto alle condizioni di stress in maniera simile: si suppone, quindi, che la differenza di accumulo dei lipidi, evidenziato negli esemplari catturati nel Mar Tirreno, sia da attribuire allo stanziamento in tale zona geografica anche nel periodo post-spawning (Carlsson et al., 2004) per via dell'abbondanza di prede, che contribuisce ulteriormente l'immagazzinamento di lipidi nel fegato. Ulteriori studi, includendo anche esemplari di sesso maschile, potrebbero aggiungere nuove evidenze sullo stato di salute del tonno rosso allevato per un tempo maggiore o minore dei sei mesi, ponendo l'attenzione sul legame tra metabolismo, sistema immunitario e stadio riproduttivo.

6. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono state acquisite le conoscenze sulla risposta allo stress e sull'accumulo lipidico nel periodo post-spawning degli esemplari di tonno rosso femminili, di diversa taglia e provenienza, tenuti in condizioni di allevamento. Questa tematica, complessa per sua natura, integra la letteratura già disponibile, particolarmente quella in merito allo studio del fegato dei teleostei come bioindicatore dello stato di salute della specie. E ancora, il focus viene portato sulla quantificazione dei centri di melanomacrofagi (MMCs) e melanomacrofagi singoli (MMs) come biomarkers rilevanti nello studio della risposta allo stress quando gli esemplari vengono catturati dall'ambiente acquatico e trasferiti in impianti off-shore di accrescimento. I dati provenienti dalle analisi istologiche sono stati elaborati statisticamente per indagarne la correlazione a partire dalle differenze biometriche e quindi età, tra le femmine mature durante la stagione non riproduttiva. Lo studio ha evidenziato come l'età possa influenzare la risposta del sistema immunitario quando sottoposto ad una condizione di stress cronico; in aggiunta, anche la provenienza degli esemplari è un fattore discriminante, supponendo che la popolazione residente del Mar Tirreno presenti una risposta allo stress più efficiente al termine del processo di ingrasso. Inoltre, i dati istologici forniti dalla quantificazione dei

lipidi hanno apportato nuova conoscenza sul metabolismo lipidico del tonno rosso al termine del periodo di ingrasso. Difatti, non sono state riscontrate differenze nelle quantità lipidiche all'interno delle diverse classi biometriche, potendo così affermare che le tecniche di ingrasso negli impianti off-shore hanno raggiunto una buona prassi operativa relativamente all'omogeneità di accrescimento di tutti gli esemplari. I dati istologici, confermati dalle analisi statistiche, hanno evidenziato come gli individui femminili provenienti dal Mar Tirreno mostrino un maggiore contenuto lipidico, confermando ulteriormente l'ipotesi di una possibile sub-popolazione residente che risponde diversamente in condizioni di *fattening*. In conclusione, questo studio getta le basi per ulteriori approfondimenti sullo stato di salute del tonno rosso in condizioni di ingrasso, per valutare se il metabolismo lipidico e la risposta allo stress cambino al variare della durata del periodo di ingrasso, dell'età o del sesso degli esemplari.

RINGRAZIAMENTI

In primis, un ringraziamento alla mia relatrice la Professoressa Gioacchini Giorgia, per la sua immensa disponibilità, per i suoi indispensabili consigli durante le lezioni in classe, per la predilezione con cui ha trasmesso le conoscenze durante tutto il percorso, ma prima di tutto per aver trasmesso l'importanza della figura professionale del biologo marino in ambito sociale culturale e lavorativo. Ringrazio la mia correlatrice Filippi Sara, per la sua pazienza, per la sua chiarezza espositiva e per i suoi insegnamenti nelle tecniche di laboratorio. Ringrazio la professoressa Carnevali per la sua disponibilità per avermi fatto svolgere il progetto di tesi presso il laboratorio di Biologia dello Sviluppo e della Riproduzione, nell'Università Politecnica delle Marche.

Un ringraziamento al Capitano P.Pignalosa, con cui ho condiviso il principio di questo elaborato e per insegnarmi a spiegare le vele per cogliere il vento.

Un ringraziamento alla squadra scientifica di Oceanis con cui ho condotto il campionamento, al coordinatore Lombardo Francesco, alla squadra composta da: Pappalardo Luigi, Coco Ornella e Firmamento Roberto, grazie per l'integrazione in squadra e per i consigli.

“Non chi comincia ma quel che persevera”

BIBLIOGRAFIA

Agius, C., and R. J. Roberts. "Melano-macrophage centres and their role in fish pathology." *Journal of fish diseases* 26.9 (2003): 499-509.

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

Aguado, F., F. J. Martinez, and B. Garc'ia-Garc'ia. In vivo total nitrogen and total hosphorus digestibility in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus* Linnaeus, 1758) under industrially intensive fattening conditions in Southeast Spain Mediterranean coastal waters. *Aqua. Nutr.*, 10: 413–419 (2004).

Ailloud, L. E., Lauretta, M. V., Hanke, A. R., Golet, W. J., Allman, R. J., Siskey, M. R., ... & Hoenig, J. M. (2017). Improving growth estimates for Western Atlantic bluefin tuna using an integrated modeling approach. *Fisheries Research*, 191, 17-24.

Api, M., Bonfanti, E., Lombardo, F., Pignalosa, P., Hardiman, G., & Carnevali, O. (2018). Effects of age on growth in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *General and comparative endocrinology*, 265, 64-70.

Basilone, G., Gargano, A., Corriero, A., Zupa, R., Santamaria, N., Mangano, S., ... & Passantino, L. (2018). Liver melanomacrophage 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.

Belmonte, A., and F. de la G´andara. El cultivo del at´un rojo (*Thunnus thynnus*) [The culture of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*)]. Cuadernos de Acuicultura, Vol 2. Fundaci´on Observatorio Espa˜nol de Acuicultura, Madrid, Spain, 37 pp. (2008).

Block, B. A., Dewar, H., Williams, T., & Prince, E. D. (1998). Archival tagging of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). Marine Technology Society. *Marine Technology Society Journal*, 32(1), 37.

Busawon, D. S., Rodriguez-Marin, E., Luque, P. L., Allman, R., Gahagan, B., Golet, W., ... & Secor, D. H. (2015). Evaluation of an Atlantic bluefin tuna otolith reference collection. *Collect Vol Sci Pap ICCAT*, 71, 960-982.

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>.

Carnevali, O., Forner-Piquer, I., & Gioacchini, G. (2020). Structure of Mature Oocytes. In *Reproduction in Aquatic Animals* (pp. 93-111). Springer, Singapore.

Cermeño, P., Quílez-Badia, G., Ospina-Alvarez, A., Sainz-Trápaga, S., Boustany, A. M., Seitz, A. C., ... & Block, B. A. (2015). Electronic tagging of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*, L.) reveals habitat use and behaviors in the Mediterranean Sea. *PLoS One*, 10(2), e0116638.

Charni-Natan, M., Aloni-Grinstein, R., Osher, E., & Rotter, V. (2019). Liver and steroid hormones—can a touch of p53 make a difference?. *Frontiers in endocrinology*, 10, 374.

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.

Claro, R., Lindeman, K. C., & Parenti, L. R. (Eds.). (2014). *Ecology of the marine fishes of Cuba*. Smithsonian Institution.

Dang, Mai, et al. "Characterisation and 3D structure of melanomacrophage centers in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*)." *Tissue and Cell* 57 (2019): 34-41.

Dewar, H., & Graham, J. (1994). Studies of tropical tuna swimming performance in a large water tunnel-Energetics. *The Journal of experimental biology*, 192(1), 13-31.

Dragovich, Alexander. "The food of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the western North Atlantic Ocean." *Transactions of the American Fisheries Society* 99.4 (1970): 726-731.

Eckert, 1985. *Fisiologia animale: meccanismi e adattamenti*. Zanichelli, Bologna.

Faillottaz, R., Beaugrand, G., Goberville, E., & Kirby, R. R. (2019). Atlantic Multidecadal Oscillations drive the basin-scale distribution of Atlantic bluefin tuna. *Science advances*, 5(1), eaar6993.

Farwell, C. J. Management of captive tuna: Collection and transportation, holding facilities, nutrition, growth and water quality, pp. 65–68. In: *Cahiers Options Méditerranéennes*, vol. 60: Domestication of the Bluefin Tuna *Thunnus thynnus thynnus* (Bridges, C. R., H. Gordin, and A. Garcia, Eds.). Zaragoza, Spain, CIHEAM, Instituto Agronomico de Zaragoza (2003).

Fromentin, J., Powers, J.E., 2005. Atlantic bluefin tuna : population dynamics , ecology , fisheries and management 281–306.

Fromentin, J., Powers, J.E., 2005. Atlantic bluefin tuna : population dynamics , ecology , fisheries and management 281–306

Fuentes, E.N., Björnsson, B.T., Valdés, J.A., Einarsdottir, I.E., Lorca, B., Alvarez, M., Molina, A., 2011. IGF-I/PI3K/Akt and IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, R1532– R1542.

Goetz, F. W. (1983). 3 Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. *Fish physiology*, 9, 117-170.

Graham, J.B. & Dickson, K.A. 2001. Anatomical and physiological specializations for endothermy. In *Tuna: Physiology, cology and Evolution*. B.A. Block & E.D. Stevens (eds). Academic Press, San Diego, CA, USA. *Fish Physiology Series*, 19: 121–166.

Grande, M., Murua, H., Zudaire, I., Arsenault-Pernet, E. J., Pernet, F., & Bodin, N. (2016). Energy allocation strategy of skipjack tuna *Katsuwonus*

pelamis during their reproductive cycle. *Journal of fish biology*, 89(5), 2434-2448.

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. Report of the 2017 ICCAT Bluefin stock assessment meeting. Madrid, 20-28 July 2017: 1-106.

ICCAT. Recommendation amending the recommendation by ICCAT to establish a multiannual recovery plan for bluefin tuna in the eastern Atlantic and Mediterranean. Madrid, International Committee for the Conservation of Atlantic Tuna, p. 28 (2008a).

Johnston, I. A. (1981). Structure and function of fish muscle. In *Symposium Zool. Soc. Lond.* (Vol. 48, pp. 71-113).

Karakulak, S., Oray, I., Corriero, A., Deflorio, M., Santamaria, N., Desantis, S., & De Metrio, G. (2004). Evidence of a spawning area for the bluefin

tuna (*Thunnus thynnus* L.) in the eastern Mediterranean. *Journal of Applied Ichthyology*, 20(4), 318-320.

Knapp, J. M., Aranda, G., Medina, A., & Lutcavage, M. (2014). Comparative assessment of the reproductive status of female Atlantic bluefin tuna from the Gulf of Mexico and the Mediterranean Sea. *PloS One*, 9(6), e98233

La Mesa, M., Sinopoli, M., Andaloro, F., 2005. Age and growth rate of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* from the Mediterranean Sea (Sicily, Italy). *Scientia Marina*, 69 (2): 241-249.

Le Menn, F., Cerdà, J., & Babin, P. J. (2007). Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In *The Fish Oocyte* (pp. 1-37). Springer, Dordrecht.

Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., & Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 367-389. Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525-539.

Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., & Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 367-389.

Manrique, W. G., Figueiredo, M. A. P., Charlie-Silva, I., de Andrade Belo, M. A., & Dib, C. C. (2019). Spleen melanomacrophage centers response of Nile tilapia during *Aeromonas hydrophila* and *Mycobacterium marinum* infections. *Fish & shellfish immunology*, 95, 514-518

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., & Garcia, 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(1), 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>.

Mommsen, T.P., 2001. Review: paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 129, 207–219.

Munday, B.L., Sawada, Y., Cribb, T. & Hayward, C.J. 2003. Disease of tunas, *Thunnus* spp. *Journal of Fish Diseases*, 26: 1–20.

Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M. (eds.), *Fish Physiology*. Vol. IX, Part A: Reproduction. Academic Press, Orlando, pp. 223-275.

Nagahama, Y., & Yamashita, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, growth & differentiation*, 50, S195-S219.

Nguyen, P. H. U. O. N. G. T. R. A. N. G., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Bloc'h, J. L., Siliart, B., & Dumon, H. (2008). Liver lipid metabolism. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 92(3), 272-283.

Ottolenghi, F. Capture-based aquaculture of bluefin tuna, pp. 169–182. In: *Capture-Based Aquaculture*, 508. (Lovatelli, A., and P. F. Holthus, Eds.). Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008).

Ottolenghi, F., Silvestri, C., Giordano, P., Lovatelli, A. & New, M.B. 2004. Capture-based aquaculture – The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails. Rome, FAO. 2004. 308 pp.

Pavesi, P. (1887). Le migrazioni del Tonno. *Rendiconti dell'Istituto Lombardo di Scienze e Lettere*, Milano, 2, 311-324.

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. (2020). Increased melanomacrophage centres in the liver of reproductively dysfunctional female greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *Journal of fish diseases*, 43(4), 503-514

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

Ribeiro, H. J., Procópio, M. S., Gomes, J. M. M., Vieira, F. O., Russo, R. C., Balzuweit, K., ... & Corrêa, J. D. (2011). Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. *Cell and tissue research*, 346(3), 417-425.

Roberts, R. J., & Agius, C. (2008). Pan-steatitis in farmed northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (L.), in the eastern Adriatic. *Journal of Fish Diseases*, 31(2), 83-88.

Rooker, Jay R., et al. Life history and stock structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Reviews in Fisheries Science*, 2007, 15.4: 265-310.

Saha, N. R., T. Usami, and Y. Suzuki. "Seasonal changes in the immune activities of common carp (*Cyprinus carpio*)." *Fish Physiology and Biochemistry* 26.4 (2002): 379-387.

Schaefer, Kurt M. "Reproductive biology of tunas." *Fish Physiology* 19 (2001): 225-270.

Sheridan, Mark A. "Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 107.4 (1994): 495-508.

Simeone, M., & Scarpato, D. (2005). La filiera del tonno rosso mediterraneo: problematiche e prospettive per il comparto in campania.

Società Italiana di Biologia Marina, notiziario s.i.b.m 2017
<https://www.assonautica.an.it/iniziative/2017/tonno/Bombace%20Tonno%201.pdf>.

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.

Storelli, M. M., Giacomini-Stuffler, R., Storelli, A., & Marcotrigiano, G. O. (2005). Accumulation of mercury, cadmium, lead and arsenic in swordfish and bluefin tuna from the Mediterranean Sea: a comparative study. *Marine pollution bulletin*, 50(9), 1004-1007. (Storelli & Marcotrigiano et.al 2005)

Stosik, Michał P., Beata Tokarz-Deptuła, and Wiesław Deptuła. "Specific humoral immunity in Osteichthyes." *Central-European journal of immunology* 43.3 (2018): 335.

STOSIK, Michał P.; TOKARZ-DEPTUŁA, Beata; DEPTUŁA, Wiesław. Melanomacrophages and melanomacrophage centres in Osteichthyes. *Central-European journal of immunology*, 2019, 44.2: 201.

Steckert, L. D., Cardoso, L., Jerônimo, G. T., de Pádua, S. B., & Martins, M. L. (2018). Investigation of farmed Nile tilapia health through histopathology. *Aquaculture*, 486, 161-169

Teo, S. L., Boustany, A., Dewar, H., Stokesbury, M. J., Weng, K. C., Beemer, S., ... & Block, B. A. (2007). Annual migrations, diving behavior, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, on their Gulf of Mexico breeding grounds. *Marine Biology*, 151(1), 1-18.

Viana, H. C., et al. "Aggregation of hepatic melanomacrophage centers in *S. herzbergii* (Pisces, Ariidae) as indicators of environmental change and

well-being." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 73 (2021): 868-876.

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). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137(3), 447-477.

Widdicombe, M., Power, C., Van Gelderen, R., Nowak, B. F., & Bott, N. J. (2020). Relationship between southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*, melanomacrophage centres and *Cardicola* spp.(Trematoda: Aporocotylidae) infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 106, 859-865.

