

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA  
FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI  
Corso di laurea in BIOLOGIA MARINA

CONTROLLO ADRENERGICO DEL METABOLISMO  
GLUCIDICO IN *Anguilla anguilla*

Tesi di laurea in: EVOLUZIONE ED ADATTAMENTI DEI VERTEBRATI MARINI

Relatore:

Prof. ELENA FABBRI

Presentata da:

ALISAR KIWAN

III Sessione

Anno Accademico 2010/2011



# **INDICE**

<b>INDICE.....</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUZIONE .....</b>	<b>3</b>
1.1 Specie e ciclo vitale .....	3
1.2 Habitat e distribuzione .....	9
1.3 La pesca dell'anguilla nelle Valli di Comacchio .....	10
1.4 Conservazione e produzione .....	13
1.5 La risposta allo stress nei pesci .....	15
1.6 Le catecolamine: biosintesi e funzioni.....	18
1.7 I recettori adrenergici e la trasduzione del segnale ormonale.....	21
1.8 La regolazione adrenergica nel fegato di teleosteo.....	24
1.9 Il metabolismo glucidico nei pesci .....	28
<b>2 SCOPO DELLA TESI .....</b>	<b>33</b>
<b>3 MATERIALI E METODI .....</b>	<b>35</b>
3.1 Prelievo delle anguille presso le Valli di Comacchio .....	35
3.2 Isolamento degli epatociti.....	37
3.3 Incubazioni e trattamento ormonale .....	39
3.4 Dosaggio del glucosio.....	40
3.5 Dosaggio del glicogeno .....	41
3.6 Dosaggio delle proteine .....	42

3.7 Estrazione RNA dai campioni .....	43
3.8 Retrotrascrizione .....	44
3.9 La PCR real time.....	45
3.10 Analisi statistica .....	49
<b>4 RISULTATI .....</b>	<b>51</b>
4.1 Misure morfometriche .....	51
4.2 Anguille gialle.....	52
4.2.1 Rilascio di glucosio da epatociti isolati dopo stimolazione ormonale .....	52
4.2.2 Inibizione dell'effetto dell'adrenalina da parte di propranololo e prazosin ...	55
4.2.3 Espressione dei geni codificanti per i recettori adrenergici di tipo $\alpha$ e $\beta$ .....	56
4.3 Anguille argentine.....	57
4.3.1 Rilascio di glucosio da epatociti isolati dopo stimolazione ormonale .....	57
4.3.2 Inibizione dell'effetto dell'adrenalina da parte di propranololo e prazosin ..	60
4.3.3 Espressione dei geni codificanti per i recettori adrenergici di tipo $\alpha$ e $\beta$ .....	62
4.4 Confronto tra i due stadi del ciclo biologico.....	63
4.4.1 Glucosio rilasciato da epatociti isolati dopo stimolazione ormonale con ADR .....	63
4.4.2 Livelli di glicogeno .....	64
4.4.3 Differenze nell'espressione genica.....	65
<b>5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</b>	<b>67</b>
<b>6 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI .....</b>	<b>75</b>

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Specie e ciclo vitale

L'anguilla europea (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1798) è un pesce teleosteo appartenente all'ordine degli anguilliformi, animali acquatici caratterizzati da un corpo serpentiforme di forma cilindrica eccezione fatta per la parte terminale del corpo che è compressa lateralmente.

L'ordine degli anguilliformi comprende circa 600 specie raccolte in 26 famiglie, tra queste le più note sono gli Anguillidi, i Congridi e i Murenidi. Una delle caratteristiche peculiari di quest'ordine è quella di avere lo stadio larvale di leptocefalo.

Regno: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclasse: Osteichthyes

Classe: Actinopterygii

Sottoclasse: Neopterygii

Infraclasse: Teleostei

Superordine: Elopomorpha

Ordine: Anguilliformes

Sottordine: Anguilloidei

Famiglia: Anguillidae

Genere: *Anguilla*

Specie: *anguilla*

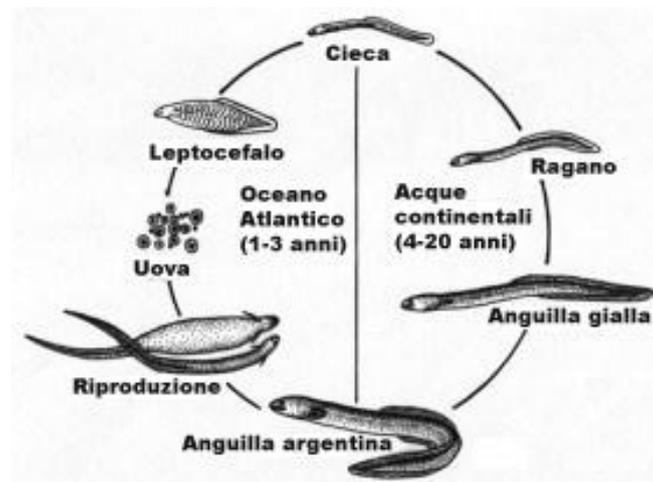
Altre caratteristiche distintive di *A. anguilla* sono rappresentate da: una bocca terminale che presenta una mandibola sporgente più lunga della mascella composta da piccolissimi denti, uguali tra loro, dalla forma conica; pinne pettorali pari ben sviluppate e di forma rotondeggiante. Il muso è allungato e depresso e la zona olfattiva comprende quattro narici divise in narici inalanti localizzate all'apice della mascella, fornite di un

piccolo tubulo e narici esalanti situate vicino all'occhio. Tra le due aperture è presente la rosetta olfattoria formata da un gran numero di lamelle che costituiscono un' ampia superficie molto sensibile agli stimoli. La cavità olfattoria è ricoperta da ciglia, il cui movimento permette il continuo flusso d'acqua sulle lamelle. Questi adattamenti ci permettono di capire che l'olfatto è il senso principale dell'anguilla, la vista al contrario non è molto efficace.

Ulteriori dettagli morfologici sono ampiamente descritti da Tesch, 2003.

Fin dalla metà del XX secolo il ciclo vitale dell'anguilla (Figura 1.1) è un mistero e, ancora oggi, molte delle sue parti non sono del tutto chiare. Alla fine del 1800 si pensava che la larva dell'anguilla fosse una specie a sé stante.

Questo piccolo pesce fu chiamato *Leptocephalus brevirostris* (Kaup, 1856) (Figura 1.2). Furono gli italiani Grassi (1896) e Calandruccio (1897) a scoprire che questo pesce altro non era che lo stadio larvale dell'anguilla.



**Figura 1.1** Ciclo biologico di *A.anguilla* (Fonte: Ontario Ministry of Natural Resources)

In seguito, un gruppo di studiosi danesi, andò alla ricerca di leptocefali sia nel Mediterraneo che nell'Atlantico (Schmidt, 1912), al fine di determinare la zona di origine di questa misteriosa specie.

La zona venne individuata nel Mar dei Sargassi, a sud delle isole Bermuda (Tesch, 2003).

L'anguilla europea è una specie catadroma il cui ciclo biologico inizia con la deposizione delle uova, da marzo a luglio, nell'areale di riproduzione. Da queste si originano i leptocefali, larve trasparenti dall'aspetto fogliaceo e forma allungata. Questi, trasportati dalla Corrente del Golfo, raggiungono le coste europee e nordafricane.



**Figura 1.2 Leptocefalo (Fonte: Wikipedia)**

Durante questo lungo viaggio, che dura 3 anni (Lecomte-Finiger, 1992), in prossimità della terra ferma, le larve vanno incontro a metamorfosi: il corpo si accorcia e si trasformano in “ceche” (Figura 1.3). In questo stadio la ceca è in grado di muoversi attivamente e raggiunge le coste italiane ad un'età compresa tra i 24 e 30 mesi (Lecomte-Finiger, 1992). In questa fase si osserva la struttura completa vera e propria: il corpo assume la classica forma serpentiforme, gli occhi sono pigmentati e funzionali, le pinne sono ben definite e compaiono le prime scaglie lungo la coda.



**Figura 1.3 *A.anguilla* allo stadio di ceca**

Inizia così la fase di risalita verso le acque interne: fiumi, valli salmastre e laghi. Una volta entrate negli estuari e nelle valli costiere, le anguille si muovono seguendo la marea entrante, per ridurre la spesa energetica. Raggiunte le acque interne e in presenza di condizioni ambientali ed alimentari adeguate, gli animali riacquistano progressivamente la pigmentazione, si assiste all'aumento di peso, di lunghezza ed all'accumulo delle riserve energetiche.

È in questa fase trofica che le anguille subiscono una nuova metamorfosi verso lo stadio di “anguille gialle” (in accrescimento e non ancora sessualmente matura; Figura 1.4). Si completa la formazione delle scaglie, gli occhi si riducono, la testa si allarga e la colorazione diventa bruna sul dorso e gialla-verdastra sui lati (Tesch, 2003). Tali trasformazioni rendono l'animale più adatto alle acque continentali.

Trascorso un periodo di tempo che può arrivare a 4-20 anni (Tesch, 2003), incomincia a completarsi lo sviluppo ed inizia la maturazione sessuale (Durif et al., 2009). L'animale va incontro ad una nuova metamorfosi nel processo definito di argentinizzazione, che sottolinea la fine della fase di crescita (anguilla gialla) e l'inizio della fase migratoria (anguilla argentina; Durif et al., 2009).



**Figura 1.4 Anguille gialle delle Valli di Comacchio (Foto: Kiwan A.)**

Gli animali maturano diversamente a seconda del sesso. Le femmine sviluppano le ovaie da una gona primordiale, i maschi passano attraverso una fase transitoria prima di sviluppare i testicoli (Davey e Donald, 2005). I maschi completano il processo di argentinizzazione più in fretta delle femmine, ma queste raggiungono una taglia maggiore (Colombo et al., 1978).

Durante la metamorfosi si assiste a notevoli cambiamenti fenotipici in cui il sistema endocrino gioca un ruolo fondamentale. La livrea diventa più scura, nera sul dorso e argentata sul ventre con alcune sfumature color bronzo lungo i fianchi, da cui il nome di anguille "argentine" (Figura 1.5). Le gonadi si sviluppano completamente, le narici si dilatano, gli occhi aumentano di diametro, la testa assume una forma più ristretta, scaglie e linea laterale diventano più marcate ed evidenti. Il tratto alimentare degenera con la chiusura del lumen intestinale e dell'ano, sancendo la fine dell'alimentazione (Pankhurst e Sorensen, 1984). Meccanismi di osmoregolazione, che permettono la vita nell'acqua salata, sono già attivi prima che l'animale lasci l'acqua dolce (Fontaine, 1975).



**Figura 1.5 Anguilla argentina delle Valli di Comacchio (Foto: Kiwan A.).**

L'argentinizzazione è un processo graduale, influenzato da fattori biotici ed abiotici. Per questo è stata proposta una classificazione più dettagliata basata su una serie di parametri interni ed esterni (Durif et al., 2009):

- ✓ Sviluppo delle gonadi
- ✓ Degenerazione del tratto digestivo
- ✓ Livelli gonadotropinici
- ✓ Diametro dell'occhio

- ✓ Lunghezza della pinna pettorale
- ✓ Fattore di condizione

Sono state così definite 5 fasi di sviluppo per le femmine:

- ✓ FI e FII, fase di crescita in cui le anguille si nutrono e cominciano a differenziarsi sessualmente (anguille gialle).
- ✓ FIII, fase premigratoria caratterizzata da alti livelli di ormone della crescita (GH) e dallo sviluppo delle gonadi.
- ✓ FIV, contraddistinta dalla produzione di gonadotropina e dalla cessazione dell'alimentazione.
- ✓ FV, contrassegnata dalla degenerazione del tratto digestivo, da alti livelli di gonadotropina e dall'allungamento della pinna pettorale.

Nei maschi invece si è osservata una minor variabilità, e vari studi hanno suggerito che il processo di argentinizzazione e il differenziamento sessuale avvengono simultaneamente (Durif et al., 2009). Si sono evidenziate solamente due fasi di sviluppo:

- ✓ I, fase indifferenziata.
- ✓ MII, fase migratoria.

Una volta avviato il processo di argentinizzazione, le anguille argentine iniziano la lunga migrazione in cui si osserva il completamento del processo di maturazione e di sviluppo sessuale (Palstra et al., 2007), per riprodursi una sola volta prima di morire. La migrazione verso il Mar dei Sargassi, per le anguille delle Valli di Comacchio, inizia di solito tra novembre e dicembre. Gli adulti parzialmente maturi abbandonano i fiumi in momenti differenti che dipendono fortemente dalle fasi lunari e dalle condizioni atmosferiche (Desaunay e Guerault, 1997). Nuotando verso sud, attraverso le correnti nord equatoriali, arrivano nel Mar dei Sargassi 6-7 mesi più tardi per riprodursi e morire (Van Ginneken et al., 2005).

Non sono mai stati reperiti organismi adulti durante il periodo della migrazione riproduttiva transoceanica, quindi molti aspetti che caratterizzano questa fase non sono noti. Grazie all'uso di trasmettitori satellitari miniaturizzati, molto recentemente si è potuto seguire lo spostamento di anguille mature partite dalle coste irlandesi e registrare il profilo di immersione e la temperatura dell'acqua. Questo ha permesso di constatare che le anguille dalle coste europee non si dirigono direttamente verso il Mar dei Sargassi, ma effettuano spostamenti batimetrici giornalieri. Inoltre nella prima parte della migrazione si muovono molto lentamente, probabilmente aiutate dalle correnti (Aarestrup et al., 2009); questo ha fatto sì che i rivelatori satellitari si siano staccati anzitempo rispetto alle previsioni, consentendo informazioni inerenti solo la prima parte del viaggio.

## **1.2 Habitat e distribuzione**

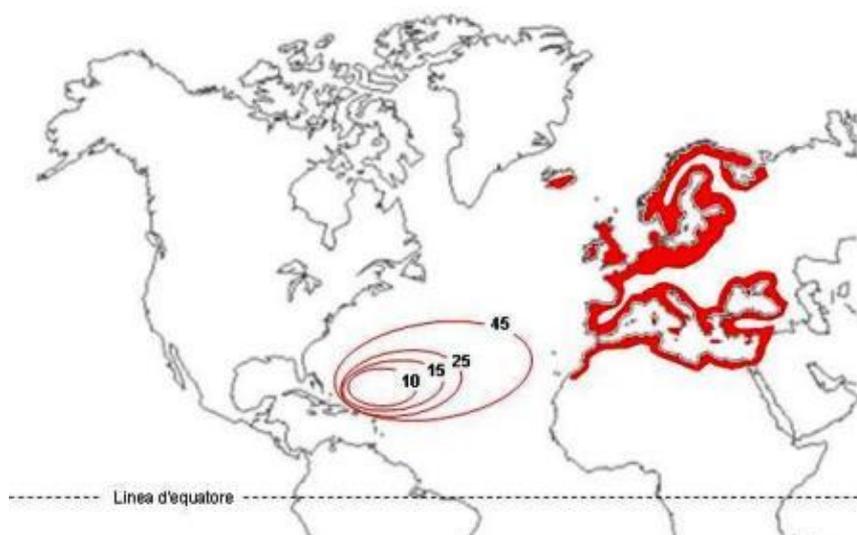
L'anguilla è un pesce estremamente resistente per la sua capacità di vivere in ambienti dove si riscontra un'alta variabilità dei parametri ambientali quali salinità, pressione e temperatura. Sopporta abbastanza bene le basse concentrazioni d'ossigeno, e in condizioni estreme può uscire dall'acqua e sopravvivere a lungo sfruttando la sua possibilità di svolgere una respirazione cutanea resa possibile da un'ampia vascolarizzazione della pelle. Queste sue caratteristiche le permettono di vivere in habitat estremamente diversificati.

Allo stadio larvale l'anguilla è un pesce di profondità; in seguito si comporta come un pesce pelagico avvicinandosi alla superficie per compiere la lunga migrazione. In mare aperto è un pesce di fondo, predilige fondali melmosi e sabbio-melmosi, la si può trovare nelle praterie a posidonia, ma anche presso i porti che possono offrire un riparo durante le mareggiate. Nella fase trofica la si trova sia in acque dolci o salmastre (lagune, foci, valli, canali...) ed è in grado di risalire i fiumi fino a diversi metri sopra il livello del mare. Preferisce substrati molli nei quali infossarsi, ma si adatta anche a fondi duri nei quali siano presenti anfratti e nascondigli.

L'anguilla è una specie notturna; durante le ore più calde del giorno infatti, rimane infossata nel fango e ve ne esce al calar del sole per andare alla ricerca di cibo. È un

animale onnivoro la cui dieta dipende molto dalle dimensioni e dallo stadio di sviluppo in cui si trova. Predilige organismi macrobentonici (crostacei, gasteropodi, gamberi, larve di insetti), uova e avannotti di pesce (Tesch, 2003).

*A. anguilla* presenta un'ampia distribuzione geografica (Figura 1.6) che comprende la parte settentrionale dell'Oceano Atlantico, il Mar Baltico, il Mare del Nord, il Mar Mediterraneo e il Mar Nero. Spazia dalle coste della Scandinavia fino a quelle del nord Africa occidentale. Nel Mar dei Sargassi è stata individuata la zona di riproduzione (Schmidt, 1922).



**Figura 1.6** Distribuzione di *Anguilla anguilla* come valutata negli anni 80. Sono indicate l'area di riproduzione e di dispersione larvale. I numeri indicano le dimensioni in mm raggiunte dalle larve secondo Schmidt. In rosso l'areale di distribuzione nelle acque continentali (fonte [www.lagunaproject.it](http://www.lagunaproject.it))

### 1.3 La pesca dell'anguilla nelle Valli di Comacchio

*A. anguilla* è rinvenibile in Italia nelle acque interne di tutte le regioni, con frequenza decrescente in relazione all'aumentare della distanza dal mare. Le Valli di Comacchio sono il luogo in cui l'anguilla è da sempre la protagonista della fauna ittica, alle quali ha conferito prestigio e notorietà in tutto il mondo. All'interno del Parco Regionale del Delta del Po (Legge Regionale del 2/7/88 n° 27), tra il fiume Po di Volano ed il fiume Reno, si estende il complesso delle aree umide delle Valli di Comacchio. Le Valli costituiscono la laguna costiera salmastra più estesa d'Italia, in origine misuravano circa

490 Km<sup>2</sup>, poi una serie di bonifiche, ha ridotto la loro superficie a circa 100 Km<sup>2</sup>. Oggi si estendono nelle province di Ferrara e in parte di Ravenna, per più di 110 Km<sup>2</sup>.

Questo complesso lagunare (Figura 1.7) è costituito principalmente da 4 bacini di acqua salmastra collegati al Mar Adriatico tramite i canali Gobbino, Logonovo, Bellocchio e Magnavacca:

- ✓ Valle Lido di Magnavacca (61 Km<sup>2</sup>)
- ✓ Valle Fossa di Porto (28 Km<sup>2</sup>)
- ✓ Valle Campo (16 Km<sup>2</sup>)
- ✓ Valle Fattibello (6,5 Km<sup>2</sup>)



**Figura 1.7 Veduta aerea delle Valli di Comacchio con casone da pesca (Foto di L.Bottaro, dal libro “Le terre del sale”)**

La profondità media è di circa 1 metro, la temperatura dell’acqua varia durante l’anno da 0 gradi a oltre i 30 gradi centigradi. La salinità può arrivare fino al 45% durante i mesi più caldi e scendere al 20% nel periodo invernale, a seconda della piovosità ed alla regolazione dei ricambi idrici col mare. (Carrieri et al., 1992). Lo specchio d’acqua principale, di circa 80 Km<sup>2</sup>, presenta acque aperte nella parte centrale e complessi sistemi di dossi, barene e cordoni dunosi emergenti nelle zone perimetrali. Tra gli argini e i dossi si scorgevano innumerevoli casoni e tabarre. Alla fine dell'Ottocento erano

attive più di 150 costruzioni che oggi, a seguito delle distruzioni belliche e delle grandi bonifiche, sono ridotte a 2 stazioni per la pesca e 7 case di vigilanza di cui solo una funzionante (Figura 1.8).



**Figura 1.8 Casa di vigilanza sulla valle (Foto: Kiwan A.)**

Le Valli rappresentano un importante ecotono di zona umida ad acqua salmastra, costituito da una molteplicità di habitat presenti e dalla ricchezza di specie florofaunistiche rilevanti da un punto di vista conservazionistico. Per questo motivo le Valli sono state dichiarate Siti di Interesse Comunitario, e sono presenti nell'elenco delle Zone di Protezione Speciale previste dalla direttiva Uccelli (79/409/CEE). Sono state dichiarate sito di interesse internazionale, in base alla convenzione di Ramsar del 1971 e rientrano nel sito UNESCO "Ferrara città del rinascimento e il suo Delta del Po", del 1999.

Intorno alle valli si è incentrata la vicenda storica ed economica del territorio di Comacchio. La produzione del sale, interrottasi nel 1984 e la pesca hanno sempre rappresentato le basi economiche primarie, alle quali era legato l'artigianato locale. Queste ultime componenti economiche si sono sviluppate in seguito alle grandi opere di bonifica e con il prosciugamento di migliaia di ettari di valle, lasciando però inalterata quella parte dove ancora oggi si pratica la pesca all'anguilla, con particolari strumenti chiamati lavorieri presso le stazioni di pesca. Il lavoriero (Figura 1.9) è uno strumento che consente di catturare le anguille nel momento in cui dalle valli si spostano verso il

mare per iniziare la migrazione riproduttiva, stimolate dall'istinto riproduttivo. Si tratta di strutture in legno o cemento e griglie metalliche formato da una serie di bacini comunicanti, a forma di punta di freccia, che intrappolano il pesce (Tesch, 2003).



**Figura 1.9 Lavoriero delle Valli di Comacchio (foto: Kiwan A.)**

Le Valli sono quindi il luogo ideale per praticare la vallicoltura delle specie migratorie (anguille, branzini, sogliole, cefali, orate, passere e latterini), durante il loro passaggio dal mare all'entroterra; in particolare, per tutte le caratteristiche precedentemente descritte, sono un habitat ottimale per la “semina” della specie trattata in questo lavoro.

## **1.4 Conservazione e produzione**

*A. anguilla* è una specie di particolare interesse commerciale, soprattutto in Italia, ed oggetto, in passato, di un' intensa attività di allevamento e pesca. Nel 2007 la Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) ha inserito l'anguilla europea nell'allegato B del Regolamento CE 338/97 come specie a rischio di estinzione, ed è stata inclusa nel 2008 nella lista rossa della IUCN (International Union for Conservation of Nature).

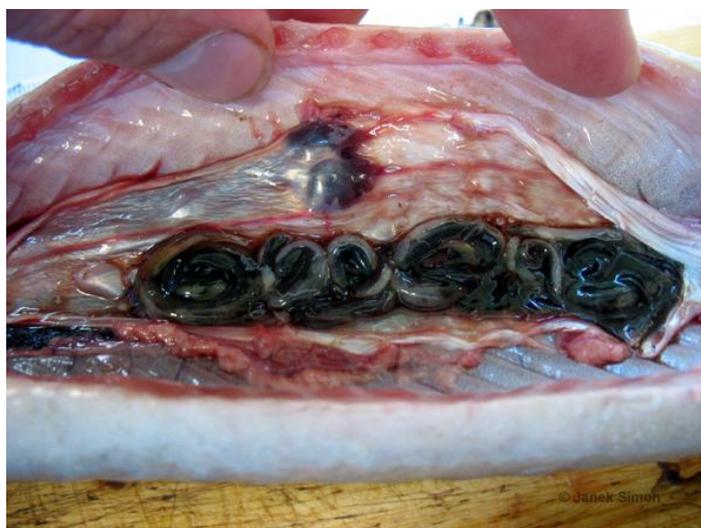
Considerata la particolarità del ciclo biologico di questa specie, è facile immaginare che la sua resilienza sia molto bassa e che i tempi di raddoppio della popolazione siano molto lunghi. Tra la fine degli anni 70 e l'inizio degli anni 80, le dimensioni della

specie sono andate incontro ad un netto declino pari a circa il 90% delle sue dimensioni (Dekker, 2003).

Secondo l'International Council for the Exploration of the Sea del 2006 (ICES), il crollo repentino nella quantità di sub-adulti, potrà comportare un ulteriore declino nello stock di adulti in un immediato futuro. Nella maggior parte delle aree di distribuzione, tutti gli stadi del ciclo vitale hanno subito un declino notevole e le dimensioni degli stock sono inferiori ai limiti biologici per la sopravvivenza della popolazione (ICES, 2002). Il continuo declino nel reclutamento dei giovanili potrebbe portare al collasso dell'intera popolazione, così da perdere un componente importante di biodiversità (Beaulaton e Briand, 2007). Per questo motivo l'Unione Europea, dalla fine del 2008, ha dato ad ogni Paese membro il compito di istituire un piano di gestione per l'anguilla per ogni bacino idrico che rappresenti un habitat naturale per questa specie (Regolamento 1100/2007, Council of the European Union).

Adeguati regimi di gestione porterebbero alla ripresa dello stock nei prossimi 5-15 anni, ma potrebbero non essere ancora sostenibili nel lungo periodo (Astrom e Dekker, 2007). L'estinzione della specie non rappresenterebbe solamente un danno di tipo ecologico e biologico, ma anche economico e culturale. Sono infatti numerosissime le piccole attività di pesca che producono reddito grazie alla pesca dell'anguilla. È una delle specie più importanti per la pesca e l'acquacoltura, sia in Italia che in altri paesi europei; in particolare a Comacchio è da sempre un simbolo di cultura e tradizione. Il declino nella popolazione di *A. anguilla* è da imputare ad una serie di fattori concomitanti. L'eccessivo sforzo di pesca è una delle cause principali data la grande richiesta della risorsa da parte della comunità europea ed asiatica. Secondo uno studio danese, che ha seguito con trasmettitori radio 50 anguille nella prima fase della migrazione, la pesca è la prima causa di morte (Aarestrup e Thorstad, 2010). Secondo le osservazioni il 60% degli esemplari è deceduto una volta arrivato in mare, in corrispondenza dei fiordi di Randers (zona di pesca). Secondo ICES l'attuale pressione di pesca non è sostenibile e vanno adottate misure repentine di tutela.

Un altro problema è quello causato dall'introduzione dal Giappone del parassita *Anguillicola crassus* (Koops e Hartmann, 1989) che causa diversi effetti sulla salute dell'animale e riduce il successo della migrazione transoceanica dei riproduttori (Feunteun, 2002); può portare alla morte sia di anguille selvatiche che in cattività in associazione con altri fattori di stress (Kirk, 2003). Questo nematode ematofago attacca la vescica natatoria (Figura 1.10) riducendo la disponibilità di ossigeno e la capacità natatoria dell'animale (Haenen et al., 2010). A questo proposito, vari studi hanno dimostrato che le anguille argentine delle Valli di Comacchio godono di un buon stato di salute e sono esenti dal nematode (Feunteun, 2002).



**Figura 1.10** Infestazione di *A.crassus* nella vescica natatoria di un'anguilla argentina (Fonte: J. Simon, Institute of Inland Fisheries)

Al repentino declino della specie hanno partecipato anche fattori quali l'inquinamento, l'alterazione e la perdita di habitat idonei allo sviluppo della specie, la presenza di ostacoli (dighe, briglie, centrali idroelettriche) che ne impediscono la diffusione e la migrazione controcorrente ed infine la predazione da parte di pesci predatori alloctoni (*Silurus glanis*) ed uccelli ittiofagi (aironi e gabbiani).

## **1.5 La risposta allo stress nei pesci**

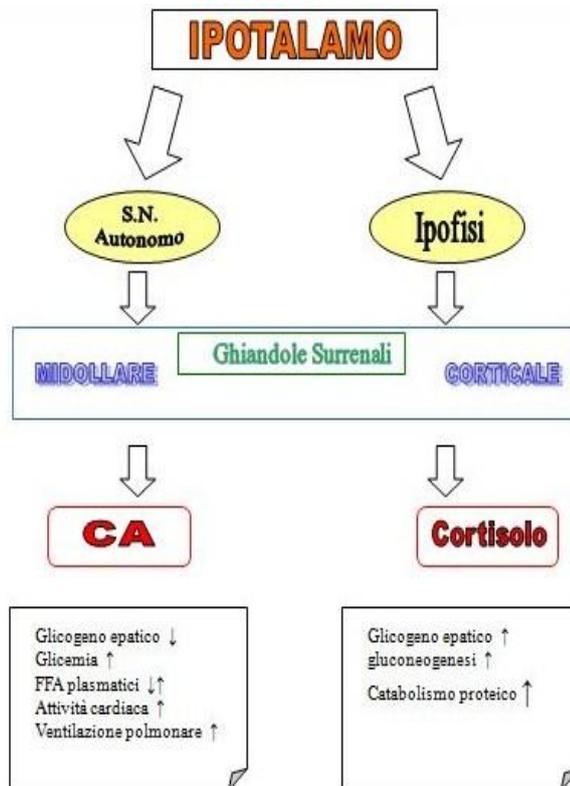
Un'elevata serie di stimoli sottopone i pesci a dure prove sia in cattività che nell'ambiente naturale. Lo stimolo può essere di diversa origine (una minaccia per la

sopravvivenza o un elemento patogeno) e viene definito agente di stress. Questo porta ad una risposta da parte dell'animale definita *risposta integrata allo stress* essenziale per la sopravvivenza dell'organismo e necessaria per l'adattamento in un nuovo ambiente (Wendelaar Bonga, 1997). La risposta può essere specifica per un solo agente di stress oppure per un gruppo di agenti. Il primo, che nel 1859, introdusse il concetto di ambiente interno da mantenere armonioso anche in risposta a stimoli esterni fu Claude Bernard (Bernard, 1859). In seguito, Cannon definì il concetto di omeostasi (Cannon, 1927), ovvero quella condizione attraverso la quale il corpo mantiene il suo equilibrio interno. Hans Selye, nel 1956, descrisse il concetto di stress fisiologico e la sindrome di adattamento generale (General Adaptation Syndrome). Questa consiste di tre fasi: la prima di "allarme" in cui vengono mobilitati i meccanismi di difesa, la seconda di "resistenza" e la terza di "esaurimento" che si manifesta quando le energie si sono esaurite e può sopraggiungere la morte per l'animale (Selye, 1956). Alcuni stimoli sono potenzialmente dannosi per l'organismo e potrebbero indurre, nel lungo periodo, stati patologici nell'animale. In riferimento alle specie ittiche, per "stress" si intende quella condizione in cui l'equilibrio dinamico di un organismo, l'omeostasi appunto, è minacciato o disturbato dall'azione di stimoli intrinseci od estrinseci definiti agenti stressori (Wendelaar Bonga, 1997; Colombo et al., 1989).

I teleostei rispondono allo stress innescando meccanismi fisiologici, biochimici e comportamentali coordinati dal cervello, che permettono di superare le condizioni avverse. In animali sottoposti a lunghi periodi di stress, la risposta può portare a conseguenze inevitabili come l'insuccesso nella riproduzione, la minor resistenza alle malattie e l'inibizione della crescita. È stato dimostrato che il meccanismo neuroendocrino della risposta allo stress nei pesci è paragonabile a quella dei mammiferi e degli animali terrestri. Tuttavia, in questi animali, la risposta ha caratteristiche tipiche. I pesci sono infatti in continuo contatto con l'ambiente esterno attraverso le branchie e, soprattutto in ambienti salati, attraverso l'intestino. La maggior parte degli agenti di stress influenza la struttura delle branchie e ne modifica il bilancio idrico-salino. Un'altra caratteristica è data dalla sensibilità dei sistemi sensoriali del tegumento che permette ai pesci di rispondere agli agenti stressori con una sensibilità

molto più elevata rispetto agli animali terrestri. La risposta allo stress, con cui l'organismo destina le energie per fronteggiare la nuova situazione, prevede tre stadi (Barton, 2002). Il primo stadio, la risposta primaria, implica l'attivazione di due assi neuroendocrini (Figura 1.11):

- 1) Asse ipotalamo-ipofisi-cromaffine che produce catecolamine (CA), adrenalina e noradrenalina, dalle cellule del tessuto cromaffine (equivalente della midollare surrenale dei mammiferi).
- 2) Asse ipotalamo-ipofisi-interrenale che produce i corticosteroidi (cortisolo e aldosterone solo nei pesci polmonati) dal tessuto interrenale (equivalente della corticale surrenale dei mammiferi).



**Figura 1.11 Diagramma delle principali vie neuroendocrine nella risposta allo stress (Wendelaar Bonga 1997)**

I corticosteroidi intervengono in due processi biologici fondamentali per la sopravvivenza dei pesci: l'osmoregolazione e il metabolismo. Nell'osmoregolazione,

aumentano l'uptake intestinale di sodio ed accrescono l'escrezione branchiale di quest'ultimo (in pesci di acqua salata) ed aumentano l'uptake di sodio a livello di branchie, intestino e vescica (in pesci d'acqua dolce). Nel processo metabolico promuovono il catabolismo proteico e la gluconeogenesi svolgendo un ruolo fondamentale nel rifornire l'organismo di energia per le migrazioni e la riproduzione.

Il secondo stadio, la risposta secondaria, è caratterizzato da un aggiustamento fisiologico alle condizioni di stress. Induce l'attivazione di una serie di vie metaboliche che inducono un'ampia gamma di cambiamenti per quanto riguarda la respirazione, l'equilibrio idrico salino, l'ematologia e la risposta cellulare.

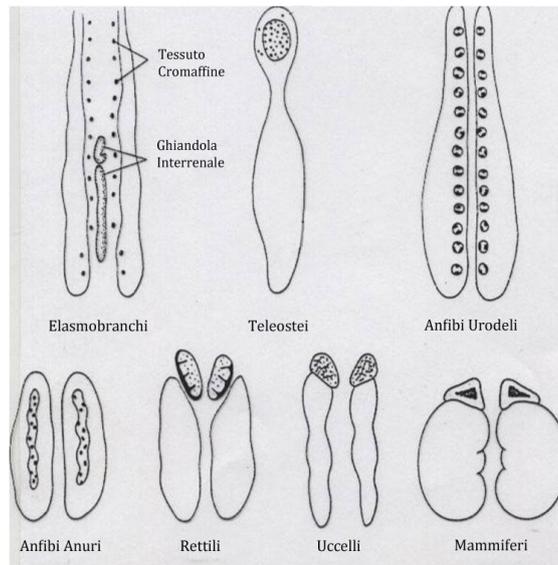
Il terzo stadio infine, comprende cambiamenti nell'intero organismo in seguito all'esposizione cronica allo stress. In questi casi, livelli alti e prolungati di cortisolo e CA portano a conseguenze deleterie per il singolo organismo e per la popolazione; essi infatti inibiscono l'accrescimento somatico stimolando il consumo di energia. Alti livelli di CA e corticosteroidi migliorano le prestazioni dell'organismo aumentando la forza e la frequenza della contrazione del cuore, inducendo vasodilatazione dei centri muscolari e respiratori e aumentando la disponibilità di risorse energetiche nel sangue.

Negli ultimi anni, si è rivolta particolare attenzione agli effetti dello stress sui pesci per migliorare le pratiche di allevamento e per la conservazione della specie. Parametri come il volume di acqua disponibile, la densità di popolazione, la temperatura, la salinità, la qualità del cibo, la manipolazione da parte dell'uomo ecc, sono tutti possibili agenti di stress se non sottoposti ad un controllo adeguato.

## **1.6 Le catecolamine: biosintesi e funzioni**

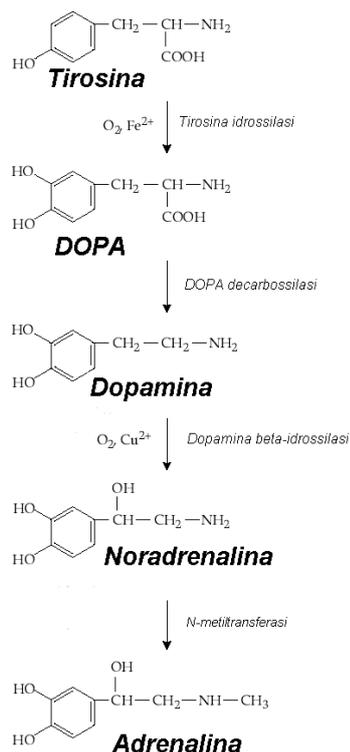
Nei teleostei le cellule cromaffini sono funzionalmente equivalenti alla ghiandola surrenale dei mammiferi. Sono il sito in cui vengono prodotte le CA, adrenalina (ADR) e noradrenalina (NOR) che, come ormoni, vengono rilasciate nel flusso sanguigno. Le CA possono anche essere secrete dalle terminazioni nervose simpatiche (Reid et al., 1998), agendo in quel caso come neurotrasmettitori.

Tra le diverse specie di pesci vi è un'elevata variabilità (Figura 1.12) per quanto riguarda l'origine e la circolazione di ADR e NOR (Reid et al., 1998). Negli agnati le cellule cromaffini sono disperse nella cavità peritoneale associate alle grandi vene, lungo le pareti del cuore. Negli elasmobranchi sono associate ai gangli paravertebrali e gastrici. Infine, nei teleostei, le cellule cromaffini sono disperse o ammassate in piccoli gruppi nella parte apicale del rene, spesso associate con le pareti delle vene.



**Figura 1.12 Evoluzione dei reni e delle ghiandole surrenali ad essi associate**

ADR e NOR sono sintetizzate, all'interno delle cellule cromaffini, partendo dall'aminoacido tirosina (Blaschko, 1939). La sintesi (Figura 1.13) inizia nel citosol con l'idrossilazione dell'aminoacido da parte dell'enzima tirosina idrossilasi che porta alla formazione dell'intermedio diidrossifenilalanina (DOPA); questo viene decarbossilato in dopamina dall'enzima decarbossilasi. La dopamina viene trasportata all'interno di specifiche cellule cromaffini in cui l'enzima dopamina- $\beta$ -idrossilasi la converte in NOR. In alcune cellule cromaffini, la NOR è trasportata in vescicole secretorie dove viene metilata in ADR dall'enzima feniletanolamina-N-metiltransferasi.



**Figura 1.13 Biosintesi delle catecolamine (Fonte: [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com))**

Le CA intervengono nella risposta a breve termine dello stress ed hanno numerosi effetti cardiovascolari e metabolici che, nel complesso, costituiscono le *reazioni di attacco o fuga* (Randall et al.,1999). In condizioni di stress acuto (ipossia, ipotensione, ipoglicemia...), si verifica un aumento significativo dei livelli ematici delle CA. Nei teleostei, i livelli plasmatici di CA sono compresi tra 1 nM e 10 nM (Wendelaar Bonga, 1997). Nell'anguilla sono state determinate concentrazioni di circa 400 ng/L per la NOR e di circa 1200 ng/L per l'ADR. Fattori di stress intenso possono determinarne un aumento di 10-1000 volte, variabile da specie a specie (Fabbri et al.,1998b). Nelle anguille si è valutata la variazione dei livelli plasmatici di CA dopo l'esposizione degli animali a stress di diversa durata. In caso di stress a breve intensità si è osservato che l'aumento della concentrazione si presenta nel giro di qualche decina di secondi; in caso di stress di media durata, il livello fisiologico delle CA viene recuperato entro 5 minuti, mentre in esposizioni a fattori di stress intenso, le CA vengono continuamente rilasciate ed il recupero dei livelli basali avviene in un range di diversi minuti fino a qualche giorno.

Gli effetti delle CA liberate nel sangue sono infatti molteplici e operano in diversi distretti ed organi (Fabbri et al., 1998b; Massarsky et al., 2011). Aumentano l'assunzione di ossigeno a livello branchiale incrementando la ventilazione del flusso ematico branchiale e della capacità di trasporto dell'ossigeno da parte dei globuli rossi. L'ADR aumenta il pH dei globuli stimolando l'attività dello scambiatore  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ed inibendo quella dello scambiatore  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Ciò porta ad un'acidificazione del sangue e ad un'alcalinizzazione dei globuli rossi con un conseguente aumento dell'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno (Nikinmaa, 1983), fenomeno che si verifica ad esempio in condizioni di ipossia. Influenzano la funzione cardiaca aumentando la forza (effetto inotropo) e la frequenza (effetto cronotropo) di contrazione del cuore. In molti teleostei è l'ADR che induce principalmente la contrazione. Questi ormoni aumentano la forza di contrazione muscolare; l'ADR potrebbe alterare lo stato del muscolo scheletrico e quindi incidere sulla performance del muscolo stesso, soprattutto se l'animale nuota ad alte velocità.

Le CA inducono inoltre la mobilitazione delle riserve energetiche per il metabolismo tissutale durante periodi di stress acuto. Promuovono la gluconeogenesi e la glicogenolisi epatica, mediate principalmente dalla stimolazione dei recettori adrenergici,  $\beta_2$  o  $\alpha_1$ , a seconda della specie (Fabbri et al., 1995a) e influenzano inoltre il metabolismo lipidico dell'animale promuovendo la lipolisi. Gli effetti delle CA portano quindi ad un'attivazione delle prestazioni dell'organismo, migliorando le funzioni cerebrali alle quali è associato un aumento della disponibilità di risorse energetiche in risposta a situazioni di forte stress. Ai fini della nostra ricerca verrà presa in considerazione quest'ultima funzione.

## **1.7 I recettori adrenergici e la trasduzione del segnale ormonale**

Un recettore è una proteina che si lega con un fattore specifico, definito ligando, che causa nel recettore stesso una variazione conformazionale in seguito alla quale si ha una risposta cellulare e l'effetto biologico. I recettori si possono suddividere in due grandi famiglie, a seconda della loro localizzazione cellulare:

- ✓ Recettori di transmembrana
- ✓ Recettori intracellulari

In questo capitolo ci soffermeremo sullo studio dei recettori di transmembrana di tipo adrenergico nei mammiferi, per capire in seguito la regolazione adrenergica nel fegato di teleosteo.

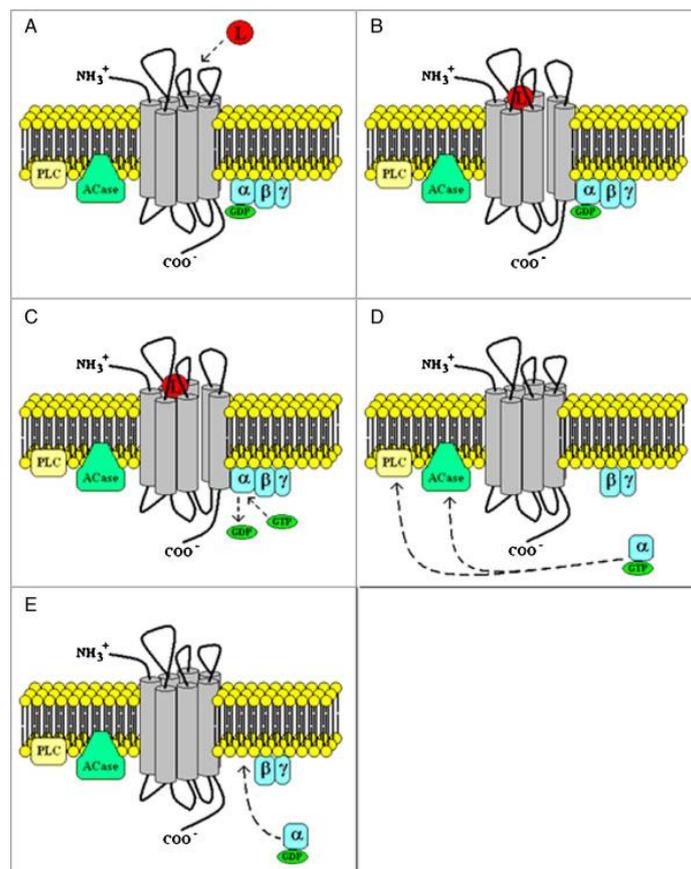
Nel 1948 R.P Ahlquist provò l'esistenza di due tipi di recettori adrenergici (AR),  $\alpha$  e  $\beta$ , che differiscono per la loro sensibilità alle ammine del sistema simpatico (Ahlquist, 1948). In studi più recenti, e grazie a tecniche molecolari e fisiologiche, si è dimostrata l'esistenza di diversi sottotipi di AR sia  $\alpha$  che  $\beta$ :  $\alpha_1$  (sottotipi A, B e D);  $\alpha_2$  (sottotipi A, B, e C);  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (Cotecchia, 2010; Bylund et al., 1994). Gli  $\alpha_1$  sono presenti maggiormente in organi quali il cervello e il cuore ma si riscontrano anche nei vasi sanguigni, nel fegato e nel rene. Mediano una serie di funzioni come la neurotrasmissione, la vasocostrizione, il controllo della pressione sanguigna e della contrazione cardiaca, la regolazione del metabolismo (Graham et al., 1996). Gli  $\alpha_2$  sono localizzati nel cervello, nelle piastrine e nella muscolatura liscia vascolare dove svolgono la funzione di vasocostrizione (Docherty, 1998). Mediano inoltre la contrazione della safena umana e di vari organi (Docherty e Hyland, 1985).

I recettori  $\beta_1$  si trovano principalmente nel cuore dove aumentano la frequenza e la forza della contrazione cardiaca; nel rene dove stimolano la secrezione di renina; rilassano inoltre le coronarie e la muscolatura liscia del tratto gastrointestinale (Bylund et al., 1994). I  $\beta_2$  inducono il rilassamento della muscolatura liscia in molti distretti come le vie aeree, i vasi sanguigni e l'utero. Sono presenti nel fegato dove promuovono la glicogenolisi e la gluconeogenesi. I recettori  $\beta_3$  si riscontrano soprattutto nel tessuto adiposo dove promuovono la lipolisi.

I recettori adrenergici appartengono alla superfamiglia dei recettori a 7 segmenti di transmembrana. Sono accoppiati alle proteine G che, con un meccanismo di trasduzione del segnale, attivano la via del secondo messaggero. Queste proteine sono state suddivise in 3 classi:

- ✓ Proteine Gs (stimolatrici), accoppiate ai recettori di tipo  $\beta$ ;
- ✓ Proteine Gi (inibitorie), accoppiate ai recettori  $\alpha_2$ ;
- ✓ Proteine Gq, accoppiate ai recettori  $\alpha_1$

La proteina G inattiva è un eterotrimerico funzionale composto da 3 subunità  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Il legame dell'agonista al recettore induce cambiamenti conformazionali nel recettore ed aumenta la sua affinità per la proteina G. La subunità  $\alpha$  scambia una molecola di guanosin difosfato (GDP) con una di guanosin trifosfato (GTP) e si stacca dal dimero  $\beta$ - $\gamma$ , per diffondere lungo la membrana ed interagire con altre proteine modificandone la conformazione e l'attività (Khafizov et al., 2009). Dopo l'interazione con la proteina, la sub-unità  $\alpha$  idrolizza il GTP a GDP e si ricongiunge al dimero  $\beta$ - $\gamma$ , riformando l'eterotrimerico inattivo (Figura 1.14).



**Figura 1.14** Legame agonista/recettore e meccanismo di attivazione della proteina G (fonte: Massarsky et al., 2011)

I recettori  $\beta$  sono accoppiati alla proteina Gs. Il legame del recettore con il suo agonista porta all'attivazione della proteina Gs che attiva l'adenilato ciclasi (AC) che converte l'adenosin trifosfato (ATP) in adenosina monofosfato ciclico (AMPc). Questo attiva la protein chinasi A (PKA) che, come secondo messaggero, promuove la risposta cellulare e fosforila le proteine deputate alla contrazione del cuore (Massarsky et al., 2011).

Il legame del recettore  $\alpha_1$  con il suo agonista, porta ad una modificazione della proteina Gq, la cui subunità  $\alpha$  stimola la fosfolipasi C (PLC). Questa converte il fosfatidilinositolo-1,4-difosfato (PIP<sub>2</sub>) in 2 secondi messaggeri: il diacilglicerolo (DAG) e l'inositolo trifosfato (IP<sub>3</sub>). Il DAG attiva la protein chinasi C (PKC) che fosforila le proteine responsabili della contrazione della muscolatura liscia (Massarky et al., 2011); l'IP<sub>3</sub> avvia il rilascio di Ca<sup>2+</sup> intracellulare attraverso l'attivazione della PKC e della calmodulina, portando alla contrazione della muscolatura liscia (Harris et al., 2008).

I recettori  $\alpha_2$  sono accoppiati alla proteina Gi, la cui attivazione porta all'inibizione dell'AC. Questa inibizione induce una diminuzione della concentrazione intracellulare di AMPc (Fabbri et al., 1998b).

Il meccanismo di controllo adrenergico nei pesci associato alle CA, in particolar modo all'ADR, è da diversi anni fonte di studio. Per lo studio condotto in questa tesi è di particolare interesse la regolazione del metabolismo glucidico epatico. Fra queste funzioni, quali sono i recettori che intervengono e predominano nella regolazione? A quali concentrazioni le CA influenzano il metabolismo?

## **1.8 La regolazione adrenergica nel fegato di teleosteo**

Il fegato è l'organo che svolge un ruolo metabolico di primaria importanza. Le sue cellule infatti, entrano direttamente in contatto sia con le sostanze assorbite a livello intestinale che con gli ormoni gastrointestinali e pancreatici che ne regolano il metabolismo (Poli, 2006). Parte del glucosio che arriva al fegato viene immagazzinato sotto forma di glicogeno e, all'occorrenza, queste riserve possono essere ritrasformate in glucosio ed immesse nel circolo sanguigno. Nel fegato si svolgono diverse funzioni metaboliche come la glicogenosintesi e la glicogenolisi che contribuiscono al

mantenimento della glicemia indipendentemente da periodi di alimentazione e digiuno. L'assunzione di glucosio da parte degli epatociti è resa possibile da trasportatori ed enzimi che agiscono sotto il controllo di ormoni e mediatori.

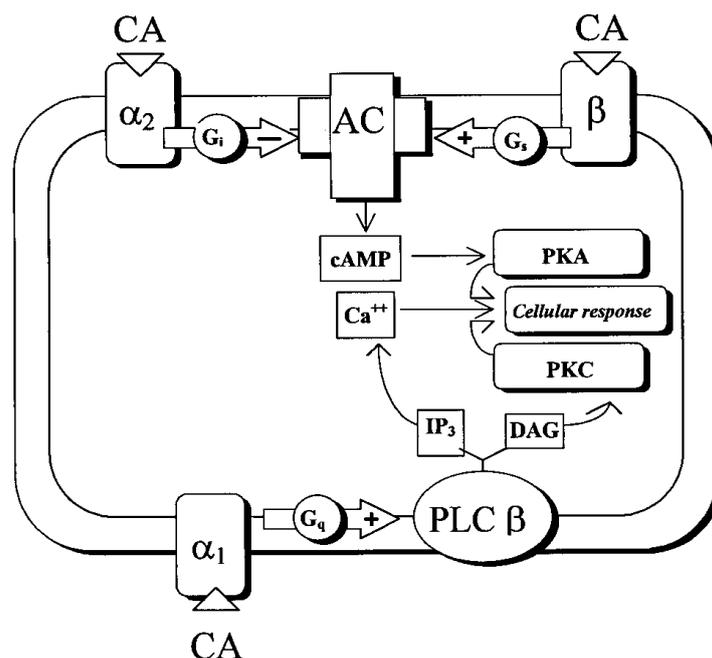
Molti aspetti della regolazione adrenergica nel fegato di teleosteo sono ancora poco chiari o del tutto sconosciuti. Poche sono le specie per le quali si sono svolti studi sul metabolismo glucidico: il luccio, *Exos lucius* (Thorpe e Ince, 1974); la trota iridea, *Oncorhynchus mykiss* (Morata et al., 1982); il pesce gatto, *Ictalurus melas* (Ottolenghi et al., 1985); la carpa, *Cyprinus carpio* (Janssens e Lowrey, 1987) e l'anguilla, *Anguilla anguilla* e *Anguilla rostrata* (Fabbri et al., 1998a; Moon, 1983).

Un ruolo di fondamentale importanza in questo processo è svolto dalle CA attraverso un meccanismo di binding-recettoriale con i recettori adrenergici. La presenza dei recettori  $\beta$  sulle cellule epatiche di teleosteo, il loro ruolo nella modulazione delle CA e nella regolazione del metabolismo glucidico, è stata stabilita negli anni '90 (Fabbri et al., 1992; Fabbri e Moon, 1994a). Com'è stato visto negli epatociti isolati del pesce gatto, questi ormoni inducono la glicogenolisi ed aumentano i livelli di glucosio rilasciato nel sangue (Brighenti et al., 1987). Per quanto riguarda la famiglia dei recettori  $\alpha$  adrenergici, studi sperimentali hanno dimostrato la loro esistenza ed il loro ruolo negli epatociti di mammifero (Exton, 1985), ma la loro presenza nel fegato di pesci, anfibi e rettili è stata appurata solo molto più tardi. Fu uno studio condotto sul fegato di pesce gatto (*Ictalurus melas*) che provò l'esistenza dei recettori  $\alpha$  adrenergici nei pesci (Fabbri et al., 1994b).

Il fegato dell'anguilla europea ed americana è stato ampiamente utilizzato come modello sperimentale per studiarne la fisiologia e la biochimica. Il legame delle CA con i recettori adrenergici determina una serie di eventi biochimici e di risposte cellulari che portano all'attivazione di un sistema intracellulare a secondo messaggero. I secondi messaggeri attivati da questi ormoni comprendono l'AMPc, l'IP<sub>3</sub> e il DAG (Poli, 2006). L'ormone principale che regola il metabolismo glucidico nei pesci è l'ADR. Questa si lega sia ai recettori  $\beta$  che agli  $\alpha$  innescando una cascata di trasduzione del segnale mediata da enzimi (Figura 1.15). Il legame con il recettore  $\beta$  attiva la proteina Gs che

induce l'attivazione dell'AC la quale aumenta la concentrazione intracellulare di AMPc. Questo stimola la PKA che porta all'attivazione della fosforilasi chinasi; quest'enzima attiva la glicogeno fosforilasi che promuove la scissione del glicogeno (glicogenolisi) a glucosio-6-fosfato e poi a glucosio. Questo meccanismo è stato valutato e confermato attraverso l'uso di  $\beta$  bloccanti quali il propranololo (PRO), che blocca l'azione dell'ADR sui recettori  $\beta$  adrenergici anche nel fegato di *A. anguilla* (Fabbri et al., 2000; Caselli et al., 2002). Negli epatociti isolati di *A. anguilla* e *A. rostrata*, un aumento di ADR mostra un incremento dipendente dal tempo e dalla dose nelle concentrazioni di AMPc anche di 35 volte superiore ai livelli basali (Fabbri et al., 1998a) e di conseguenza porta ad un incremento del glucosio rilasciato nel sangue (Fabbri et al., 1995b).

Il legame dell'ADR ai recettori  $\alpha$  attiva la proteina Gq che stimola l'attività della PLC la quale porta ad un incremento dei livelli citosolici di IP<sub>3</sub> (Fabbri et al., 1998a); questo diffonde nel citosol dove causa un aumento della concentrazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup> per apertura dei canali ionici del Ca<sup>2+</sup> (Moon et al., 1993). Contrariamente a quanto si pensava, l'ADR è in grado di indurre il rilascio di glucosio dagli epatociti anche attraverso l'occupazione dei recettori  $\alpha_1$  e gli ioni Ca<sup>2+</sup> giocano un ruolo fondamentale come secondi messaggeri intracellulari in questo tipo di risposta (Fabbri et al., 1999). Come per la via recettoriale di tipo  $\beta$ , l'aumento di ADR induce un incremento di glucosio rilasciato nel sangue attraverso il legame coi recettori  $\alpha$  adrenergici; questo è stato verificato utilizzando come  $\alpha$  bloccante, il prazosin (PRZ) (Fabbri et al., 1999).



**Figura 1.15** Meccanismo di trasduzione del segnale delle CA nelle cellule epatiche (fonte: Fabbri et al., 1998b)

Di particolare interesse negli ultimi anni è lo studio dell'espressione genica dei recettori adrenergici in pesci marini, poiché i dati ottenuti riguardavano pesci di acqua dolce o di acque salmastre (Fabbri et al., 1994b; Fabbri et al., 1995b; Garcia-Sainz et al., 1995). I recettori adrenergici sono stati recentemente identificati sia con studi di sequenziamento genico che di espressione genica nella trota iridea *O. mykiss* (Chen et al., 2007), nello sgombro *Scomber scombrus*, nell'acciuga *Engraulis encrasicolus* (Fabbri et al., 2008) e nel ciprinide *Pimephales promelas* (Giltrow et al., 2011). Ciononostante, le informazioni riguardanti i recettori adrenergici nei pesci sono ancora molto approssimative per affermare che la presenza concomitante dei recettori α<sub>1</sub> e β<sub>2</sub> nel fegato sia una caratteristica comune nei teleostei (Fabbri et al., 2008) così come invece lo è per il fegato di mammiferi (Sulakhe et al., 1988). A tal fine è stata ipotizzata una relazione filogenetica (Johansson, 1984) ma non si possono escludere i collegamenti con gli stimoli esterni all'interno di un habitat specifico. Un'importante informazione da confermare è la quantificazione assoluta e l'espressione relativa dei recettori α e β nel fegato di questi teleostei e la loro eventuale variabilità nei diversi stadi del ciclo vitale. Sia gli α che i β intervengono, oltre che nel metabolismo glucidico, anche nella regolazione del metabolismo lipidico (Van Heeswijk et al., 2006) per questo si ritiene

che i diversi stadi del ciclo vitale e l'adattamento a particolari condizioni ambientali, possano modificare l'assetto metabolico anche in conseguenza di una diversa espressione recettoriale per le CA.

L'interrogativo che da anni i ricercatori si pongono è perché vi siano due recettori diversi che apparentemente svolgono la stessa funzione (Figura 1.16). La farmacologia dei due recettori è stata ampiamente studiata (Fabbri et al., 1995a; Fabbri et al., 1995b; Fabbri et al., 1998b) ma non sempre i risultati sono stati chiari. A tal fine sono necessari studi più approfonditi riguardanti il sequenziamento e l'espressione genica.

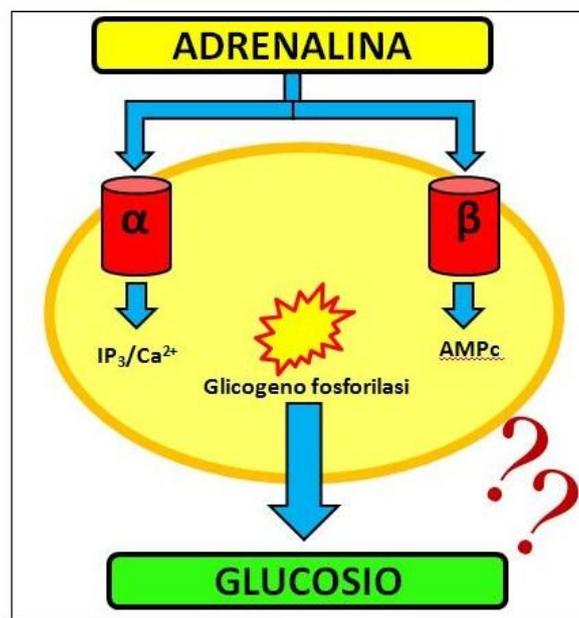


Figura 1.16 Regolazione adrenergica sul metabolismo glucidico

## 1.9 Il metabolismo glucidico nei pesci

Per metabolismo si intende quel complesso di reazioni chimiche e fisiche che avvengono all'interno dell'organismo. Queste reazioni estraggono energia dalle biomolecole dei nutrienti (come le proteine, i carboidrati e i lipidi) per sintetizzare o scindere molecole. Il metabolismo viene diviso in catabolismo (reazioni che rilasciano energia e portano alla scissione di grandi molecole) e anabolismo (reazioni che richiedono energia e portano alla sintesi di grandi molecole).

Molte trasformazioni della materia sono reversibili e sono legate a variazioni delle condizioni energetiche. Queste operazioni avvengono attraverso sequenze ordinate di reazioni definite vie metaboliche modulate da enzimi. I pesci sono in grado di utilizzare diverse molecole come fonti energetiche quali lipidi e proteine, ma i composti che meglio rappresentano la forma di energia a più rapida disponibilità sono i carboidrati, in particolare il glucosio.

Gli zuccheri presenti nel cibo sono generalmente digeriti e assorbiti dall'intestino, e i monosaccaridi presenti nel flusso sanguigno sono trasportati ai tessuti attraverso specifici trasportatori (Tseng e Hwang, 2008). Il glucosio è il monosaccaride principale che interviene nella domanda energetica cellulare, è il substrato principale per la produzione di energia in tutte le cellule in quanto il suo metabolismo aerobio è la via più efficiente per formare ATP; viene immagazzinato in diversi organi, in particolare nel fegato e nel muscolo. Diverse sono le vie metaboliche per un rifornimento continuo di glucosio; la via più semplice consiste nella rottura del glicogeno nel processo definito di glicogenolisi (Figura 1.17). L'enzima deputato a questo processo è la glicogeno fosforilasi, un enzima appartenente alla classe delle transferasi che degrada il glicogeno, distaccando una molecola di glucosio dall'estremità non riducente della catena.

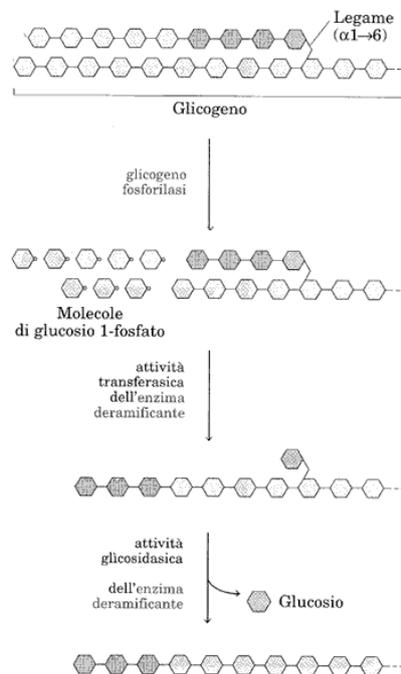
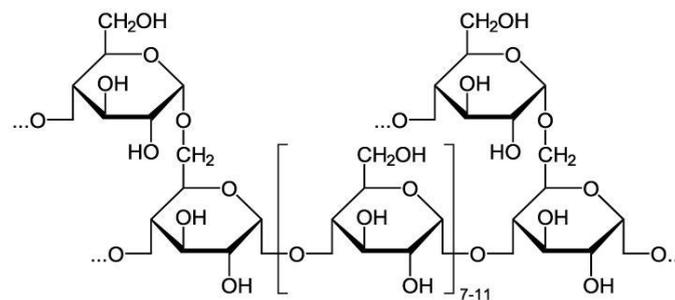


Figura 1.17 Glicogenolisi (Fonte: [www.webalice.it](http://www.webalice.it))

Il glicogeno è un polisaccaride fortemente idratato, presente in tutte le cellule a concentrazioni elevate nel fegato e nel muscolo scheletrico (Poli, 2006). Quello presente nel muscolo costituisce la fonte energetica per la contrazione muscolare, mentre quello presente nel fegato agisce come fonte di glucosio per le esigenze dell'organismo. La sintesi del glicogeno (Figura 1.18) avviene per unione di singole molecole di glucosio attraverso l'azione di due enzimi: la glicogeno sintasi (preposta alla formazione della catena lineare di glicogeno) e la glicosil-transferasi (preposta alla formazione delle ramificazioni).



**Figura 1.18 Molecola di Glicogeno (fonte: Wikipedia)**

Il glucosio può essere sintetizzato anche da altre molecole. La produzione di questo monosaccaride da precursori quali proteine e glicerolo è definita gluconeogenesi. Questa via può partire dal glicerolo, da amminoacidi o dal lattato. Durante la glicogenolisi, il processo arriva a produrre il glucosio-6-fosfato (G6P) ma solamente le cellule epatiche e renali possiedono l'enzima necessario per rimuovere il gruppo fosfato dal G6P per formare glucosio: la glucosio-6-fosfatasi. Una volta prodotto, il glucosio fuoriesce dall'epatocita attraverso specifici carrier ed entra nel sangue per essere disponibile per l'intero organismo.

Variazioni nel contenuto di carboidrati, presenti nella dieta dei pesci, inducono forti cambiamenti nel metabolismo ed influenzano soprattutto l'attività degli enzimi epatici che intervengono in questo processo. Molti studi hanno dimostrato che il sistema endocrino dei pesci è estremamente sensibile alle manipolazioni alimentari (Eals et al., 1990, 1992), ma sembra che le diverse specie rispondano in maniera differente alle alterazioni dietetiche. Poiché anche la stessa specie può esibire risposte endocrine differenti di fronte alla manipolazione dei carboidrati nella dieta, le risposte ormonali al

contenuto degli zuccheri sono complesse e ancora poco conosciute (Leung-Norman, Woo 2011).

Le CA giocano un ruolo fondamentale nel processo di glicogenolisi epatica e muscolare soprattutto in condizioni di stress fisiologico; è noto infatti come una fonte di stress faccia aumentare i livelli plasmatici di questi ormoni portando ad un aumento della glicemia (Fabbri et al., 1998b). Tuttavia il meccanismo d'azione con cui le CA regolano il metabolismo glucidico nel fegato di teleosteo lascia ancora spazio a dubbi.



## **2 SCOPO DELLA TESI**

Le conoscenze relative al controllo ormonale del metabolismo epatico dei pesci sono ancora piuttosto limitate e per molti anni sono state controverse. Infatti si è ritenuto per lungo tempo che le catecolamine, adrenalina e noradrenalina, agissero nel fegato dei pesci soltanto attraverso i recettori adrenergici di tipo  $\beta$ . Quindi l'assetto recettoriale dei mammiferi, che comprende recettori  $\alpha$  e  $\beta$ , era considerato frutto di un processo evolutivo che non aveva ancora avuto luogo nei pesci. In realtà, dati che risalgono alla seconda metà degli anni '90 hanno dimostrato chiaramente che negli epatociti di pesce gatto e di anguilla le catecolamine interagiscono con recettori sia  $\alpha$  che  $\beta$  e stimolano le vie di trasduzione del segnale accoppiate ai recettori  $\alpha$  (innalzamento del calcio intracellulare) e  $\beta$  (innalzamento dell'AMPc). Recettori sia  $\alpha$  che  $\beta$  sono presenti nel fegato dello sgombro, della acciuga e della trota. Quindi, anche nel fegato di teleosteo, come nei mammiferi, il meccanismo d'azione delle catecolamine è ridondante, cioè il rilascio di glucosio da parte degli epatociti può essere controllato sia attraverso i recettori  $\alpha$  che  $\beta$ . Tuttavia alle concentrazioni di catecolamine tipiche dello stress (1  $\mu\text{M}$ ) è stato dimostrato che l'unica via selezionata è quella AMPc dipendente, cioè attraverso l'accoppiamento dell'adrenalina con i recettori  $\beta$ . Gli studi farmacologici, attraverso l'uso di agonisti o antagonisti specifici per i diversi recettori, non hanno fornito adeguati chiarimenti in quanto l'affinità dei ligandi per i recettori dei teleostei è piuttosto diversa da quella per i mammiferi. Quindi, tuttora, il controllo del metabolismo glucidico dei pesci è un importante aspetto fisiologico non chiaro.

L'anguilla è l'organismo modello utilizzato in questo studio. Questo teleosteo è caratterizzato da un ciclo biologico molto particolare, in cui si distinguono nettamente una fase gialla ed una argentina. Date le estreme differenze nella disponibilità e nell'uso delle risorse energetiche in questi due stadi, il presente studio ha mirato a valutare la differente sensibilità alle catecolamine da parte degli epatociti isolati da anguille gialle ed argentine. E' stato valutato, in particolare, il rilascio di glucosio dagli epatociti isolati in funzione della concentrazione di adrenalina, l'ormone principale dello stress a breve

termine nei pesci che stimola la glicogenolisi epatica, alla quale segue un incremento della glicemia ed un aumento delle prestazioni dell'animale.

Le tecniche molecolari consentono oggi di approfondire lo studio sui recettori dei teleostei spiegando i dubbi farmacologici e anche di valutare l'espressione dei geni codificanti per i due recettori adrenergici. Abbiamo pertanto applicato la metodologia della PCR real time per studiare l'espressione relativa dei geni codificanti per i recettori adrenergici  $\alpha$  e  $\beta$  e quantificarli in maniera assoluta nel fegato delle anguille gialle ed argentine. A tal fine è stata necessaria una prima fase di lavoro per il disegno dei primers ed il clonaggio delle sequenze per ottenere un'elevata efficienza di amplificazione attraverso un protocollo di PCR real time.

Attraverso gli studi condotti, si attendevano chiarimenti relativamente ai seguenti aspetti fisiologici:

- ✓ funzionalità dei recettori adrenergici nel modulare il controllo del rilascio di glucosio negli epatociti di anguille gialle ed argentine
- ✓ relativa espressione dei geni codificanti per i recettori  $\alpha$  e  $\beta$  negli epatociti delle anguille gialle e delle anguille argentine
- ✓ eventuali differenze di espressione nelle due fasi del ciclo vitale delle anguille, profondamente diversi per quanto riguarda il controllo del metabolismo.

Questi studi consentono un passo avanti nella conoscenza del controllo ormonale del metabolismo epatico nei pesci, e forniscono i primi risultati circa l'espressione dei geni codificanti per i recettori adrenergici nelle anguille. Inoltre forniscono in assoluto le prime evidenze concernenti il controllo adrenergico nel fegato delle anguille argentine.

## **3 MATERIALI E METODI**

### **3.1 Prelievo delle anguille presso le Valli di Comacchio**

Dieci anguille sono state prelevate nel mese di Giugno 2011 dalla stazione da pesca “Foce” nelle Valli di Comacchio (FE), un allevamento estensivo in acque salmastre descritto al punto 1.3. La cattura delle anguille è avvenuta attraverso apposite reti (cogolli, Tesch, 2003) posizionate nei pressi del lavoriero. Gli esemplari campionati erano anguille dalla livrea gialla del peso medio di 322 g e di lunghezza media di 557 mm. Il trasporto degli animali è avvenuto a secco.

Nel secondo periodo di campionamento, avvenuto nel mese di Novembre 2011, 8 anguille sono state prelevate dalla medesima stazione di pesca. Queste anguille erano state pescate al lavoriero, tradizionale trappola che trattiene le anguille mentre si stanno trasferendo dall'interno delle Valli verso il mare aperto per iniziare la migrazione riproduttiva. Gli esemplari campionati erano anguille dalla livrea argentina del peso medio di 1535 g e di lunghezza media di 857 mm. Il trasporto degli animali è avvenuto a secco.

In laboratorio sono state poste in un acquario della capacità di circa 300 litri contenente acqua salmastra proveniente dalla stessa zona di prelievo, costantemente areata alla temperatura di 16° C e tenuta all'oscurità; sono state mantenute nell'acquario senza alimentazione per almeno 24 ore prima dell'esperimento. A questo fine, le anguille sono state prelevate in maniera casuale dall'acquario, poste in ghiaccio per alcuni minuti per renderle meno attive poiché attualmente non esistono metodi di stordimento adeguati, che non interferiscano con le analisi, in grado di indurre l'incoscienza fino al momento della soppressione (EFSA, 2009).

E' stata effettuata la misura di (Figura 3.1):

- ✓ lunghezza del corpo (L)
- ✓ peso del corpo (W)

- ✓ lunghezza della pinna pettorale (FL)
- ✓ diametro orizzontale e verticale dell'occhio (EDh, EDv). Non deve essere misurata solamente la pupilla ma il diametro dell'intero occhio.

per calcolare:

- ✓ l'indice di argentinizzazione, SI (Durif et al., 2009)
- ✓ il fattore di condizione, CF dato dal rapporto tra il peso in g e la lunghezza in mm al cubo dell'animale, moltiplicato per un fattore ( $10^5$ ) (Fulton, 1904)
- ✓ l'indice dell'occhio, EI (Pankhurst, 1982) che corrisponde alla superficie dell'area dell'occhio, divisa per la lunghezza totale del corpo. Il valore soglia che identifica l'anguilla sessualmente matura è di 6.5.



**Figura 3.1** Stima delle misure morfometriche su *Anguilla anguilla* (Fonte EELREP, 2005)

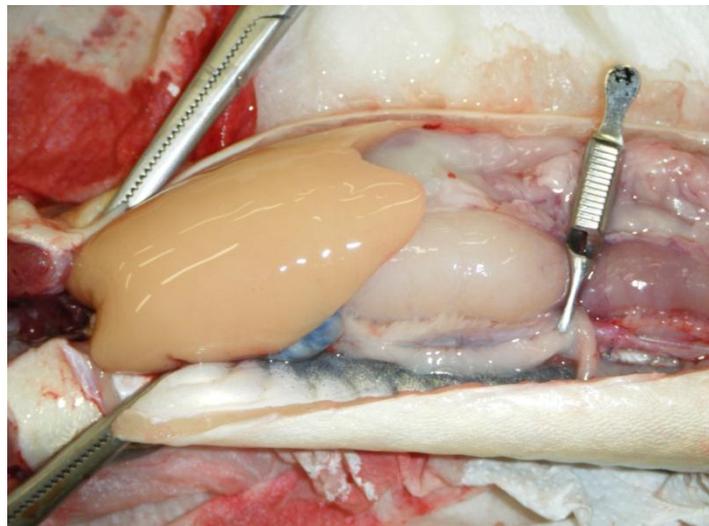
Il calcolo di questi indici ha permesso di caratterizzare l'animale definendone il sesso, lo stadio di maturazione, il benessere e discriminare tra anguilla gialla o argentina.

Ogni anguilla è poi stata rapidamente decapitata anteriormente alle pinne pettorali, tra queste e la testa. Repentinamente si è provveduto a tagliare longitudinalmente l'addome per esporre il fegato e procedere con la perfusione per isolare gli epatociti.

Le anguille argentine selezionate per gli esperimenti erano rappresentative delle anguille argentine pescate nello stesso periodo nelle Valli di Comacchio e destinate al mercato ittico. Nessuno dei parametri analizzati nel gruppo di anguille utilizzate per gli esperimenti (n=8) era infatti differente rispetto alle ulteriori anguille misurate (n=200; Brunelli e Fabbri, inviato per la pubblicazione).

### 3.2 Isolamento degli epatociti

Gli epatociti di anguilla sono stati isolati secondo il metodo della perfusione *in situ* (Mommsen et al., 1990). Il fegato è stato perfuso utilizzando una pompa peristaltica (modello Gilson MINIPLUS 3) alla velocità di 2 mL/min, previa incannulazione della vena addominale (Figura 3.2). La perfusione è stata condotta per circa 10 minuti utilizzando la soluzione di Hanks per teleostei (soluzione A), allontanando così il sangue dai vasi epatici. La perfusione si è protratta poi per ulteriori 25 minuti con la medesima soluzione arricchita di collagenasi (soluzione B), un enzima in grado di digerire le proteine di connessione delle cellule epatiche al fine di isolare gli epatociti.



**Figura. 3.2** Perfusione attraverso incannulazione della vena addominale (Foto: Kiwan A.)

Successivamente il fegato è stato rimosso e sminuzzato con una lametta manicata in una capsula petri posta su ghiaccio per interrompere l'azione della collagenasi. Il tessuto frammentato è stato poi filtrato utilizzando due diversi filtri di nylon usati in successione, con pori del diametro di 153  $\mu\text{m}$  e 73  $\mu\text{m}$ . La sospensione di cellule

ottenuta è stata poi lavata due volte con la soluzione A e centrifugata a 60 xg per 3 minuti a 4°C. Le cellule sono state risospese e lavate con la medesima soluzione arricchita di CaCl<sub>2</sub> (soluzione C) e nuovamente centrifugate. Dopo almeno un'ora di riposo a 4°C, le cellule sono state rilavate con soluzione C e centrifugate come sopra. Subito prima delle incubazioni sperimentali, due aliquote di 100 µL di cellule sono state poste in altrettante eppendorf prepesate. Queste sono state centrifugate a 12.000 xg per 2 minuti. Eliminato il supernatante, le eppendorf contenenti il pellet cellulare sono state pesate con una bilancia analitica al fine di determinare il peso delle cellule da utilizzare nel trattamento ormonale.

*Soluzioni di Hanks per teleostei*

Soluzione A:

tamponata a pH 7.63

<b>Prodotto</b>	<b>M</b>	<b>g/500 mL</b>
MgSO <sub>4</sub>	0.8 mM	0.48
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.33 mM	0.23
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.44 mM	0.30
NaCl	136.9 mM	40.0
KCl	5.4 mM	2.0
HEPES	5 mM	5.96
HEPES-Na	5 mM	6.51
NaHCO <sub>3</sub>	5 mM	2.10

#### Soluzione B:

A 50 mL di soluzione A sono stati aggiunti 12 mg di collagenasi.

#### Soluzione C:

A 100 mL di soluzione A sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di  $\text{CaCl}_2$  1 M (concentrazione finale 1.5 mM).

I dati relativi a glucosio e glicogeno sono sempre stati espressi in riferimento al peso delle cellule (grammo) per un confronto con la letteratura relativa al fegato di anguille gialle o di altri teleostei. Sono stati tuttavia raccolti anche altri dati di interesse: mediamente, nelle anguille gialle da un fegato di circa 4 g si ottenevano circa 3 grammi di epatociti; nelle anguille argentine da un fegato di circa 15 g si ottenevano circa 6.5 g di epatociti anche se alcuni fegati di anguille argentine, contenenti molto tessuto adiposo, hanno avuto una resa molto modesta in quantità di cellule. Un milligrammo di epatociti equivale a circa  $5 \times 10^5$  cellule. Il contenuto in proteine degli epatociti ottenuti dalle singole anguille è riportato nella tabella 3.3 nel paragrafo inerente il metodo Lowry.

### **3.3 Incubazioni e trattamento ormonale**

La sospensione cellulare ottenuta è stata esposta a diversi trattamenti ormonali dopo i quali è stato determinato il glucosio rilasciato a seguito della stimolazione della glicogenolisi. Sono state ottenute due curve: una curva del tempo, per vedere a quale minuto si ha il massimo effetto ormonale, ed una curva dose-risposta per determinare l'EC50 (concentrazione in grado di produrre il 50% dell'effetto massimale). Per la curva del tempo, 3,2 mL di sospensione cellulare sono stati incubati a temperatura ambiente in presenza di ADR 1  $\mu$ M. La reazione è stata bloccata al tempo specificato trasferendo 200  $\mu$ L di sospensione in eppendorf contenenti 20  $\mu$ L di acido perclorico (PCA) al 16.5%. Per la curva dose-risposta, 160  $\mu$ L di sospensione cellulare sono stati incubati a temperatura ambiente per 30 min. in presenza di diverse concentrazioni di ADR (per un volume finale di 200  $\mu$ L). La reazione è stata poi bloccata aggiungendo 20

$\mu\text{L}$  di PCA. Gli epatociti sono stati esposti anche alla Noradrenalina (ormone  $\alpha$  stimolante) e all'Isoprenalina (farmaco  $\beta$  stimolante).

Si è ottenuta una curva dose-risposta anche per gli antagonisti dei recettori adrenergici: propranololo (PRO),  $\beta$ -bloccante (Janssens e Lowry, 1987) e prazosin (PRZ),  $\alpha$ -bloccante (Zhang et al., 1992). In questo caso gli inibitori sono stati aggiunti prima dell'ADR e la sospensione è stata lasciata riposare 10 min prima di aggiungere l'ormone. Gli epatociti sono stati incubati per 30 min e la reazione bloccata con PCA. In tutti gli esperimenti erano mantenuti anche epatociti di controllo, non esposti ai trattamenti con ligandi adrenergici. A conclusione degli esperimenti, i campioni venivano centrifugati per 10 min a 12.000 xg ed il soprannatante è stato conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  per essere utilizzato nel dosaggio del glucosio e del glicogeno.

### **3.4 Dosaggio del glucosio**

Il glucosio contenuto e rilasciato dagli epatociti è stato misurato attraverso il metodo descritto in Busby et al. (2002), utilizzando un lettore per micropiastre, e leggendo l'assorbanza a 340 nm.

Per effettuare il dosaggio sono state preparate le seguenti soluzioni:

- ✓ Soluzione di esochinasi (HK): 0.5 mg in 2.59 mL di acqua distillata
- ✓ Soluzione tamponata a pH 8.0 formata da Trizma base (145 mg), Tris HCl (126 mg),  $\text{MgSO}_4$  (2.4 mg),  $\text{NAD}^+$  (29.5 mg), ATP (12.1 mg) aggiungendo poi 1  $\mu\text{L}$  di glucosio 6-fosfato-deidrogenasi (G6PDH).
- ✓ Soluzione di glucosio 2mg/mL

Si è proceduto alla preparazione della curva degli standard di glucosio facendo delle diluizioni in serie come segue:

[Glucosio] mg/mL	Glucosio (mL)	ddH2O (mL)
2.0	1.00	0.00
1.6	0.80	0.20
1.3	0.81	0.19
1.0	0.77	0.23
0.6	0.60	0.40
0.3	0.50	0.50
0.0	0.00	0.00
Bianco	0.00	0.00

In ogni pozzetto della piastra sono stati caricati 10  $\mu$ L di campione e 200  $\mu$ L di miscela di reazione; la piastra è stata incubata per 5 minuti e si è effettuata una prima lettura a 340 nm. Si sono aggiunti ad ogni pozzetto 10  $\mu$ L di HK, e la micropiastra è stata incubata per 30 min, prima di una seconda lettura a 340 nm.

### 3.5 Dosaggio del glicogeno

Il glicogeno iniziale presente negli epatociti delle anguille gialle ed argentine ai livelli basali, è stato misurato attraverso il metodo descritto da Mommsen (1986).

Inizialmente i campioni sono stati neutralizzati con una soluzione di carbonato di potassio ( $K_2CO_3$ ) 3 M per ottenere un pH ca. 5 che permetta all'enzima, amiloglucosidasi, di scindere le molecole di glicogeno nei monomeri di glucosio. Si è proceduto alla preparazione della curva degli standard di glicogeno facendo delle diluizioni in serie come segue:

[Glicogeno] mg/mL	Glicogeno (mL)	ddH2O (mL)
20.0	600	0
15.0	375	125
10.0	333	167
7.5	375	125
5.0	333	167
2.5	250	250
0.0	0	500

In provette di vetro della misura di 12x75 mm si sono aggiunti:

- ✓ 100 µL di campione
- ✓ 50 µL di soluzione contenente NaHCO<sub>3</sub> 1 M
- ✓ 1 mL di soluzione contenente l'amiloglucosidasi (1mg/mL)

I campioni sono stati incubati per 2 ore a 37°C e la reazione è stata bloccata con 25 µL di PCA al 70%. Infine i campioni sono stati centrifugati a 3000xg per 10 minuti ed il sopranatante è stato conservato per il dosaggio del glucosio così ottenuto.

### 3.6 Dosaggio delle proteine

Per il dosaggio delle proteine è stato utilizzato il metodo colorimetrico di Lowry (Lowry et al., 1951) che permette di dosare fino a 5 µg di proteine in un volume di 0,2 mL. Sono state preparate le seguenti soluzioni:

Soluzione A formata da: Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> tartrato (200 mg), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 g) e NaOH (4 g) per un volume finale di 1L.

Soluzione B composta da CuSO<sub>4</sub> (0.1 g) per 10 mL di acqua distillata.

Soluzione C data da 500 µL di reattivo di Folin e 500 µL di acqua per un volume di 1mL.

Il metodo si avvale di due fasi: nella prima gli ioni  $\text{Cu}^{2+}$ , presenti nella soluzione A+B, reagiscono con i gruppi  $\text{CO-NH}_2$  delle proteine dando la tipica colorazione violetta della soluzione. Nella seconda fase, gli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico, presenti nel reattivo di Folin, vengono ridotti dal complesso rame-proteina a blu di tungsteno e blu di molibdeno. Da ogni campione sono stati prelevati 10  $\mu\text{L}$  di omogenato, diluiti con  $\text{NaOH}$  1N in rapporto 1:10 per un volume finale di 100  $\mu\text{L}$ . Gli standard per il dosaggio sono stati preparati partendo da una soluzione stock di albumina ( $\text{BSA}=0.5 \text{ mg/mL}$ ), facendo delle diluizioni in serie. Una volta caricati nella piastra gli standard e i campioni, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 200  $\mu\text{L}$  di soluzione A+B; dopo una prima lettura a 650 nm la micropiastra è stata lasciata a riposo per 10 min al buio. Ad ogni pozzetto sono stati poi aggiunti 20  $\mu\text{L}$  di soluzione C. La piastra è stata incubata al buio per ulteriori 30 min, dopo i quali è stata effettuata una seconda lettura a 650 nm.

**TAB.3.1 contenuto in proteine ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  di cellule) di 8 anguille gialle ed argentine**

**Contenuto in proteine ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  di cellule)**

	<b>SE</b>	<b>YE</b>
	74.11	87.49
	81.91	87.07
	71.81	85.60
	61.05	88.40
	114.00	105.80
	61.25	68.73
	65.95	61.87
	64.60	17.00
<b>MEDIA</b>	<b>74.33</b>	<b>88.98</b>
<b>ES</b>	6.20	7.17

### **3.7 Estrazione RNA dai campioni**

L'RNA è stato estratto dalle cellule epatiche di *A. anguilla* attraverso il ChargeSwitch total RNA cell kit (Life Technologies) secondo il protocollo fornito. Questo metodo di estrazione è appositamente sviluppato per l'estrazione dell'RNA totale da cellule

animali attraverso il suo legame con delle particelle magnetiche. L'RNA estratto è stato risospeso in un opportuno volume di acqua micro-filtrata (mQ) sterile e si è proceduti con una verifica quali-quantitativa attraverso lo spettrofotometro, (leggendone l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm) e mediante l'elettroforesi orizzontale su gel denaturante (*Sambrook et al.*, 1989).

### 3.8 Retrotrascrizione

La retrotrascrizione è la reazione che permette di ottenere da un filamento stampo di RNA, una molecola di DNA a singolo filamento ad esso complementare (cDNA). Questa reazione è catalizzata dall'enzima trascrittasi inversa (o DNA polimerasi RNA-dipendente) che utilizza l'RNA come stampo polimerizzando nel filamento di sintesi i deossinucleotidi-trifosfato (dNTPs) complementari alla sequenza del filamento stampo. La sintesi del cDNA è possibile mediante l'utilizzo di inneschi o *primers* che formano un piccolo tratto a doppio filamento dal quale la DNA polimerasi può iniziare la sintesi del filamento stampo. Per questo studio sono stati utilizzati dei primers a sequenza arbitraria (*random primers*), che si legano a diverse regioni delle molecole di RNA, massimizzando la resa della reazione.

Per ogni campione, il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA totale, in presenza di 250 ng di *random primers* (Sigma Aldrich) e 200 unità dell'enzima RevertAID H minus M-Mulv Reverse Transcriptase (Fermentas).

La reazione avviene in tre fasi di incubazione:

- ✓ ibridazione dei random primers sui filamenti di RNA (25°C per 10 min.);
- ✓ retrotrascrizione (45°C per 60 min.);
- ✓ inattivazione dell'enzima (70°C per 10 min.).

I campioni di cDNA ottenuti sono stati conservati a -20°C e utilizzati nella fase successiva di amplificazione.

### 3.9 La PCR real time

La reazione a catena della DNA polimerasi (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) permette l'amplificazione di specifici frammenti di acidi nucleici, ossia la produzione *in vitro* di un elevato numero di copie di una specifica sequenza di DNA. Questa tecnica fu messa a punto nel 1983 da Kary B. Mullis (premio Nobel per la chimica nel 1993).

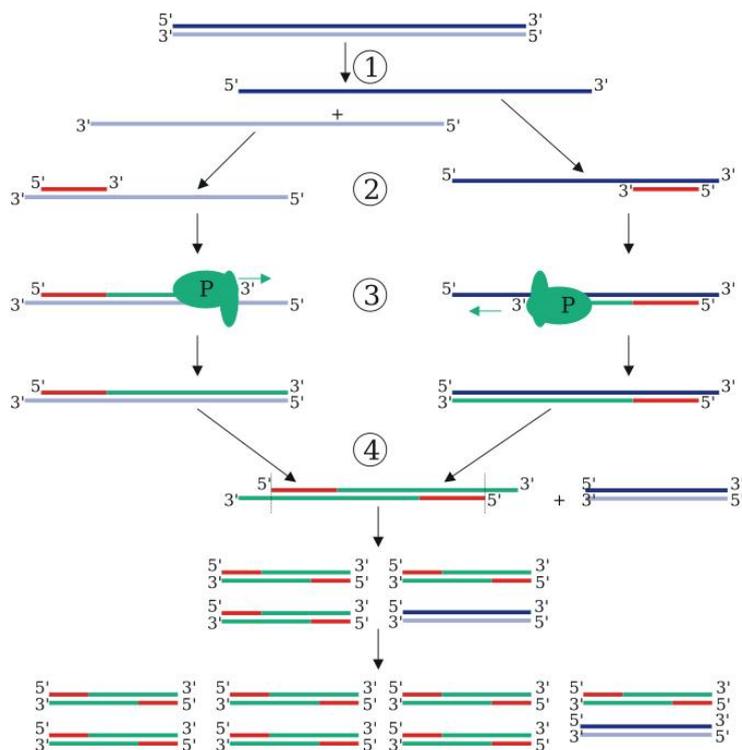
La PCR si basa sulle proprietà dell'enzima DNA polimerasi di ripetere *in vitro* ciò che accade normalmente *in vivo* durante il processo di duplicazione del DNA: la sintesi di nuovi filamenti complementari ad un filamento stampo, e la possibilità di mirare tale sintesi ad uno specifico tratto di DNA scegliendo opportunamente gli inneschi. Il tutto permette di ottenere elevate quantità di materiale genetico per future applicazioni in tempi relativamente brevi.

Per iniziare la reazione è necessaria la presenza di opportuni primers, oligonucleotidi sintetici lunghi 10-30 pb, complementari alle regioni fiancheggianti il frammento genico da amplificare. I primers, appaiandosi a queste regioni, costituiscono un piccolo tratto di DNA a doppia elica, dal quale la DNA-polimerasi può iniziare la sintesi, ossia la formazione di legami fosfodiesterici tra l'estremità 3' del segmento iniziatore e quella 5' del deossinucleotidtrifosfato (dNTP) complementare allo stampo.

La reazione di PCR consiste nella ripetizione di diversi cicli termici (25-35), ognuno dei quali è costituito da tre fasi (Figura 3.3):

- ✓ denaturazione: separazione dei due filamenti che costituiscono la doppia elica del DNA stampo per riscaldamento a 90-98°C.
- ✓ appaiamento degli inneschi (*annealing*): i primers si appaiano alle sequenze complementari sui due filamenti stampo. La temperatura di *annealing* è un parametro variabile capace di determinare la specificità della reazione, pertanto può variare in funzione dei frammenti che devono essere amplificati e dei primers utilizzati. In generale è compresa tra i 40 e 60°C.

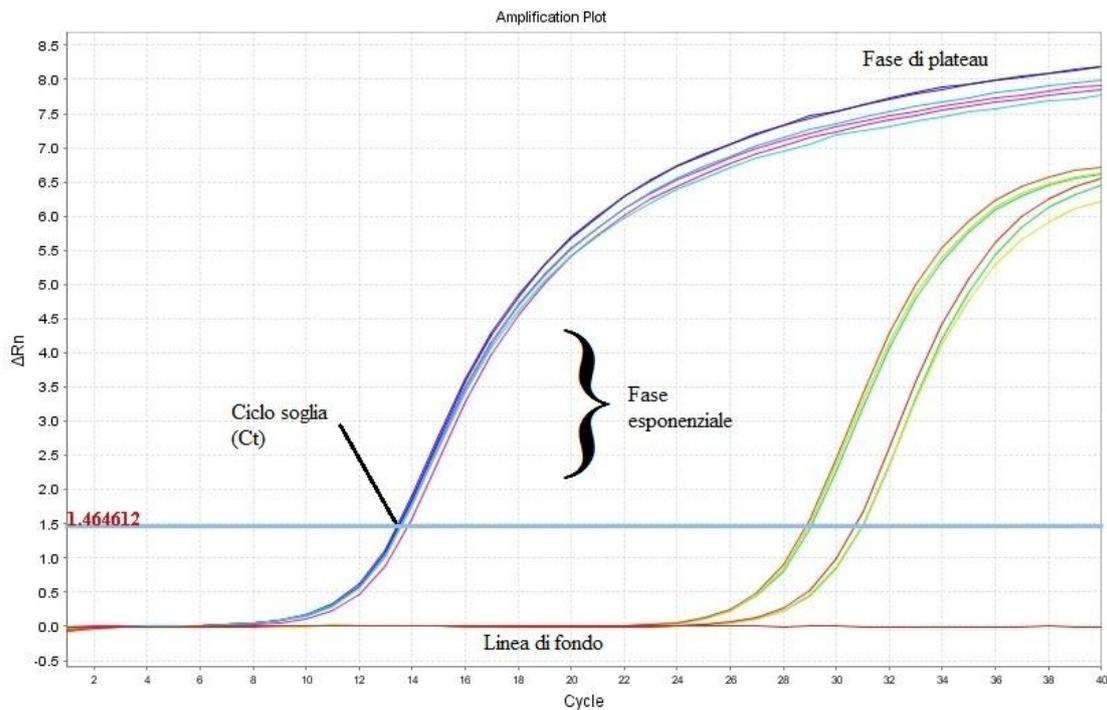
- ✓ estensione: la temperatura viene innalzata ad un valore in genere intermedio tra quello di denaturazione e quello di appaiamento (68-72°C), che risulti ottimale per l'attività della DNA polimerasi; questa catalizza l'estensione dei filamenti di nuova sintesi a partire dall'estremità ossidrilica 3'.



**Figura 3.3** Schema di PCR in cui sono raffigurate le fasi di denaturazione (1), annealing (2) ed estensione (3).

In questo lavoro, l'espressione dei recettori  $\alpha_1$  e  $\beta_2$  adrenergici è stata condotta mettendo a punto un protocollo di PCR quantitativa *real time*. Questa tecnica monitora la cinetica della reazione di PCR in "tempo reale" rilevando la fluorescenza emessa durante la reazione da un cosiddetto *reporter*, cioè un indicatore della produzione dell'amplificato durante ogni ciclo di PCR, in particolare durante la fase lineare della reazione, cioè quando si può stabilire una relazione lineare tra la quantità di prodotto di PCR e la quantità iniziale dell'RNA corrispondente al gene bersaglio contenuto nel template, permettendo di stimare indirettamente l'espressione del gene nel campione in esame. La rilevazione quantitativa dell'amplificato può essere effettuata utilizzando diversi metodi per correlare l'incremento della fluorescenza emessa dal *reporter* alla quantità di

amplificato prodotto. Per questo lavoro è stato utilizzato il SYBR Green I, un agente intercalante in grado di emettere fluorescenza quando si lega in corrispondenza del solco minore della doppia elica del DNA. L'incremento di intensità della fluorescenza emessa ad ogni ciclo è espresso in un grafico che ricostruisce la cinetica della reazione di PCR (Figura 3.4).



**Figura 3.4** Schema raffigurante la cinetica di reazione in una PCR *real time*. La linea rossa rappresenta il valore di fondo della fluorescenza, la linea azzurra è la soglia oltre la quale la fluorescenza del campione è significativa rispetto al valore di fondo, le linee blu e verdi rappresentano l'amplificazione del campione, tramite la sua fluorescenza. Ct è il "ciclo soglia", durante il quale la fluorescenza del campione ha superato la soglia di rilevanza rispetto al valore di fondo

Da questo grafico vengono poi estrapolati i parametri necessari per la quantificazione. Si definisce ciclo soglia (Ct) il ciclo in cui si osserva un aumento statisticamente significativo nel segnale di fluorescenza rilevato al di sopra del valore di fondo (*Gibson et al.* 1996). Il ciclo soglia è compreso durante la fase esponenziale dell'amplificazione. Maggiore è la quantità iniziale del cDNA bersaglio, più velocemente sarà accumulato il prodotto di PCR, minore sarà il valore di Ct rilevato.

Per l'amplificazione dei geni codificanti per i recettori adrenergici sono state costruite delle coppie di primers specifiche sulla base di sequenze ottenute precedentemente per *A. anguilla* (sequenze ottenute in laboratorio e non ancora pubblicate), e utilizzando software specifici per la costruzione dei primers utilizzabili in protocolli di PCR real time.

Nella fase di messa a punto delle condizioni sperimentali, la specificità dei primers è stata controllata mediante elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di amplificazione; sono stati poi effettuati degli esperimenti preliminari attraverso PCR real time per determinare la coppia di primers migliore da utilizzare per lo scopo del lavoro e i parametri sperimentali ottimali.

È seguita una fase di messa a punto del protocollo per la quantificazione assoluta dei due geni d'interesse. A tal fine, un singolo prodotto di PCR è stato ottenuto per ogni gene d'interesse; questi prodotti sono stati clonati all'interno di un vettore plasmidico utilizzando il STRATACLONE PCR cloning kit (Fermentas).

Il clonaggio è quella tecnica che permette di moltiplicare un segmento di DNA appartenente ad un dato genoma, producendo copie identiche (i cloni). Questo è reso possibile ligando il frammento di interesse all'interno di una piccola molecola di DNA che serve da trasportatore (vettore di clonaggio). Il vettore plasmidico è stato linearizzato dall'enzima Topo isomerasi I proveniente dal virus Vaccinia che si lega al doppio filamento di DNA in siti specifici, e catalizza quindi la ligazione del frammento d'interesse. Avvenuta la fase di trasformazione (inserimento del costrutto nelle cellule di *E. coli*) si è proceduto con la selezione (screening) delle cellule ricombinanti. Il riconoscimento avviene attraverso l'aggiunta di ampicillina ai terreni LB-agar su cui vengono fatte crescere le cellule (poiché solo le cellule trasformate le cellule resistenti) e dell'X-gal, un composto organico che permette di capire quali cellule hanno integrato nel loro genoma il costrutto (plasmide più prodotto di PCR).

Il plasmide ricombinato è stato successivamente estratto dalle colonie positive allo screening utilizzando il kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) e utilizzato come

templato per la costruzione delle curve degli standard da utilizzare nel protocollo di PCR real time.

La miscela di reazione è costituita da: la Fast Sybr Green *master mix* (Life Technologies) contenente tutti i reagenti necessari per l'amplificazione (DNA polimerasi, dNTPs, ecc...) e il reporter Sybr Green I, i due primers forward e reverse, ciascuno alla concentrazione 0,2  $\mu\text{M}$ , e una quantità di cDNA corrispondente a circa 16 ng di RNA totale di partenza. Le reazioni sono state condotte in un sistema per PCR *real time* del tipo StepOne (Life Technologies), impiegando i parametri termici standard per la *master mix* utilizzata.

### **3.10 Analisi statistica**

I dati sono espressi come la media  $\pm$  ES dei valori ottenuti per ciascuno degli esperimenti indipendenti. La significatività dei risultati è stata testata attraverso il software SigmaStat mediante analisi della varianza ANOVA a 1 via seguita dal test di Bonferroni per i confronti tra coppie di gruppi di dati. Le differenze sono considerate statisticamente significative per  $p < 0.05$  ed altamente significative per  $p < 0.01$ .



# 4 RISULTATI

## 4.1 Misure morfometriche

Vengono di seguito riportate le tabelle relative alle misure morfometriche per il calcolo di tre indici: fattore di condizione CF, indice dell'occhio EI e indice di argentinizzazione SI. Il calcolo di questi indici ha permesso di caratterizzare l'animale definendone il sesso, lo stadio di maturazione, il benessere e discriminare tra anguilla gialla o argentina.

**Tabella 4.1** misure morfometriche di 10 anguille gialle delle Valli di Comacchio. Abbreviazioni: lunghezza del corpo (L); peso del corpo (W); lunghezza della pinna pettorale (FL); diametro orizzontale e verticale dell'occhio (EDh, EDv); fattore di condizione, CF; indice dell'occhio, EI; indice di argentinizzazione, SI.

# Anguilla	L (mm)	W (g)	FL (mm)	EDh (mm)	EDv (mm)	CF	EI	SI
1	550	336	24.0	5.63	4.82	0.202	3.90	FII
2	605	404	22.1	6.61	5.46	0.183	4.73	FII
3	530	322	19.6	5.62	5.27	0.217	4.39	FII
4	620	461	27.8	6.21	5.79	0.194	4.56	FII
5	555	297	21.3	5.23	4.68	0.174	3.47	FII
6	535	291	22.7	5.65	4.86	0.190	4.05	FII
7	565	346	21.9	6.20	5.55	0.192	4.80	FII
8	520	287	19.4	5.79	4.61	0.204	4.08	FII
9	510	198	18.3	5.23	4.44	0.149	3.60	FII
10	580	275	19.5	6.62	5.91	0.141	5.31	FII
<b>Media</b>	<b>557</b>	<b>322</b>	<b>21.7</b>	<b>5.87</b>	<b>5.13</b>	<b>0.184</b>	<b>4.28</b>	<b>FII</b>

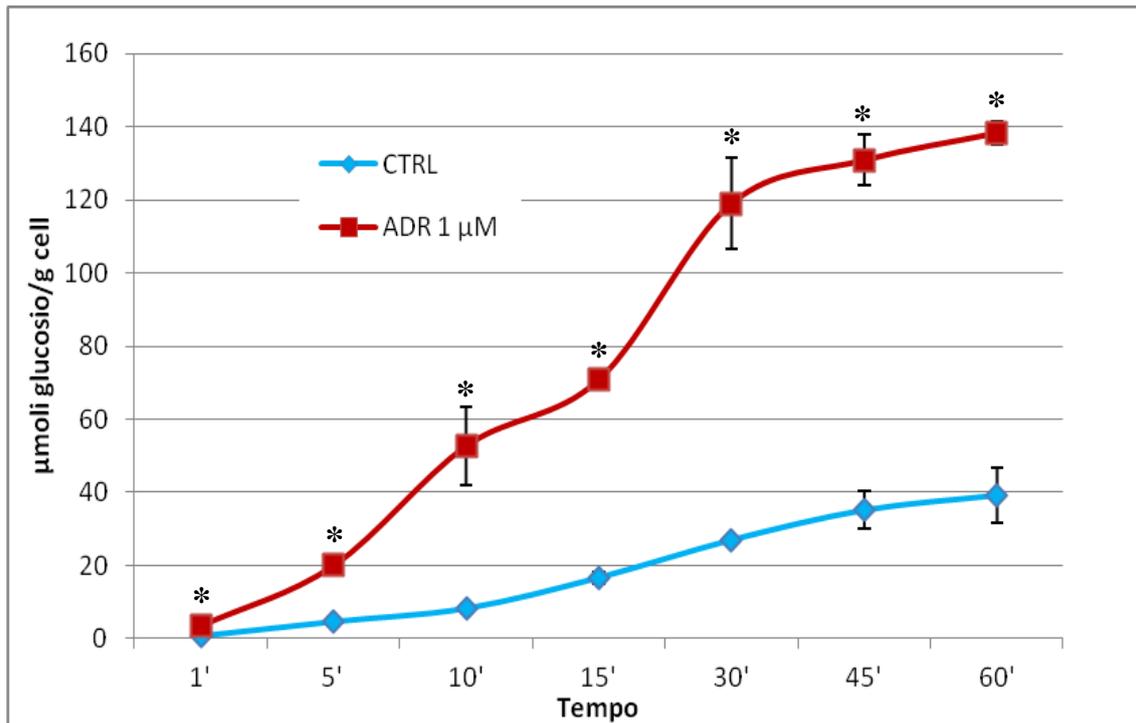
**Tabella 4.2** misure morfometriche di 8 anguille argentine delle Valli di Comacchio. Abbreviazioni: lunghezza del corpo (L); peso del corpo (W); lunghezza della pinna pettorale (FL); diametro orizzontale e verticale dell'occhio (EDh, EDv); fattore di condizione, CF; indice dell'occhio, EI; indice di argentinizzazione, SI.

# Anguilla	L (mm)	W (g)	FL (mm)	EDh (mm)	EDv (mm)	CF	EI	SI
1	820	1860	42.2	9.2	8.5	0.33	7.49	FIV
2	840	1400	39.6	11.0	9.8	0.23	10.04	FIV
3	890	1560	43.6	12.0	11.4	0.22	12.07	FIV
4	935	1690	41.4	11.6	11.2	0.20	10.91	FIV
5	830	1377	34.9	10.0	8.9	0.24	8.44	FIV
6	910	1817	47.7	11.3	10.9	0.24	10.62	FIV
7	790	1168	34.4	9.8	9.4	0.23	9.15	FIV
8	840	1408	41.6	10.9	10.8	0.23	11.00	FIV
<b>Media</b>	<b>856</b>	<b>1535</b>	<b>40.7</b>	<b>10.7</b>	<b>10.1</b>	<b>0.24</b>	<b>10.00</b>	<b>FIV</b>

## 4.2 Anguille gialle

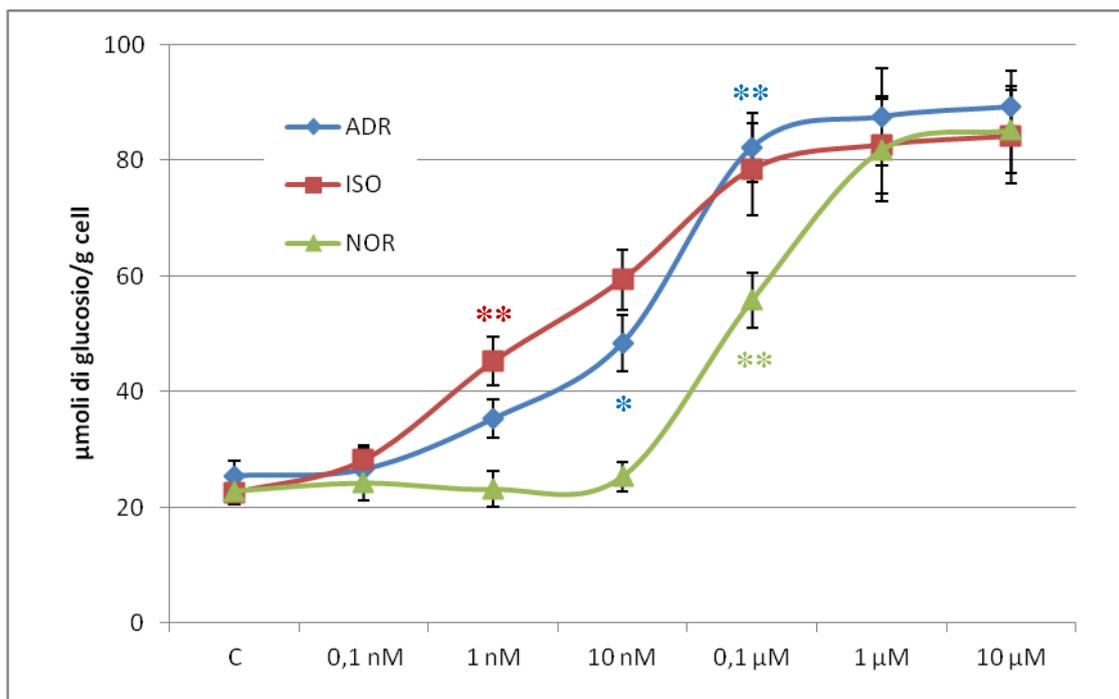
Vengono di seguito riportati i grafici relativi al metabolismo glucidico e all'espressione dei geni codificanti per i recettori adrenergici di tipo  $\alpha$  e  $\beta$  nel fegato di anguille gialle delle Valli di Comacchio.

### 4.2.1 Rilascio di glucosio da epatociti isolati dopo stimolazione ormonale



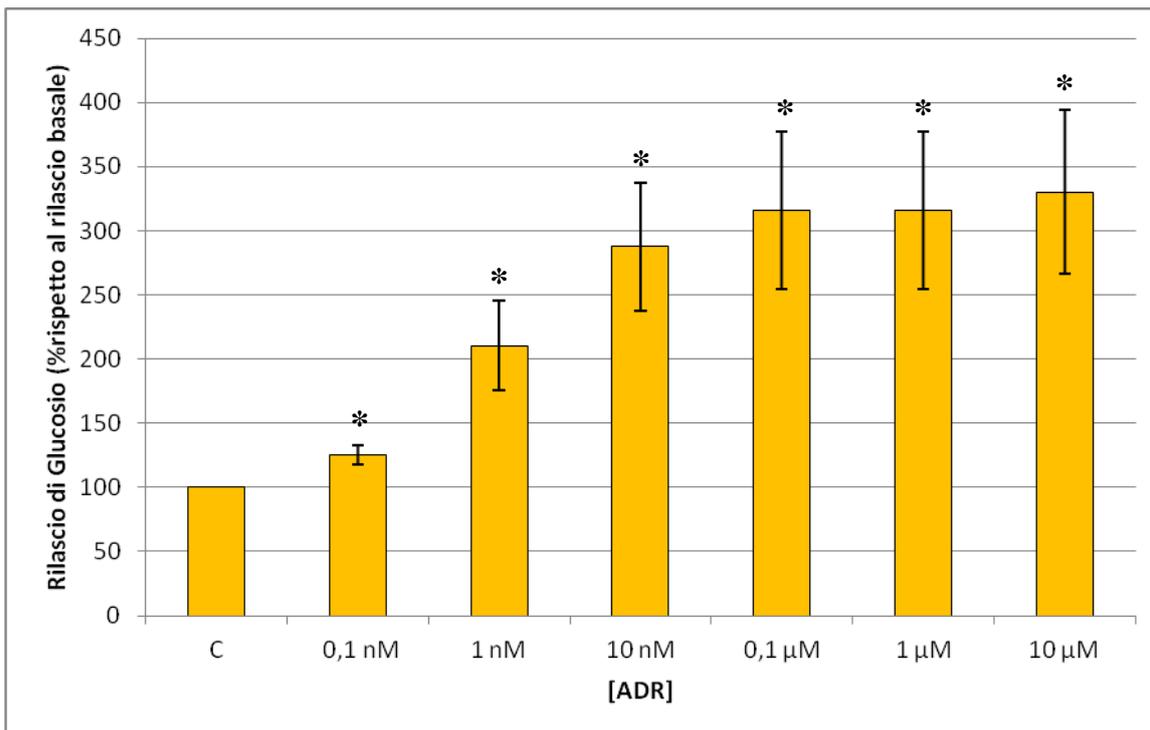
**Figura 4.1** Effetto tempo-dipendente dell'adrenalina (ADR) 1  $\mu$ M sul rilascio di glucosio da epatociti di anguilla gialla posti in incubazione statica. Il grafico rappresenta la media  $\pm$  ES di 3 esperimenti differenti condotti in duplicato. (\* $p < 0.05$  vs ctr allo stesso tempo di esposizione, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Gli epatociti isolati e trattati con ADR hanno mostrato un significativo rilascio di glucosio tempo-dipendente, a seguito della glicogenolisi indotta dall'ormone.



**Figura 4.2** Effetto dose-dipendente dell'adrenalina (ADR), dell'isoprenalina (ISO) e della noradrenalina (NOR) sul rilascio di glucosio da epatociti di anguilla gialla posti in incubazione statica. Il grafico rappresenta i valori assoluti espressi in  $\mu\text{moli di glucosio/g cell}$  di 4 esperimenti differenti condotti in duplicato. \*, \*\*: concentrazione a partire dalla quale l'effetto dell'agonista diventa significativo ( $*p < 0.05$ ) o altamente significativo ( $**p < 0.01$ ) rispetto al proprio controllo. (\*ADR, \*ISO, \*NOR). ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test.

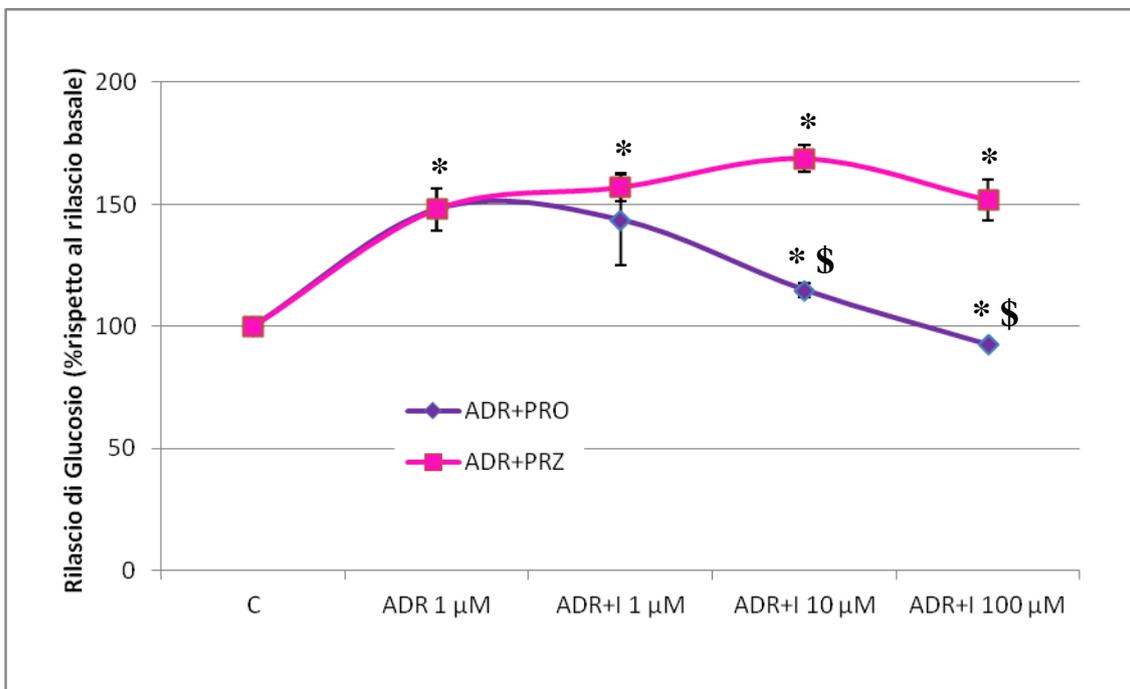
Gli epatociti isolati e trattati con ADR, ISO e NOR mostrano un rilascio di glucosio dose-dipendente, a seguito della glicogenolisi indotta dagli agonisti. L'effetto è più modesto alle concentrazioni più basse per ADR e ISO 0.1-1 nM e per NOR 0.1-10 nM, mentre è maggiore in animali esposti a concentrazioni ormonali tipiche delle situazioni di stress (0.1-1  $\mu\text{M}$  per ADR e ISO).



**Figura 4.3** Effetto dose-dipendente dell'adrenalina (ADR) sul rilascio di glucosio da epatociti isolati di anguilla gialla in incubazione statica. I dati sono espressi come % dei valori di controllo (39.2  $\mu\text{moli/g cell} \pm \text{ES}$ ). Il grafico rappresenta la media  $\pm$  ES di 6 esperimenti differenti condotti in duplicato. (\* $p < 0.05$  vs C, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Gli epatociti isolati e trattati con ADR mostrano un significativo rilascio di glucosio dose-dipendente. L'effetto è più modesto alle concentrazioni più basse dell'ormone (0.1-1 nM) e maggiore ai valori dell'ormone tipici di animali esposti a concentrazioni ormonali tipiche delle situazioni di stress (0.1  $\mu\text{M}$ -1  $\mu\text{M}$ ).

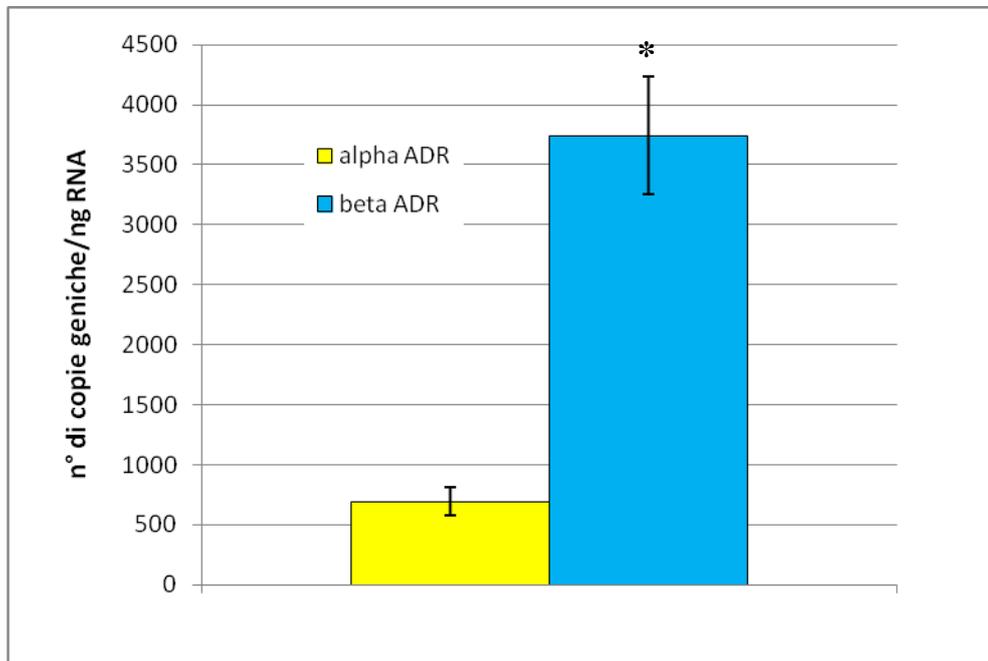
#### 4.2.2 Inibizione dell'effetto dell'adrenalina da parte di propranololo e prazosin



**Figura 4.4** Inibizione dell'effetto dell'adrenalina (1  $\mu\text{M}$ ) sul rilascio di glucosio dagli epatociti isolati in incubazione statica di anguilla gialla in presenza degli antagonisti recettoriali (PRO/PRZ) alle indicate concentrazioni. I dati sono espressi come % dei valori di controllo (62  $\mu\text{mol/g cell} \pm \text{ES}$ ). I risultati sono la media  $\pm$  ES di 3 esperimenti separati condotti in duplicato. Simboli diversi indicano differenze statisticamente significative (\* $p < 0.05$  vs C; \$ $p < 0.05$  vs ADR 1  $\mu\text{M}$ , ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Il pretrattamento degli epatociti con bloccanti dei recettori adrenergici (PRO, bloccante dei recettori  $\beta$ ; PRZ, bloccante dei recettori  $\alpha$ ) mostra che l'effetto dell'ADR è interamente bloccato dalla presenza del PRO, il PRZ è invece inefficace.

### 4.2.3 Espressione dei geni codificanti per i recettori adrenergici di tipo $\alpha$ e $\beta$



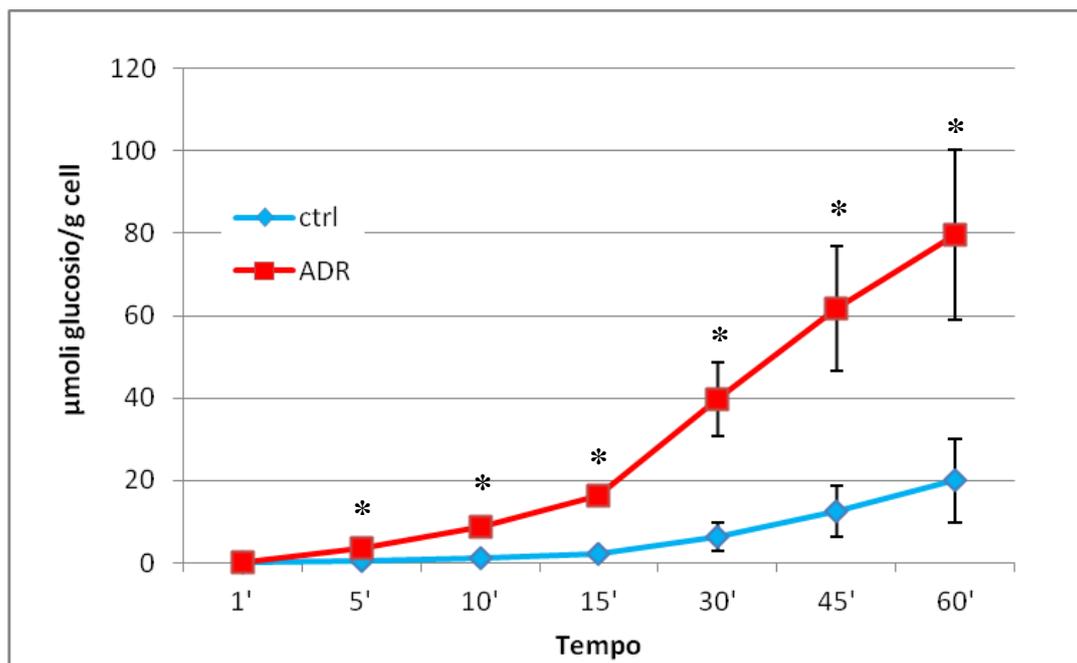
**Figura 4.5** Quantificazione assoluta dei geni codificanti per i recettori adrenergici di tipo  $\alpha$  e  $\beta$  negli epatociti di anguilla gialla. I risultati sono la media  $\pm$  ES di 9 anguille. I valori sono espressi come il numero di copie geniche/ng RNA. L'espressione genica è stata valutata mediante PCR real time secondo quanto riportato nei materiali e metodi. (\* $p < 0,05$ , ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Tramite PCR real time si è osservato che nel fegato di anguille gialle i recettori  $\alpha$  adrenergici costituiscono il 15% del totale, mentre i  $\beta$  costituiscono il rimanente 85%.

## 4.3 Anguille argentine

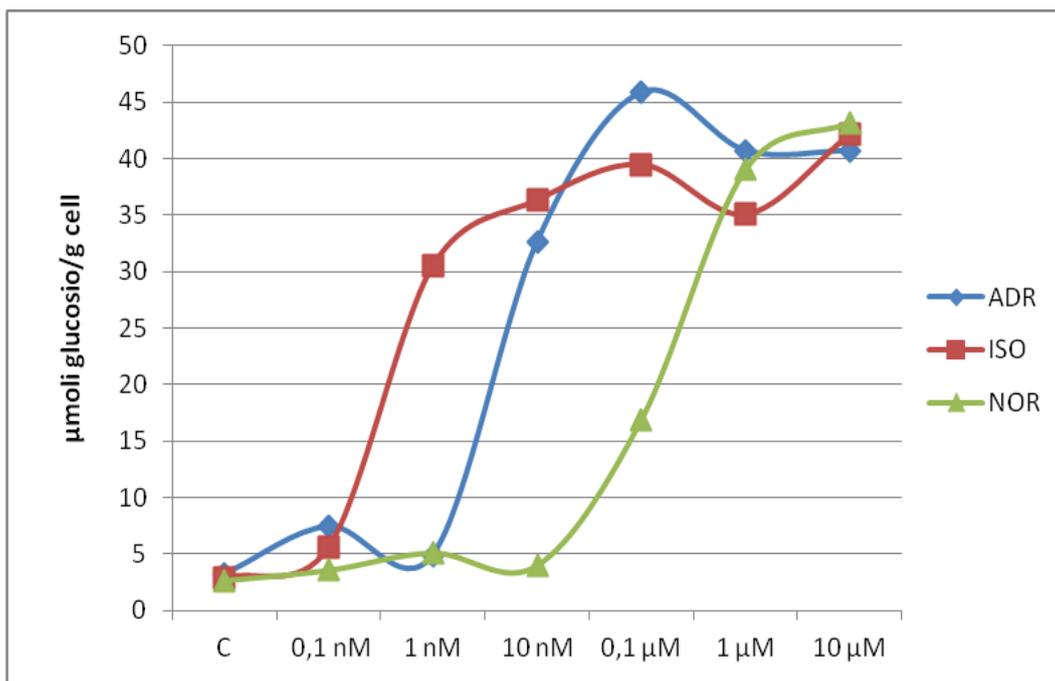
Vengono di seguito riportati i grafici relativi al metabolismo glucidico e all'espressione dei geni codificanti per i recettori adrenergici di tipo  $\alpha$  e  $\beta$  nel fegato di anguille argentine delle Valli di Comacchio.

### 4.3.1 Rilascio di glucosio da epatociti isolati dopo stimolazione ormonale



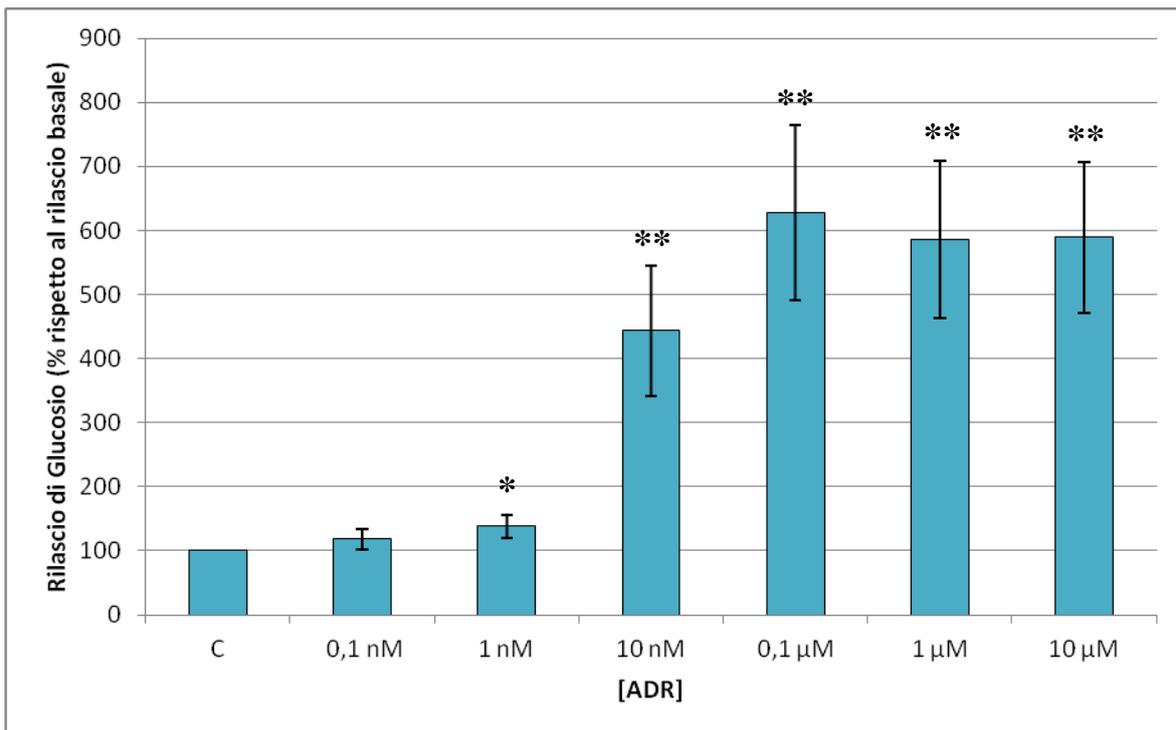
**Figura 4.6** Effetto tempo-dipendente dell'adrenalina (ADR) 1  $\mu$ M sul rilascio di glucosio da epatociti isolati di anguilla argentina posti in incubazione statica. Il grafico rappresenta la media  $\pm$  ES di 4 esperimenti differenti condotti in duplicato. (\* $p < 0.05$  vs ctr allo stesso tempo di esposizione, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Gli epatociti isolati e trattati con ADR hanno mostrato un significativo rilascio di glucosio tempo-dipendente, a seguito della glicogenolisi indotta dall'ormone.



**Figura 4.7** Effetto dose-dipendente dell'adrenalina (ADR), dell'isoprenalina (ISO) e della noradrenalina (NOR) sul rilascio di glucosio da epatociti isolati di anguilla argentina posti in incubazione statica. Il grafico rappresenta i valori assoluti espressi in  $\mu\text{moli}$  di glucosio/g cell di un esperimento condotto in duplicato.

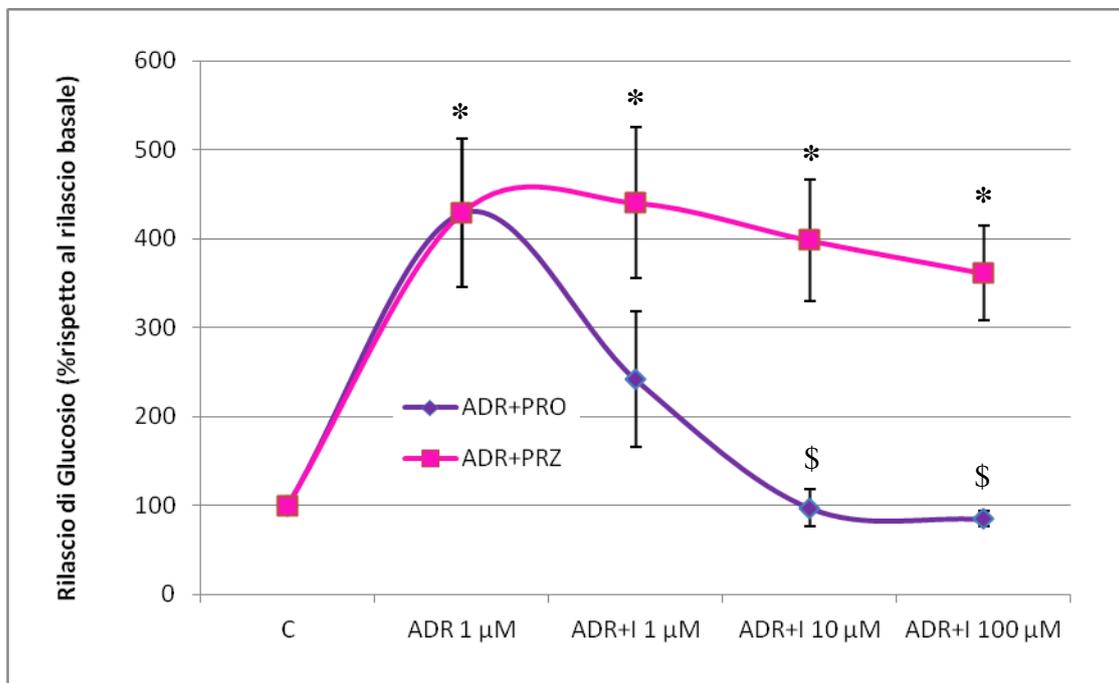
Gli epatociti isolati e trattati con ADR, ISO e NOR mostrano un rilascio di glucosio dose-dipendente, a seguito della glicogenolisi indotta dagli agonisti. L'effetto è più modesto alle concentrazioni più basse per ADR e ISO (0.1-1 nM) e per NOR 0.1-10 nM, mentre è maggiore in animali esposti a concentrazioni ormonali tipiche delle situazioni di stress (0.1-1  $\mu\text{M}$  per ADR e ISO).



**Figura 4.8** Effetto dose-dipendente dell'adrenalina (ADR) sul rilascio di glucosio da epatociti isolati di anguilla argentina in incubazione statica. I dati sono espressi come % dei valori di controllo (5.8  $\mu\text{moli/g cell} \pm \text{ES}$ ) Il grafico rappresenta la media  $\pm$  ES di 8 esperimenti differenti condotti in duplicato. (\*\* $p < 0.01$  vs C; \* $p < 0.05$  vs C, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test)

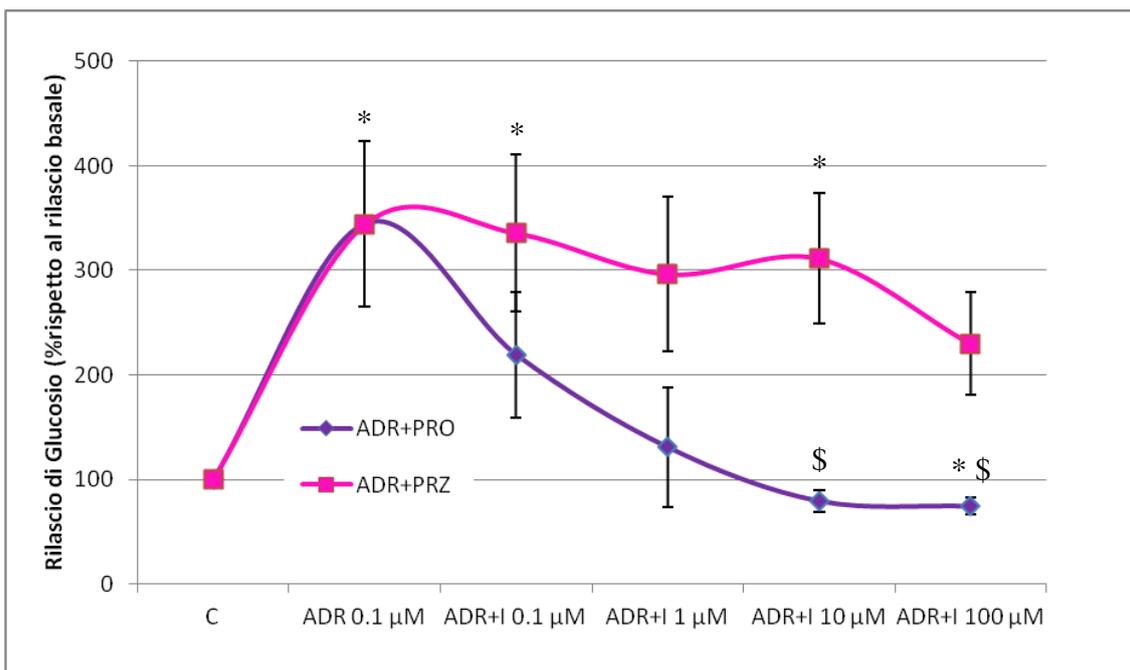
Gli epatociti isolati e trattati con ADR mostrano un significativo rilascio di glucosio dose-dipendente. L'effetto è più modesto alle concentrazioni più basse dell'ormone (0.1-1 nM) e maggiore alle concentrazioni tipiche degli animali esposti a concentrazioni ormonali tipiche delle situazioni di stress (10 nM-10  $\mu\text{M}$ ).

### 4.3.2 Inibizione dell'effetto dell'adrenalina da parte di propranololo e prazosin



**Figura 4.9** Inibizione dell'effetto dell'adrenalina (1  $\mu\text{M}$ ) sul rilascio di glucosio dagli epatociti isolati di anguilla argentina in incubazione statica in presenza degli antagonisti recettoriali (PRO/PRZ) alle indicate concentrazioni. I dati sono espressi come % dei valori di controllo ( $12.3 \mu\text{mol/g cell} \pm \text{ES}$ ). I risultati sono la media  $\pm$  ES di 4 esperimenti separati condotti in duplicato. Simboli diversi indicano differenze statisticamente significative (\* $p < 0.05$  vs C; \$ $p < 0.05$  vs ADR 1  $\mu\text{M}$ , ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

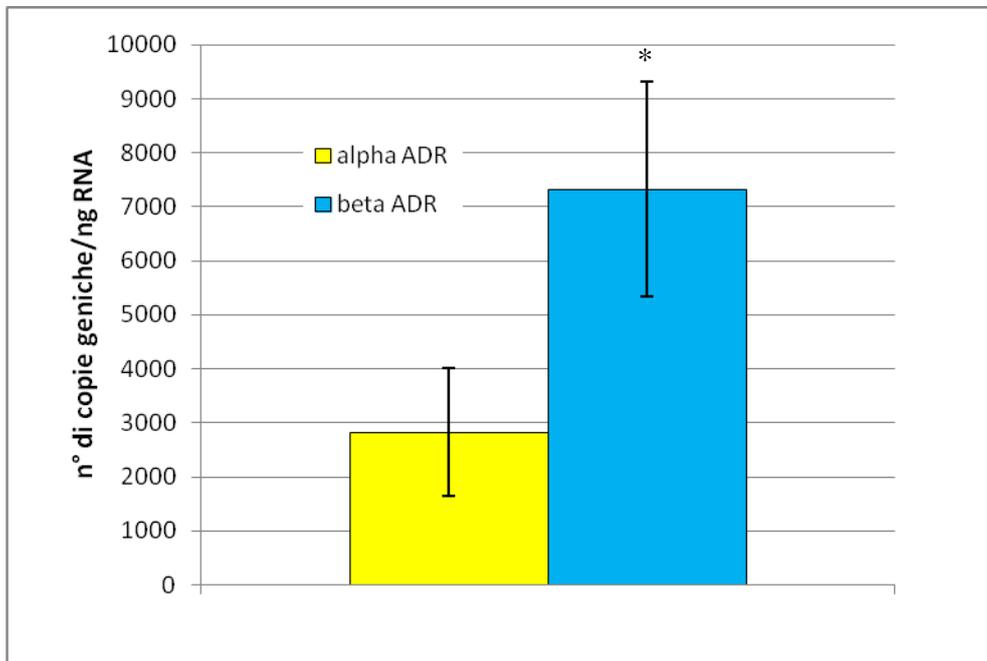
Il pretrattamento degli epatociti con bloccanti dei recettori adrenergici (PRO, bloccante dei recettori  $\beta$ ; PRZ, bloccante dei recettori  $\alpha$ ) mostra che l'effetto dell'ADR è interamente bloccato dalla presenza del PRO, il PRZ è inefficace.



**Figura 4.10** Inibizione dell'effetto dell'adrenalina (0.1 μM) sul rilascio di glucosio dagli epatociti isolati di anguilla argentina in incubazione statica in presenza degli antagonisti recettoriali (PRO/PRZ) alle indicate concentrazioni. I dati sono espressi come % dei valori di controllo (9.5 μmoli/g cell ± ES). I risultati sono la media ± ES di 3 esperimenti separati condotti in duplicato. Simboli diversi indicano differenze statisticamente significative (\*p<0.05 vs C; \$p<0.05 vs ADR 0.1 μM, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Il pretrattamento degli epatociti con bloccanti dei recettori adrenergici (PRO, bloccante dei recettori β; PRZ, bloccante dei recettori α) mostra che l'effetto dell'ADR è bloccato dalla presenza del PRO, il PRZ alla concentrazione più alta agisce in misura molto inferiore sull'ADR ma le differenze non sono statisticamente significative.

### 4.3.3 Espressione dei geni codificanti per i recettori adrenergici di tipo $\alpha$ e $\beta$



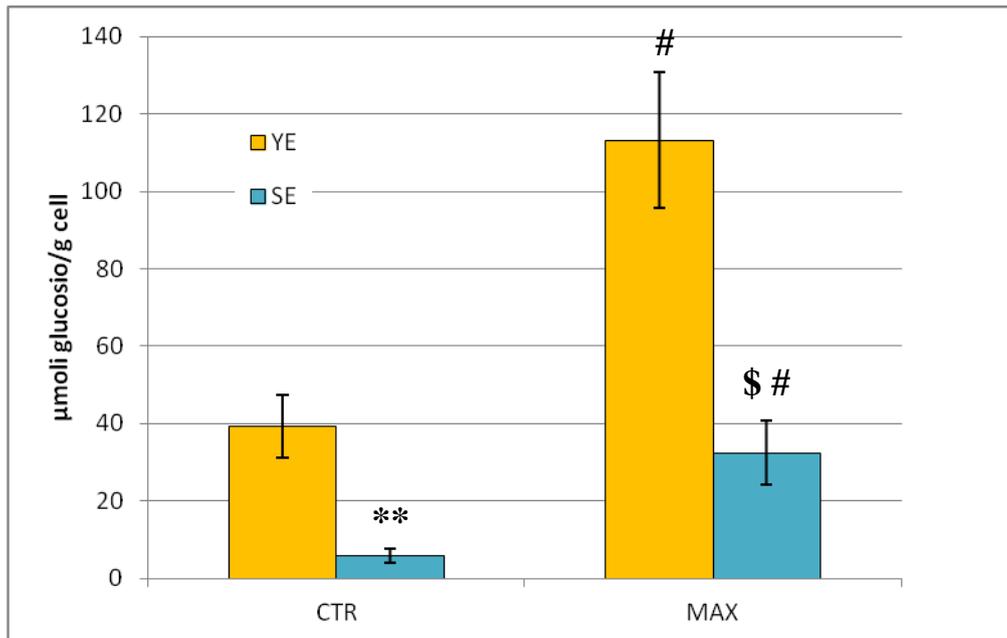
**Figura 4.11** Quantificazione assoluta dei geni codificanti per i recettori adrenergici di tipo  $\alpha$  e  $\beta$  negli epatociti di anguilla argentina. I dati sono stati espressi come la media  $\pm$  ES di 7 anguille. I valori sono espressi come il numero di copie geniche/ng RNA. L'espressione genica è stata valutata mediante PCR real time secondo quanto riportato nei materiali e metodi. (\* $p < 0.05$ , ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Tramite PCR real time si è osservato che nel fegato di anguille argentine i recettori  $\alpha$  adrenergici costituiscono il 28% del totale, mentre i  $\beta$  costituiscono il rimanente 72%.

## 4.4 Confronto tra i due stadi del ciclo biologico

Vengono di seguito riportati i grafici di confronto relativi il metabolismo glucidico e l'espressione relativa dei geni codificanti per i recettori adrenergici di tipo  $\alpha$  e  $\beta$  nel fegato di anguille gialle ed argentine delle Valli di Comacchio.

### 4.4.1 Glucosio rilasciato da epatociti isolati dopo stimolazione ormonale con ADR



**Figura 4.12 Rilascio di glucosio da epatociti isolati di anguilla gialla ed argentina. I valori rappresentano il rilascio di glucosio al livello basale in campioni non trattati (ctr) ed il rilascio massimo di glucosio in campioni trattati con ADR (MAX). I risultati sono la media  $\pm$  ES di 9 anguille gialle e di 8 anguille argentine. Simboli diversi indicano differenze statisticamente significative (\*\* $p < 0.01$  ctr YE vs ctr SE; \$ $p < 0.01$  max YE vs max SE; # $p < 0.01$  max vs ctr, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).**

L'esposizione degli epatociti al trattamento ormonale con l'adrenalina ha mostrato notevoli differenze nel rilascio di glucosio da parte delle cellule tra i due stadi del ciclo biologico. I livelli di glucosio liberato dagli epatociti delle anguille argentine sono significativamente inferiori rispetto a quelli misurati negli epatociti delle anguille gialle. La presenza dell'adrenalina tuttavia induce una stimolazione del rilascio del glucosio molto maggiore nelle anguille argentine piuttosto che nelle gialle.

#### 4.4.2 Livelli di glicogeno

Vengono di seguito riportate le tabelle relative i valori di glicogeno misurati negli epatociti non trattati di 6 anguille gialle e di 8 anguille argentine. I valori di glicogeno sono stati confrontati con i corrispettivi valori di glucosio liberato dalle cellule dopo l'esposizione con l'ADR.

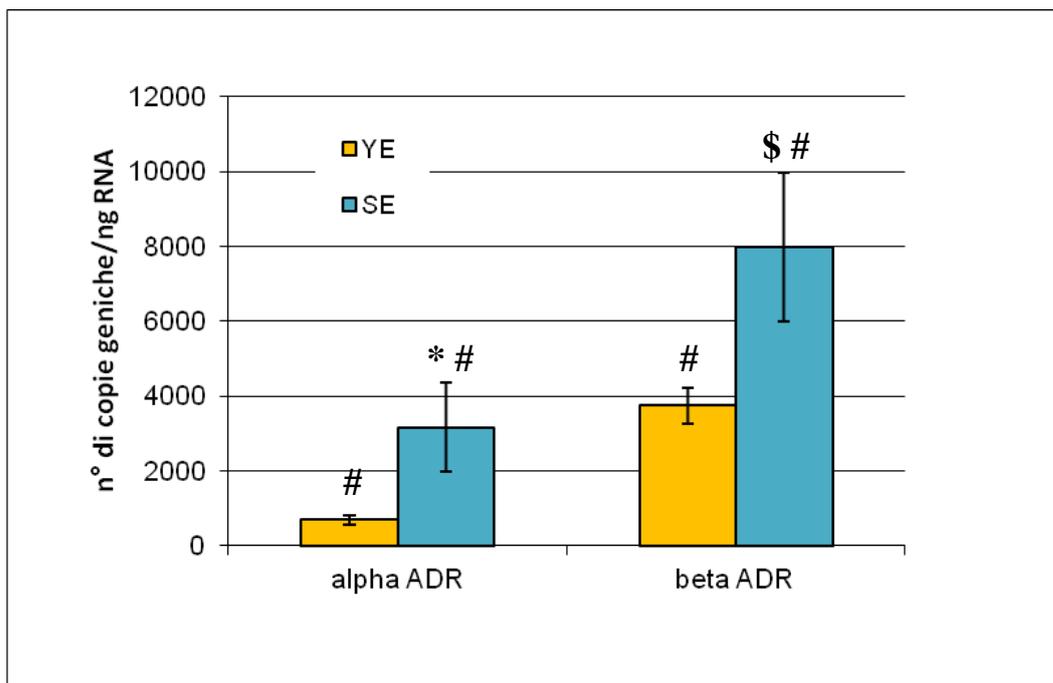
TAB. 4.3 sono riportati in tabella i valori di glicogeno espressi in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  cell ed i valori di glucosio espressi in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  cell di 6 anguille gialle.

# anguilla	$\mu\text{g}$ glicogeno/mg cell	$\mu\text{g}$ glucosio/mg cell
4	262.4	23.2
6	299.4	29.3
7	364.1	24.6
8	281.2	12.0
9	214.8	11.7
10	456.5	18.5
<b>Media valori</b>	313.0	23.2

TAB. 4.4 sono riportati in tabella i valori di glicogeno espressi in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  cell ed i valori di glucosio espressi in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  cell di 8 anguille argentine.

# anguilla	$\mu\text{g}$ glicogeno/mg cell	$\mu\text{g}$ glucosio/mg cell
1	586.3	8.2
2	155.2	9.3
3	17.0	2.8
4	39.1	2.1
5	310.3	11.9
6	291.2	8.9
7	111.1	2.2
8	47.0	1.1
<b>Media valori</b>	194.6	5.8

#### 4.4.3 Differenze nell'espressione genica



**Fig. 4.13** Quantificazione assoluta dei geni codificanti i recettori adrenergici  $\alpha$  e  $\beta$ . I valori sono espressi come numero di copie geniche/ng RNA. I dati rappresentano la media  $\pm$  ES di 9 anguille gialle e 7 anguille argentine. L'espressione genica è stata valutata mediante PCR real time secondo quanto riportato nei materiali e metodi. Simboli diversi indicano differenze statisticamente significative (\* $p < 0.05$   $\alpha$  YE vs  $\alpha$  SE, \$ $p < 0.05$   $\beta$  YE vs  $\beta$  SE, # $p < 0.05$  ratio  $\alpha/\beta$ , ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Tramite PCR real time si è osservata una differenza significativa tra il numero di copie geniche dei recettori adrenergici espresse nelle anguille gialle e nelle anguille argentine. Risultano espresse circa 4.000 copie geniche nel primo caso e più di 11.000 copie geniche nel secondo.

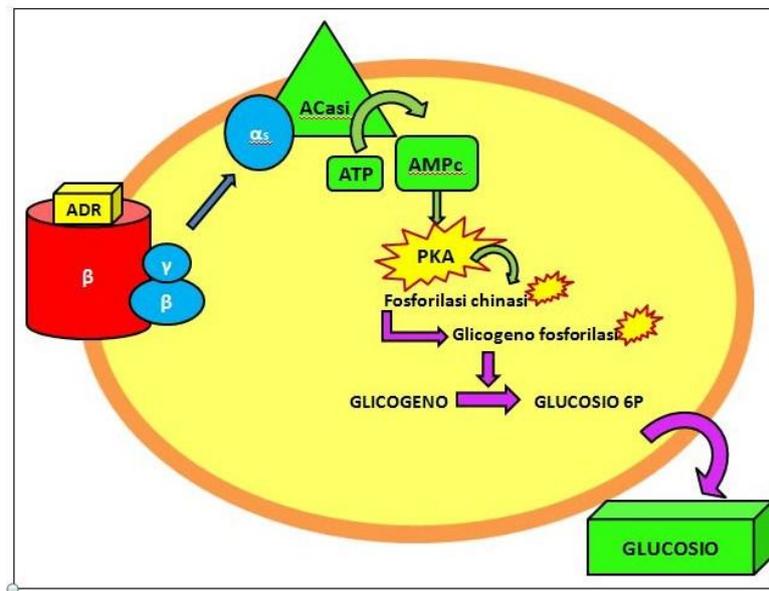


## **5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

I pesci rispondono alle modificazioni del proprio ambiente interno o esterno alterando la concentrazione ematica di catecolamine (CA). Questa è considerata una risposta compensatoria per ottimizzare le funzioni cardiovascolari e respiratorie e mobilitare le risorse energetiche per far fronte all'aumentata richiesta metabolica. Questo lavoro di tesi si è concentrato sul ruolo dell'adrenalina (ADR) nel controllo epatico del metabolismo glucidico dell'anguilla europea *A. anguilla*. L'interesse è dovuto principalmente al fatto che il controllo adrenergico delle funzioni epatiche non è del tutto chiarito nei teleostei, e in particolare sono necessarie informazioni inerenti i recettori adrenergici espressi in questo organo. Le anguille sono modelli sperimentali particolarmente interessanti a questo fine, perché alcune conoscenze pregresse offrono le basi a studi più approfonditi. Inoltre, le anguille offrono anche la possibilità di studiare la funzione epatica in animali in stadi del ciclo vitale molto diversi dal punto di vista energetico, le anguille gialle e le anguille argentine. Le prime sono animali nella fase di accrescimento, mentre le seconde sono animali che si preparano alla migrazione riproduttiva subendo una profonda metamorfosi. L'anguilla europea infatti compie una migrazione lunga migliaia di chilometri, circa 6.000, senza nutrirsi, nuotando per mesi sfruttando le risorse energetiche accumulate prima dell'ingresso in mare. Si può pensare quindi che il controllo adrenergico del metabolismo glucidico, così come quello lipidico, siano profondamente diversi tra i due stadi.

Diversi studi sull'anguilla europea *A. anguilla* (Brighenti et al., 1987) e sull'anguilla americana *A. rostrata* (Fabbri et al., 1998a) hanno dimostrato che l'ADR stimola le cellule epatiche a rilasciare glucosio attraverso un meccanismo di trasduzione del segnale a secondo messaggero, mediato dai recettori adrenergici di tipo  $\beta$ . Gli epatociti di *A. anguilla* infatti, presentano recettori  $\beta$  adrenergici ad alta affinità (Fabbri et al., 2000) la cui occupazione da parte dell'ormone innesca una serie di reazioni intracellulari quali la stimolazione dell'adenilil ciclasi (AC), l'aumento dei livelli di AMPc, l'attivazione dell'enzima glicogeno fosforilasi che porta alla degradazione del glicogeno con conseguente formazione di glucosio 6-fosfato (Fabbri et al., 1998a).

Quest'ultimo all'interno degli epatociti viene defosforilato e rilasciato nel sangue sotto forma di glucosio (Figura 5.1).

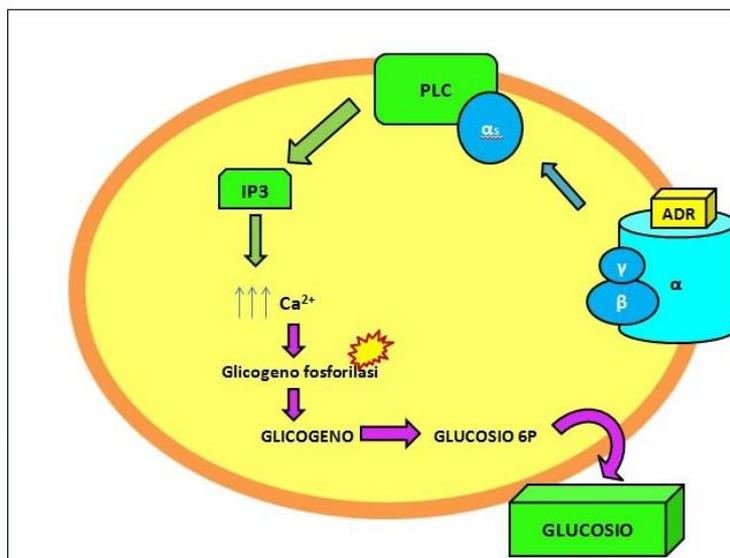


**Figura 5.1** Regolazione β adrenergica del metabolismo glucidico nel fegato di anguilla

Studi successivi hanno dimostrato che l'ADR non attiva solo il meccanismo d'azione AMPc-dipendente accoppiato ai recettori di tipo β negli epatociti di anguilla. Infatti, studi condotti parallelamente sul fegato di *A. rostrata* e di *I. melas*, hanno dimostrato la presenza anche dei recettori α che promuovono un aumento di  $[Ca^{2+}]$ , dopo l'interazione con l'ormone (Fabbri et al., 1995a). Questi risultati hanno avuto un significato di estrema rilevanza nell'ambito dell'endocrinologia comparata e della fisiologia, poiché hanno smentito la teoria evolutiva secondo la quale i recettori α nel fegato sarebbero comparsi per la prima volta solo negli animali endotermi (Fabbri et al., 1998b).

Il legame dell'ADR ai recettori α stimola l'attività della fosfolipasi C (PLC) la quale porta ad un incremento dei livelli citosolici di  $IP_3$  che causa un aumento della concentrazione intracellulare di  $Ca^{2+}$ . Ciò comporta l'attivazione dell'enzima glicogeno fosforilasi che porta alla degradazione del glicogeno con conseguente formazione di glucosio 6-fosfato; quest'ultimo dopo defosforilazione viene trasformato in glucosio e rilasciato nel sangue (Figura 5.2). Fu uno studio condotto alla fine degli anni '90 (Fabbri et al., 1999) che dimostrò che l'ADR era in grado di indurre il rilascio di

glucosio dagli epatociti mediante la via recettoriale di tipo  $\alpha$ . Questo meccanismo è stato evidenziato utilizzando un sistema dinamico che rendeva le cellule più sensibili all'ormone rispetto all'incubazione statica.



**Figura 5.2 Regolazione  $\alpha$  adrenergica del metabolismo glucidico di anguilla**

Tuttavia, la farmacologia è stata di poco aiuto in questi studi in quanto non sono noti agonisti che interagiscono in maniera specifica sui recettori  $\alpha$  adrenergici, anzi la fenilefrina che è un agonista  $\alpha$  adrenergico nei mammiferi, interagisce con i recettori  $\beta$  adrenergici nei pesci.

In questo lavoro di Tesi è stato condotto uno studio sperimentale per chiarire il meccanismo recettoriale attraverso il quale l'ADR regola la mobilizzazione di glucosio nel fegato di *A. anguilla* in due stadi differenti del ciclo biologico. Si è voluto inoltre esplorare un nuovo aspetto finora mai trattato riguardante l'espressione dei geni codificanti per i recettori adrenergici di tipo  $\alpha$  e  $\beta$  e la loro quantificazione assoluta nel fegato di *A. anguilla*. Infine, si sono fornite in assoluto le prime evidenze concernenti il controllo adrenergico nel fegato delle anguille argentine.

Dai risultati ottenuti dalle misurazioni morfometriche è stato possibile sviluppare degli indici che hanno permesso di caratterizzare gli animali presi in esame potendo così definirne il sesso e lo stadio di maturazione. Premettendo che gli animali erano tutte

femmine, si sono distinti 2 stadi differenti del ciclo biologico: uno stadio di crescita FII, in cui le anguille si nutrono e cominciano a differenziarsi sessualmente (anguille gialle) ed uno stadio FIV, contraddistinto dalla produzione di gonadotropina e dalla cessazione dell'alimentazione (anguille argentine). Differenze simili sono state riportate nello studio di Carrieri et al. (1992) che ha mostrato una lunghezza massima di 465 mm per i maschi ed una lunghezza minima di 525 mm per le femmine. Gli esemplari appartenenti al primo stadio sono infatti tutti animali dalla livrea gialla di lunghezza media di 557 mm e di peso medio di 322 g (TAB. 4.1). Gli esemplari appartenenti al secondo stadio invece, sono animali dalla livrea argentina di lunghezza media di 856 mm e di peso medio di 1535 g (TAB. 4.2).

Gli epatociti isolati da anguille gialle e trattati con ADR hanno mostrato un significativo rilascio di glucosio tempo-dipendente, a seguito della glicogenolisi indotta dall'ormone (Figura 4.1). L'effetto è anche dose-dipendente, con effetto più modesto alle concentrazioni fisiologiche dell'ormone (0.1-1 nM) e maggiore ai valori coincidenti con quelli di animali esposti a stress (0.1-1  $\mu$ M) (Figura 4.3). Da studi precedenti è noto che questi effetti possono essere determinati dall'interazione dell'adrenalina con recettori adrenergici di tipo  $\alpha$  e/o  $\beta$  (Fabbri et al., 1995a).

Il pretrattamento degli epatociti con bloccanti dei recettori adrenergici (PRO, bloccante dei recettori  $\beta$ ; PRZ, bloccante dei recettori  $\alpha$ ) mostra che l'effetto dell'ADR 1  $\mu$ M è interamente bloccato dalla presenza del PRO alle concentrazioni più alte (10-100  $\mu$ M), mentre il PRZ è inefficace (Figura 4.4). Esperimenti precedenti, condotti alle stesse condizioni sperimentali, hanno evidenziato il medesimo effetto inibitorio del PRO rispetto all'ADR 0.1  $\mu$ M e la stessa inefficacia del PRZ.

In queste condizioni sperimentali quindi, i recettori  $\beta$  sembrano i recettori responsabili dell'intero effetto adrenergico sulla glicogenolisi. Al pari dell'ADR, sono efficaci anche la noradrenalina, che nei mammiferi ha maggior affinità per i recettori  $\alpha$  adrenergici, e l'agonista recettoriale isoprenalina, farmaco  $\beta$  stimolante (Figura 4.2).

Analogamente, gli epatociti isolati da anguille argentine e trattati con ADR hanno mostrato un significativo rilascio del glucosio tempo-dipendente, a seguito della glicogenolisi indotta dall'ormone (Figura 4.6); ed un significativo rilascio dose-

dipendente (Figura 4.8). L'effetto dose-dipendente è più modesto a valori fisiologici dell'ormone (0.1-1 nM) e maggiore alle concentrazioni tipiche degli animali esposti a stress (0.1-1  $\mu$ M)

Il pretrattamento degli epatociti con bloccanti dei recettori adrenergici mostra che l'effetto dell'ADR 1  $\mu$ M è bloccato, in maniera significativa, dalla presenza del PRO; il PRZ al contrario è inefficace (Figura 4.9). L'effetto inibitorio del PRO si riscontra anche rispetto all'ADR 0.1  $\mu$ M; per quanto riguarda il PRZ si osserva un piccolo e non significativo effetto soltanto alla concentrazione più elevata (Figura 4.10). In queste condizioni sperimentali quindi, non è stata provata l'efficienza del bloccante  $\alpha$  adrenergico, sebbene ormai sia noto che entrambi i tipi di recettori sono coinvolti nel controllo adrenergico sulla glicogenolisi. I dati riguardanti le anguille argentine quindi mostrano che i recettori principalmente responsabili dell'effetto adrenergico sulla glicogenolisi epatica sono i recettori di tipo  $\beta$ . In conclusione, l'effetto dell'interazione dell'adrenalina con i recettori  $\alpha$  è stato osservato soltanto nelle incubazioni dinamiche di epatociti di anguilla posti su colonnine di resina, condotte nello stesso laboratorio in precedenza (Caselli et al., 2002). L'apporto della interazione con i due recettori era osservato con ADR 10 nM mentre con ADR 1  $\mu$ M si osservava il solo effetto via recettori  $\beta$ . Da quei risultati fu formulata l'ipotesi che i recettori  $\alpha$  nel fegato di anguilla siano molto meno numerosi dei  $\beta$  e che intervengano nelle regolazioni epatiche soltanto in condizioni fisiologiche, a livelli nM di adrenalina, mentre in condizioni di stress l'effetto è interamente mediato dai recettori  $\beta$ .

Un dato interessante è rappresentato dai diversi livelli di glucosio libero negli epatociti. I livelli di glucosio nelle anguille gialle studiate in questa tesi concordano con tutti gli studi precedenti. I valori ottenuti, per la prima volta in assoluto, per le anguille argentine sono significativamente inferiori rispetto a quelli misurati nelle anguille gialle. Viceversa, la presenza dell'ADR induce una stimolazione del rilascio del glucosio molto maggiore nelle anguille argentine piuttosto che nelle anguille gialle (Figura 4.12).

I livelli più bassi di glucosio rilasciato spontaneamente dalle cellule potrebbero essere motivati da una minore riserva di glicogeno presente nel fegato. Uno studio condotto su tre specie differenti di salmonidi, ha stabilito che esiste una relazione lineare tra i livelli

di glucosio liberati dalle cellule e la concentrazione iniziale di glicogeno in esse presente (Mommsen, 1985), anche se questa relazione non fu poi dimostrata in altre specie di pesci studiate. Per rispondere a questa domanda, sono stati pertanto misurati i livelli di glicogeno negli epatociti sia nelle anguille gialle che nelle anguille argentine. I risultati ottenuti mostrano una quantità media di 313  $\mu\text{g}$  di glicogeno/g cell per le anguille gialle (Tabella 4.3); ed una quantità media di 194  $\mu\text{g}$  di glicogeno/g cell per le anguille argentine (Tabella 4.4). In queste condizioni sperimentali quindi, gli epatociti di anguilla argentina hanno circa il 40% in meno di glicogeno rispetto agli epatociti di anguilla gialla. Le differenze però non risultano statisticamente significative data l'elevata variabilità nei campioni delle anguille argentine, variabilità che si è riscontrata in tutte le analisi condotte su questi animali. Esiste tuttavia una chiara relazione tra i livelli di glicogeno presente negli epatociti ed i livelli di glucosio liberato dopo il trattamento ormonale; infatti per le anguille argentine, a bassi livelli di glicogeno corrispondono bassi livelli di glucosio rilasciato (Tabella 4.4). Questo dato conferma l'ipotesi di Mommsen (1985); inoltre dal punto di vista fisiologico, le anguille argentine potrebbero aver investito nell'accumulo di lipidi piuttosto che di glicogeno per far fronte alla lunga migrazione nella quale l'alimentazione viene a mancare e per la quale le riserve lipidiche costituiscono le scorte principali per il raggiungimento dell'areale di riproduzione (Van Ginneken e Van den Thillart, 2000). Il fegato di questi animali era visibilmente più grasso rispetto alle anguille immature, per confermare questa ipotesi però occorrono studi sul metabolismo lipidico, argomento che non è stato trattato in questo lavoro di Tesi poiché l'attenzione è stata incentrata sul metabolismo glucidico.

Nonostante i bassi livelli di glucosio liberato, le anguille argentine mostrano una risposta all'ormone superiore di circa 3 volte rispetto alle anguille gialle. Tale risposta potrebbe essere giustificata da una maggiore efficienza del sistema enzimatico intracellulare ai fini della glicogenolisi o da un maggior numero di recettori all'ormone espressi dagli epatociti.

Al pari dell'ADR, sono efficaci anche la noradrenalina e l'agonista recettoriale isoprenalina (Figura 4.7). Gli epatociti isolati e trattati con ADR, ISO e NOR mostrano un rilascio di glucosio dose-dipendente, a seguito della glicogenolisi indotta dagli

agonisti. L'effetto è più modesto alle concentrazioni più basse per ADR e ISO 0.1-1 nM e per NOR 0.1-10 nM, mentre è maggiore in animali esposti a stress (0.1-1  $\mu$ M per ADR e ISO). La NOR agisce a concentrazioni più alte (1-10  $\mu$ M) in accordo con il fatto che la sua affinità per i recettori  $\beta$  è minore rispetto a quella dell'ADR.

La presenza dei recettori adrenergici sulle membrane cellulari è un argomento studiato da tempo nel fegato dei pesci. Tuttavia le metodologie utilizzate per questi studi, ossia il binding recettoriale e i test farmacologici, non hanno dato risultati definitivi. Questo è accaduto perché l'affinità dei ligandi recettoriali sintetizzati per interagire con i recettori umani non sempre è adeguata per gli studi sui pesci. Infatti, esperimenti di sequenziamento genico hanno mostrato che ci sono poche ma cruciali differenze nella sequenza aminoacidica dei recettori adrenergici tra i mammiferi e i pesci (Chen et al., 2007) che verosimilmente modificano l'affinità dei recettori per i ligandi. Tali studi precedenti hanno fornito le sequenze di varie specie che, allineate, sono servite per disegnare i primers ed ottenere le sequenze dei recettori di anguilla (non ancora pubblicate). Sulla base di queste, sono stati disegnati primers adatti per essere utilizzati in questa nuova ricerca inerente l'espressione dei recettori  $\alpha$  e  $\beta$  adrenergici nel fegato di anguilla mediante PCR real time. Questo studio rappresenta il primo condotto nei pesci, e fornisce finalmente una risposta circa l'espressione relativa dei geni codificanti i recettori  $\alpha$  e  $\beta$  nel fegato ed il numero assoluto di copie geniche espresse.

Per ottenere i dati relativi all'espressione genica è stata necessaria una prima fase di messa a punto delle condizioni sperimentali (controllo della specificità e scelta dei primers), seguita da una fase di messa a punto del protocollo per la quantificazione assoluta dei geni d'interesse. Dopo aver effettuato esperimenti di clonaggio, tramite PCR real time abbiamo osservato che nel fegato delle anguille gialle i recettori  $\alpha$  adrenergici costituiscono il 15% del totale, mentre i  $\beta$  costituiscono il rimanente 85% (Figura 4.5). Questo dato giustifica in maniera inequivocabile le numerosi osservazioni precedenti, secondo le quali il controllo adrenergico del metabolismo glucidico è in minima parte controllato attraverso i recettori  $\alpha$ . Nelle anguille argentine, i recettori  $\alpha$  adrenergici aumentano e costituiscono il 28% del totale, mentre i  $\beta$  costituiscono il rimanente 72% (Figura 4.11). Questa pur modesta variazione del rapporto può rendere

conto del pur altrettanto modesto effetto del bloccante dei recettori  $\alpha$  PRZ sulla glicogenolisi indotta dall'ADR, ma serviranno ulteriori studi per caratterizzare gli effetti ottenuti attraverso i recettori  $\alpha$  nel fegato delle anguille argentine.

Molto interessante è un'ulteriore osservazione, relativa alla significativa differenza tra il numero di copie geniche dei recettori adrenergici espresse nelle anguille gialle e nelle anguille argentine (Figura 4.13). Infatti, risultano espresse circa 4.000 copie geniche nel primo caso e più di 11.000 copie geniche nel secondo. In particolare le anguille argentine hanno recettori  $\beta$  espressi circa 2 volte in più rispetto alle anguille gialle e recettori  $\alpha$  espressi circa 4 volte in più rispetto alle gialle.

Da tempo si cerca la spiegazione al fatto che la contemporanea presenza dei due tipi di recettori è documentata ma l'effetto fisiologico appare essenzialmente mediato soltanto dai recettori  $\beta$ . Nell'insieme, questi risultati confermano quanto solo ipotizzato in vari studi pubblicati negli ultimi due decenni che non sono stati avvalorati da adeguati risultati sperimentali. Possiamo concludere affermando che i recettori  $\alpha$  e  $\beta$  adrenergici sono entrambi espressi negli epatociti di pesce e possono essere contemporaneamente presenti sulla membrana cellulare; la proporzione tra loro, in seguito a studi di espressione genica, giustifica il ruolo significativamente maggiore giocato dai recettori  $\beta$ . Inoltre, in diverse fasi del ciclo vitale così come si osserva nell'ontogenesi dei mammiferi, i recettori adrenergici sono espressi in quantità differente.

Questo lavoro di Tesi vuole dare un contributo alle conoscenze sulla fisiologia dei pesci in particolare per quanto riguarda il controllo adrenergico sul metabolismo glucidico di *A. anguilla*. Inoltre getta le basi per migliorare le conoscenze sull'anguilla europea in quella fase di maturazione sessuale (argentina) in cui si assiste a innumerevoli modificazioni morfologiche e metaboliche dove l'assetto energetico è molto differente dalla fase immatura (gialla).

Ulteriori studi potrebbero chiarire il ruolo dei recettori  $\alpha$  nel controllo adrenergico del metabolismo glucidico nelle anguille argentine, dato il loro aumento di circa 4 volte nel passaggio dalla fase II (immatura) alla fase IV (matura).

## **6 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

- Aarestrup K., Økland F., Hansen M., Righton D., Gargan P., Castonguay M., Bernatchez L., Howey P., Sparholt H., Pedersen M.I., McKinley R.S., 2009. Oceanic Spawning Migration of the European Eel (*Anguilla anguilla*) Science 325, 1660.
- Aarestrup K., Thorstad B., Koed A., Svendsen C., Jepsen N., Pedersen M., Økland F., 2010. Survival and progression rates of large European silver eel *Anguilla anguilla* in late freshwater and early marine phases. Aquat Biol 9, 263–270.
- Ahlquist R.P., 1948. A study of adrenotropic receptors. Am J Physiol 153, 586–600.
- Astrom, M., Dekker, W., 2007. When will the eel recover? A full life-cycle model. J Mar. Sci. 64, 1491-1498
- Barton B.A., 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. Integ. Comp. Biol. 42, 517-525.
- Beaulaton L., Briand C., 2007. Effect of management measures on glass eel escapement. ICES J. Mar. Sci. 64, 1402–1413.
- Bernard C., 1859. Leçons sur les propriétés physiologiques et les altérations pathologiques des liquides de l'organisme. Paris: JB 1877, 316-317.
- Blaschko H., 1939. The specific action of L-DOPA decarboxylase. J. Physiol. London, 96:50–1.
- Brighenti L., Puviani A.C., Gavioli M.E., Fabbri E., Ottolenghi C., 1987. Catecholamine effect on cyclic adenosine 3':5'-monophosphate level in isolated catfish hepatocytes. Gen. Comp. Endocrinol. 68, 216-223.
- Busby E.R., Cooper G.A., Mommsen T.P., 2002. Novel role for prostaglandin E2 in fish hepatocytes: regulation of glucose metabolism. J. Endocrinol. 174, 137–146.
- Bylund D.B., Eikenberg D.C., Hiebel J.P., et al., 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. Pharmacol. Rev. 46, 121-36.
- Cannon W.B., 1927. A Laboratory Course in Physiology. Cambridge, MA: Harvard University Press.

- Carrieri A., Cavallini G., Plazzi M., Rossi R., 1992. Struttura della popolazione di anguille gialle ed argentine (*Anguilla anguilla* L.) nelle Valli di Comacchio (biennio 1989-90), Sezione: Biologia e Medicina, vol. 2, N. 1.
- Caselli F., Capuzzo A., Piano A., Valbonesi P., Fabbri E., 2002. G proteins immunodetection and adrenergic transduction pathways in the liver of *Anguilla anguilla*. *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 609-16.
- Chen X., Perry S.F., Aris-Brosou S., Selva C., Moon T.W., 2007. Characterization and functional divergence of the  $\alpha 1$  adrenoceptor gene family: insights from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiol. Genomics.* 32, 142-153.
- Chomczynski P., Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-9.
- CITES, 2008. Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora: appendices I, II, and III. United Nations Environmental Programme, International Environment House, Geneva.
- Colombo G., Rossi R., 1978. Environmental influences on growth and sex ratio in different eel populations. *Physiology and behaviour of marine organisms.*, D.S. McLusky and A. J. Berry eds, Pergamon Press, 312-321.
- Colombo, L.; Belvedere, P., Pickering, A.D., Schreck, C.B., 1989. Stress inducing factors and stress reaction in aquaculture, in: *Aquaculture Europe*. European Aquaculture Society 12, 93-121.
- Cotecchia S., 2010. The  $\alpha 1$ -adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J. Rec. Signal. Trans.* 30, 410-419.
- Davey J.H., Donald J.J., 2005. Sex determination in freshwater eels and management options for manipulation of sex. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 15, 37–52.
- Dekker, W., 2003. Eel stocks dangerously close to collapse. *ICES newsletter* 40, 10-11.
- Desonay Y., Guerault D., 1997. Seasonal and long-term changes in biometrics of eel larvae: a possible relationship between recruitment variation and north atlantic ecosystem productivity. *J. Fish. Biol.* 51, 317–339
- Docherty J.R., Hyland L., 1985. Vascular alpha 2-adrenoceptors can mediate nerve stimulation-evoked contractions. *Clin.Sci.* 10, 117-120.

- Docherty J.R., 1998. Subtypes of functional  $\alpha 1$  – and  $\alpha 2$  – adrenoceptors. Eur. J. Pharmacol. 361, 1-15.
- Durif C., Guibert A. and Elie P., 2009. Morphological discrimination of the silvering stages of the european eel. American fisheries society simposium 58, 103-111.
- Eales J.G., Higgs D.A., Uin L.M., MacLatchy D.L., Bres O., McBride J.R., Dosanjh B.S., 1990. Influence of dietary lipid and carbohydrate levels and chronic 3, 5, 30-triiodo-Lthyronine treatment on thyroid function in immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 80, 146–154.
- Eales J.G., MacLatchy D.L., Higgs D.A., Dosanjh B.S., 1992. The influence of dietary protein and caloric content on thyroid function and hepatic thyroxine 50-monodeiodinase activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Can. J. Zool. 70, 1526–1535.
- EC (European Commission), 2007. Council regulation (EC) No. 1100/2007 of 18 September 2007 “Establishing measures for the recovery of the stock of European eel”. Off. J. Eur. Union, 248, 17–23.
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2009. Guidance on Good Practice in Conducting Scientific Assessments in Animal Health using Modelling. EFSA Journal; 7(12):1419
- Exton J.H., 1985. Mechanisms involved in  $\alpha$ -adrenergic phenomena. Am. J. Physiol. 248, 633-647.
- Fabbri E., Brighenti L., Ottolenghi C., Puviani A.C., Capuzzo A., 1992.  $\beta$ -Adrenergic receptors in catfish liver membranes: Characterization and coupling to adenylate cyclase. Gen. Comp. Endocrinol. 85, 254-260.
- Fabbri E., Moon T.W., 1994a. Adrenergic receptors and second second messenger systems in liver of vertebrates. Persp. Comp. Endocrinol. NRC Canada, 499-506.
- Fabbri E., Puviani A.C., Ottolenghi C., Capuzzo A., 1994b. Identification of  $\alpha$ -Adrenergic receptors in catfish liver and their involvement in glucose release. Gen. Comp. Endocrinol. 95, 457-463.

- Fabbri E., Gambarotta A., Moon T.W., 1995a. Adrenergic signaling and second messenger production in hepatocytes of two fish species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99, 114-124.
- Fabbri E., Capuzzo A., Gambarotta A., Moon T.W., 1995b. Characterization of adrenergic receptors and related transduction pathways in the liver of the rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B, 643-651.
- Fabbri E., Barbin L., Capuzzo A., Biondi C., 1998a. Adenylyl cyclase activity and glucose release from the liver of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Am. J. Physiol.* 275, 1563-1570.
- Fabbri E., Capuzzo A., Moon T.W., 1998b. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 120, 177-192.
- Fabbri E., Buzzi M., Biondi C., Capuzzo A., 1999.  $\alpha$ -adrenoceptor-mediated glucose release from perfused catfish hepatocytes. *Life Sci.* 65, 27-35.
- Fabbri E., Selva C., Moon T.W., Capuzzo A., 2000. Characterization of [<sup>3</sup>H]CGP 12177 binding to  $\beta$ -adrenergic receptors in intact eel hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 223-231.
- Fabbri E., Chen X., Capuzzo A., Moon T.W., 2008. Binding kinetics and sequencing of hepatic  $\alpha_1$  adrenergic receptors in two marine teleosts, mackerel (*Scomber scombrus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *J Exp. Zool.* 309A, 157-165.
- Feunteun, E.E., 2002. Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain. *Ecol. Eng.* 18, 575–591.
- Fontaine M., 1975. Physiological mechanisms in the migration of marine and amphihaline fish. *Adv. mar. Biol.*, 13, 241-355.
- Fulton T.W., 1904. The rate of growth of fishes. 22nd Annual Report of the Fishery Board of Scotland Part III, 141-241.
- Garcia-Sainz J.A., Olivares-Reyes A., Macias-Silva M., Villalobos-Molina R., 1995. Characterization of the  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors of catfish hepatocytes: functional and binding studies. *Gen. Comp. Endocrinol* 97:111-120.

- Gibson, U. E., Heid, C. A., Williams, P. M., 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6, 995-1001.
- Giltrow E., Eccles P.D., Hutchinson T.H., Sumpter J.P., Rand-Weaver M., 2011. Characterisation and expression of  $\beta$ 1-, $\beta$ 2- and  $\beta$ 3- adrenergic receptors in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 173, 483-90.
- Graham R.M., Perez D.M., Hwa J., 1996. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ. Res.* 78, 737-749.
- Haenen, O.L.M., Lehmann, J., Engelsma, M.Y., Stürenberg, F.-J., Roozenburg, I., Kerkhoff, S., Klein Breteler, J., 2010. The health status of European silver eels, *Anguilla anguilla*, in the Dutch River Rhine Watershed and Lake IJsselmeer. *Aquaculture* 309, 15-24.
- Harris D.M., Cohn H.I., Pesant S., Eckhart A.D., 2008. GPCR signaling in hypertension: role of GRKs. *Clin. Sci.* 115, 79-89.
- ICES, 2002. Report of the ICES/EIFAC working group on eels. ICES CM 2002\ACFM:03.
- ICES, 2006. Report of the 2006 session of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels. ICES CM 2006/ACFM:16 Ref. DFC, LRC, RMC.
- Janssens P.A., Lowrey O., 1987. Hormonal regulation of hepatic glycogenolysis in the carp. *Cyprinus carpio*. *Am. J. Physiol.* 252, 653-660.
- Johansson P., 1984.  $\alpha$ -adrenoceptors: recent development and some comparative aspects. *Comp. Biochem. Physiol.* 78C:253-261.
- Khafizov K., Lattanzi G., Carloni P., 2009. G protein inactive and active forms investigated by simulation methods. *Proteins* 75, 919-930.
- Kirk, R.S., 2003. The impact of *Anguillicola crassus* on European eels. *Fisheries Manag. Ecol.* 10,385–394.
- Koops H., Hartmann F., 1989. *Anguillicola*-infestations in Germany and in German eel imports. *J. App. Ichthyol.* 5, 41–45.
- Lecomte-Finiger R., 1992. Growth history and age at recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure. *Mar. Biol.* 114, 205-210.

- Leung – Norman L.Y., Woo Y.S., 2011. Influence of dietary carbohydrate level on endocrine status and hepatic carbohydrate metabolism in the marine fish *Sparus sarba*. Fish. Physiol. Biochem. DOI 10.1007/s10695-011-9534-8.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L.A., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-276.
- Massarsky A., Trudeau V.L., Moon T.W., 2011.  $\beta$ -blockers as endocrine disruptors: the potential effects of human  $\beta$ -blockers on aquatic organisms. J. Exp. Zool. 315, 251-265.
- Mommsen T.P., 1986. Comparative gluconeogenesis in hepatocytes from salmonid fishes. Can. J. Zool. 64, 1110-1115.
- Moon T.W., 1983. Metabolic reserves and enzyme activities with food deprivation in immature American eels *Anguilla rostrata* (LeSueur). Can. J. Zool. 61, 802-811.
- Moon T.W., Capuzzo A., Puviani C., Ottolenghi C., Fabbri E., 1993.  $\alpha$ -Mediated changes in hepatocyte intracellular calcium in the catfish, *Ictalurus melas*. Am. J. Physiol. 264, E735-40.
- Morata P., Vargas A.M., Pita M.L., Sanchez-Medina F., 1982. Hormonal effects on the liver glucose metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Gen. Comp. Endocrinol. 72, 543-545.
- Nikinmaa M., 1983. Adrenergic regulation of haemoglobin oxygen affinity in rainbow trout red cells. J. Comp. Physiol. 152, 67-72.
- Ottolenghi C., Puviani A.C., Gavioli M.E., Brighenti L., 1985. Epinephrine effect on carbohydrate metabolism in isolated and perfused catfish liver. Gen. Comp. Endocrinol. 59, 219-229.
- Palstra A., Curiel D., Fekkes M., De Bakker M., Székely C., Van Ginneken V., Van den Thillart G., 2007. Swimming stimulates oocyte development in European eel. Aquaculture 270, 321-332.
- Pankhurst N. W., Sorensen P. W., 1984. Degeneration of the alimentary tract in sexually maturing European *Anguilla anguilla* (L.) and American eels *Anguilla rostrata* (LeSueur), Can. J. Zool. 62, 1143-1149.
- Poli A., 2006. Fisiologia degli animali. Regolazione, diversità, adattamento. Zanichelli.

- Randall D., Burggren W., French K., 1999. *Fisiologia animale, meccanismi e adattamenti*. Zanichelli.
- Reid S.G., Bernier N.J., Perry S.F., 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol.* 120, 1-27.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Seyle H., 1956. *The Stress of Life*, McGraw-Hill 324 pp.
- Sulakhe S.J., Pulga V.B., Tran S., 1988. Hepatic  $\alpha 1$  and  $\beta$  adrenergic receptors in various animal species. *Mol. Cell. Biochem.* 83:81-88.
- Tesch F.W., 2003. *The eel*. Blackwell, Oxford (UK).
- Thorpe A., Ince B.W., 1974. The effect of pancreatic hormones, catecholamines and glucose loading on blood metabolites in northern pike (*Exos lucius* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 23, 29-44.
- Tseng Y., Hwang P., 2008. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 148,419–429.
- Van Heeswijk JC, Vianen GJ, van den Thillart GE., 2006. The adrenergic control of hepatic glucose and FFA metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): increased sensitivity to adrenergic stimulation with fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145(1):51-61.
- Van Ginneken J. T., van den Thillart G.E., 2000. Eel fat stores are enough to reach the sargasso. *Nature* 403, 156-157.
- Van Ginneken J. T., Maes G., 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Rev. Fish. Biol. Fisheries* 15, 367–398.
- Wendelaar Bonga, 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- Zhang J., Désilets M., Moon T.W., 1992. Evidence for the modulation of cell calcium by epinephrine in fish hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 263, 512-519.