

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E
NATURALI

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**STUDIO DELLA DIVERSA ESPRESSIONE DI PROTEINE
DEL SIERO NELLE ANGUILLE (*Anguilla anguilla*)
GIALLE ED ARGENTINE MEDIANTE ANALISI
PROTEOMICA**

Tesi di laurea in Adattamenti degli Animali all'Ambiente Marino

Relatore:

Prof.ssa Elena Fabbri

Presentata da:

Andrea Cavacini

Correlatore:

Prof. Enzo Spisni

III sessione

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

1 – INTRODUZIONE	pag.4
1.1 Famiglia <i>Anguillidae</i> – caratteri generali	pag.4
1.1.1 Inquadramento sistematico dell'anguilla	pag.4
1.1.2 Morfologia e caratteri distintivi	pag.6
1.1.3 Distribuzione e biologia	pag.7
1.1.4 Abitudini e alimentazione	pag.11
1.1.5 La pesca nelle Valli di Comacchio	pag.13
1.1.6 Sfruttamento e stato della risorsa delle anguille	pag.14
1.1.7 Riproduzione	pag.16
1.1.8 Il processo di argentinizzazione	pag.18
1.1.9 Migrazione	pag.28
1.1.10 Fisiologia del nuoto	pag.30
2 - SCOPO DELLA TESI	pag.41
3 - MATERIALI E METODI	pag.44
3.1 Campionamento	pag.44
3.2 Misure morfometriche	pag.45
3.3 Dosaggio delle proteine con metodo Bradford	pag.49
3.4 Preparazione campioni per 2D	pag.49
3.5 Caricamento dell'estratto proteico su strip per la prima dimensione	pag.51
3.6 Prima dimensione (Isoelettrofocalizzazione)	pag.53
3.7 Seconda dimensione	pag.54
3.8 Decolorazione e acquisizione del gel	pag.58
3.9 Identificazione degli spot	pag.59
4 - RISULTATI	pag.61
5 - DISCUSSIONE	pag.72
6 - CONCLUSIONI	pag.86
7 – BIBLIOGRAFIA	pag.89

1 – INTRODUZIONE

1.1 Famiglia *Anguillidae* – caratteri generali

1.1.1 Inquadramento sistematico delle anguille

Dominio: Eukaryota

Regno: Animalia

Sottoregno: Eumetazoa Bilateria

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclasse: Gnathostomata

Classe: Actinopterygii

Sottoclasse: Neopterygii

Infraclasse: Teleostei

Superordine: Elopomorpha

Ordine: Anguilliformes

Sottordine: Anguilloidei

Famiglia: Anguillidae

Genere: *Anguilla*

Specie: *Anguilla anguilla*

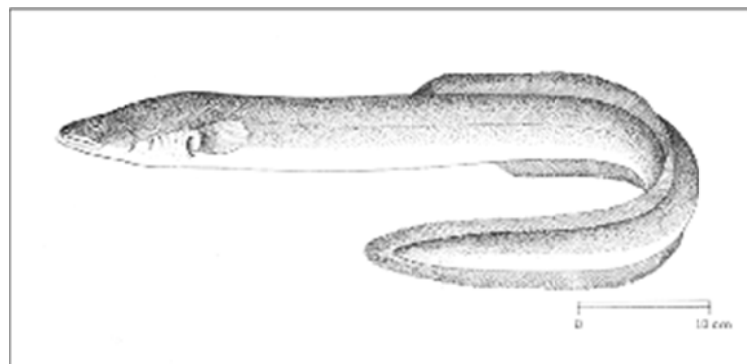


Fig.1 Schema di *Anguilla anguilla* (FAO)

Gli anguillidi hanno ossa frontali distinte. La lingua è libera solo in parte dal pavimento boccale. I fori nasali sono in posizione laterale. La bocca è terminale con mandibola prominente. I denti, conici, sono disposti in bande sulle mascelle e sul complesso premaxillo-vomerino. Piccoli denti sono presenti anche sulle ossa faringee. L'osso mascellare è articolato con l'etmoide. Le squame, cicloidi, sono immerse nel tegumento e ricoperte da uno strato di muco. Il corpo è allungato e serpentiforme con la linea laterale ben sviluppata. La pinna anale e quella dorsale sono confluenti con la pinna caudale, le cui vertebre sono senza processi laterali.

Come unico genere attribuito agli *Anguillidae*, i caratteri tassonomici corrispondono a quelli della famiglia di appartenenza. Le specie di questo genere sono caratterizzate dalla riproduzione in mare e fase trofica, in seguito a metamorfosi, in acque interne. *Anguilla anguilla* è presente in tutte le acque del continente europeo. Il popolamento dei bacini idrografici avviene da parte di individui che provengono dall'area di riproduzione situata nel Mar dei Sargassi. Una volta attraversato l'Oceano Atlantico, una parte delle giovani anguille, ancora allo stadio premetamorfico di "leptocefalo", penetra nel Mar Mediterraneo attraverso lo stretto di Gibilterra; mentre un'altra parte raggiunge le coste atlantiche e baltiche.

Il genere *Anguilla* è presente in tutti gli oceani. Si conoscono 16 specie, tutte migratrici catadrome. Due sono quelle che interessano l'areale atlantico, entrambe dislocate nell'emisfero settentrionale: la prima, *Anguilla rostrata*, risale nelle acque interne dell'America interessando un'area costiera che si estende dalla punta meridionale della Groenlandia fino alla Guyana; l'altra, *Anguilla anguilla*, è distribuita nelle acque del versante atlantico dell'Africa, nel Mediterraneo, lungo tutta la costa atlantica europea spingendosi oltre Capo Nord.

Le restanti 14 specie sono diffuse nei versanti africano e asiatico dell'Oceano Indiano e nell'areale orientale del Pacifico, dalla Nuova Zelanda al Giappone.

1.1.2 Morfologia e caratteri distintivi

Il corpo serpentiforme è subcilindrico nella parte anteriore che si comprime in senso laterale nella parte posteriore. Il muso è appiattito nella parte distale con la mandibola più lunga della mascella superiore. La bocca, in posizione terminale, presenta dei denti conici di uguali dimensioni, inseriti su entrambe le mascelle e sul vomere. Gli occhi piccoli e rotondi sono in posizione arretrata rispetto all'apertura boccale e al di sopra della stessa.

Le due paia di narici anteriori (inalanti) sono tubuliformi e in posizione avanzata. Le narici posteriori (esalanti) sono posizionate vicine al bordo anteriore degli occhi. Tra le due aperture è presente la rosetta olfattoria formata da 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 fanno sì che l'olfatto sia il senso principale dell'anguilla.

La fessura branchiale è stretta e in avanti rispetto all'inserzione delle tondeggianti pinne pettorali. La pinna dorsale è lunga con origine posta a metà della distanza tra l'apice delle pettorali e l'ano, mentre la pinna anale ha l'origine davanti alla metà della lunghezza del corpo. Entrambe confluiscono formando una pinna caudale diflocerca. Tutte le pinne sono caratterizzate da raggi molli.

Le piccole scaglie cicloidi, che compaiono dopo il sesto anno di vita, disposte in gruppi irregolari su tutto il corpo, sul capo e alla base delle pinne, sono di forma ellittica.

La linea laterale, situata lungo il centro dei fianchi, inizia dall'estremità superiore della fessura branchiale raggiungendo l'estremità posteriore del corpo. La pelle è viscida a causa della secrezione delle ghiandole mucipare di cui è ricca l'epidermide.

La colorazione varia in rapporto all'habitat, alla taglia e allo stadio di sviluppo. Il colore bruno-verdastro del dorso con ventre bianco o giallastro è prerogativa delle anguille in fase trofica, cioè le anguille "gialle". Quelle che iniziano la migrazione riproduttiva presentano, invece, una colorazione più scura sul dorso e argenteo sul ventre. Si tratta delle anguille cosiddette "argentine" caratterizzate da occhi più grandi, pelle più spessa e pinne pettorali più appuntite nel bordo posteriore.

La lunghezza totale delle femmine è di 100 cm con un peso medio di 2 kg, mentre i maschi non superano i 50 cm e i 200 g. Non si osserva dimorfismo sessuale, a parte il fatto che, nelle anguille argentine, la taglia dei maschi, che acquisiscono questa condizione prima delle femmine, è inferiore e consente facilmente il riconoscimento del sesso (Colombo *et al.*, 1978).

1.1.3 Distribuzione e biologia

L'anguilla europea (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1798) è una specie eurialina catadroma, caratterizzata da un ciclo biologico piuttosto complesso (Fig.2), considerato unico in relazione all'ampiezza della migrazione riproduttiva degli adulti e di quella larvale. L'anguilla è un animale migratorio, la cui area di riproduzione si trova parecchio distante dall'areale di distribuzione. La riproduzione, infatti, avviene nell'Oceano Atlantico (Fig.3), in particolare nel Mar dei Sargassi (Schmidt, 1923), dove lo stesso studioso danese trovò le larve di dimensioni più piccole negli anni '20.



Fig.2 Ciclo biologico dell'anguilla europea *Anguilla anguilla* (Ontario Ministry of Natural Resources)

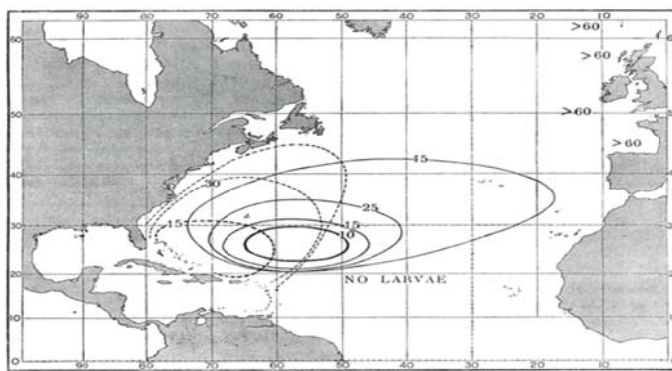


Fig.3 Area di riproduzione e limite di distribuzione delle larve dell'anguilla europea (J.Schmidt)

L'anguilla attraversa una lunga fase di sviluppo larvale nella quale è depigmentata. Il "leptocefalo" è la forma larvale marina tipica degli anguilliformi e presenta una forma nastriforme che poi mutuerà in un aspetto fogliiforme. Compresa in senso laterale, la piccola larva trasparente misura 4-5 mm. Come conseguenza della mancanza di pigmento, nella larva si possono osservare in trasparenza i numerosi miotomi (Fig.4), il cui numero (112-117) corrisponde al numero di vertebre dell'adulto.

Si sviluppa, dopo 24 ore, dalla schiusa dell'uovo, grande pochi millimetri e il cui numero può essere di alcuni milioni per ciascuna femmina, nell'area riproduttiva del Mar dei Sargassi. La deposizione delle stesse uova avviene nel periodo che va da marzo a luglio.

Durante un periodo di 3-4 anni, in cui è trasportata passivamente dalla Corrente del Golfo attraverso l'Oceano Atlantico e fino alle coste europee, cresce fino a una lunghezza massima di 85 mm (Lecomte-Finiger, 1992). Studi recenti basati sulla microstruttura degli otoliti suggeriscono, però, che possa essere di un solo anno la durata della migrazione (Desaunay *et al.*, 1997).

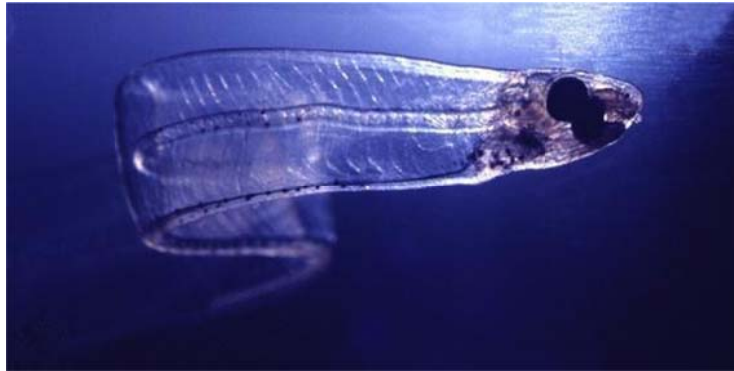


Fig.4 *Anguilla anguilla* allo stadio di leptocefalo (Wikipedia)

Ai margini della platea continentale delle coste atlantiche, i leptocefali, portati attraverso lo Stretto di Gibilterra, subiscono una metamorfosi graduale. In questa fase il corpo si riduce in dimensioni, acquistando una forma subcilindrica. L'ano, posto indietro, si sposta in avanti così come l'origine della pinna dorsale. A metà della lunghezza del corpo, lungo la corda, appaiono i primi abbozzi delle vertebre. I leptocefali metamorfosano, quindi, in piccole anguille trasparenti, chiamate "ceche", delle dimensioni di 100 mm (Fig.5).



Fig.5 *Anguilla anguilla* allo stadio di ceca (www.cpn.it)

Iniziano, pertanto, una migrazione anadroma, penetrando cioè nelle acque interne dolci e nuotando contro corrente. Colonizzano le acque continentali e costiere dell'Atlantico e del Mediterraneo, raggiungendo a poco a poco l'aspetto definitivo, già evidente nelle giovani anguille denominate "ragani". La permanenza nelle acque interne è di circa 8-15 anni per gli individui di sesso maschile, e di 10-18 anni per le femmine. Il passaggio dal mare alle acque dolci avviene mediante un meccanismo chiamato "selective tidal transport" o STT (McCleave *et al.*, 1987).

Durante questa fase le ceche vanno incontro a cambiamenti fisiologici, e accrescendosi perdono la trasparenza per accumulo di pigmento. Passato un anno dopo la metamorfosi misurano 8 cm, mentre alla fine del secondo anno dai 17 ai 19 cm, ed è in questa fase che compaiono le scaglie.

Lo stadio successivo, chiamato di anguilla "gialla" in relazione alla livrea che l'animale assume nel corso dell'accrescimento, ha una durata variabile che va dai 3 agli 8 anni per i maschi e dai 5 ai 15 per le femmine (Tesch, 2003).

La maturazione sessuale inizia mentre le anguille sono ancora nelle acque continentali, e lo sviluppo delle gonadi va di pari passo con modificazioni a carico di vari organi e della livrea.

Infatti le pinne pettorali aumentano significativamente contribuendo a stabilizzare l'animale in mare aperto. Si assiste a cambiamenti fenotipici in cui il sistema endocrino gioca un ruolo fondamentale.

Le anguille argentine sono sessualmente più sviluppate rispetto a quelle gialle, anche se le gonadi rimangono in uno stadio pre-pubertale (Dufour *et al.*, 2003). L'occhio diventa più grande, le narici si dilatano, il muso diviene più stretto e l'intestino si riduce di dimensioni mentre gli organi riproduttivi si accrescono (Pankhurst, 1984). Le scaglie e la linea laterale si fanno più evidenti (Dave *et al.*, 1974) con la pelle che assume uno spessore maggiore. La struttura e il metabolismo del fegato si riducono (Hara *et al.*, 1980).

Prima di entrare in mare, l'anguilla argentina ha il tempo per il necessario adattamento fisiologico alle condizioni marine. Meccanismi di osmoregolazione, che permettono la vita nell'acqua salata, sono già attivi prima che l'animale lasci l'acqua dolce (Fontaine, 1975).

Questa fase, nella quale l'anguilla è detta "argentina", avviene in un periodo compreso tra i 7 e i 20 anni, quando le femmine misurano tra i 50 e i 100 cm e i maschi fra i 30 e i 50 (Durif *et al.*, 2009).

1.1.4 Abitudini e alimentazione

L'anguilla riesce ad adattarsi a differenti condizioni ecologiche, distribuendosi nelle acque interne e nelle zone salmastre colonizzando ogni tipo di ecosistema acquatico. Questa specie predilige substrati molli nei quali può infossarsi nei periodi più freddi, ma si adatta anche a fondi duri dove sono presenti anfratti e nascondigli. In assenza di questi, l'anguilla può scavare delle buche dove trovare un riparo.

Sono gli esemplari di sesso femminile a spingersi maggiormente nell'entroterra, mentre i maschi si fermano nel tratto inferiore dei corsi d'acqua e lungo le coste marine.

L'anguilla è una specie eurialina che tollera variazioni molto forti di salinità, temperatura e pressione. Riesce a sopportare basse concentrazioni d'ossigeno, riuscendo a sopravvivere a lungo anche fuori dall'acqua in ambienti sufficientemente umidi, svolgendo una respirazione cutanea resa possibile da un'ampia vascolarizzazione della pelle.

Dotata di un organo olfattivo sviluppato, l'anguilla ha abitudini lucifughe; infatti si muove in cerca di cibo specialmente quando tramonta il sole fino alle prime luci dell'alba, restando infossata nel fango nelle ore più calde.

Durante la stagione invernale si nutre di meno. Questo comportamento si riscontra in particolare nelle acque dolci; in acque salate, invece, si sposta anche di giorno, specialmente con la presenza di acqua torbida, e lo stesso succede anche nel periodo invernale. La sua attività è massima nelle ore di alta marea.

Le cieche e i ragani si alimentano di piccoli organismi bentonici. A taglie maggiori continuano a manifestare preferenze bentofaghe, indirizzate alla cattura di diversi invertebrati di fondo. Oltre certe dimensioni si sviluppano anche tendenze ittiofaghe.

L'anguilla si nutre principalmente di uova e di avannotti di pesci. Le anguille di lunghezza minore di 35 cm predano preferibilmente larve d'insetti (*Chironomus*) e policheti (*Nereis*), mentre gli esemplari di taglia superiore si nutrono di pesci (*Aphanius fasciatus*) e, tra i crostacei, decapodi (*Carcinus*) e anfipodi (*Gammarus*).

Viene predata raramente da mammiferi e pesci carnivori perché il suo sangue contiene un veleno, l'ittiotossina, che agisce sul sistema nervoso.

Le diverse abitudini alimentari e le condizioni termiche delle acque determinano una notevole variabilità nei tassi di crescita dell'anguilla. Infatti a parità di età, le anguille a testa larga, che in virtù di mandibole più larghe e robuste predano animali di maggiore taglia, hanno una lunghezza media maggiore rispetto alle anguille a testa stretta. Le anguille di popolazioni dell'area mediterranea hanno crescita più veloce di quelle dell'area atlantica.

1.1.5 La pesca dell'anguilla nelle Valli di Comacchio

In Italia la specie è autoctona ed è comunemente presente nelle acque interne di tutte le regioni (Tortonese, 1975), con una frequenza crescente in relazione alla diminuzione dalla distanza dal mare.

Le Valli di Comacchio sono il luogo in cui l'anguilla è da sempre stata la specie più importante della fauna ittica. All'interno del Parco Regionale del Delta del Po, tra il fiume Po di Volano ed il fiume Reno, si estende il complesso delle aree umide delle Valli di Comacchio. Queste rappresentano la laguna costiera salmastra più vasta d'Italia, la cui superficie si aggira intorno ai 110 Km quadrati. Il complesso lagunare (Fig.6) è caratterizzato da 4 bacini di acqua salmastra (Valle Lido di Magnavacca, Valle Fossa di Porto, Valle Campo e Valle Fattibello) collegati al Mar Adriatico.



Fig.6 Veduta aerea delle Valli di Comacchio (L.Bottaro)

La profondità media è di 1 metro con la temperatura dell'acqua che può variare tra i 0 e i 30°C nel corso dell'anno. La salinità può raggiungere il 45% nei mesi più caldi e diminuire fino al 20% durante l'inverno, a seconda della piovosità e della regolazione del ricambio idrico con il mare (Carrieri *et al.*, 1992).

Le Valli costituiscono un importante ecotono di zona umida ad acqua salmastra, caratterizzato da una varietà di habitat presenti e dalla ricchezza di specie florofaunistiche rilevanti da un punto di vista della conservazione.

Ancora oggi si pratica la pesca dell'anguilla tramite i lavorieri, strutture di legno con griglie in metallo costituite da una serie di bacini comunicanti, che permettono di catturare i pesci nel momento in cui si spostano dalle Valli verso il mare per iniziare la migrazione riproduttiva. Le Valli sono quindi il luogo ideale per svolgere la vallicoltura delle specie migratorie durante il loro passaggio dal mare all'entroterra.

1.1.6 Sfruttamento e stato della risorsa delle anguille

L'anguilla è una specie di particolare interesse commerciale, soprattutto in Italia. 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).

Considerando la peculiarità del ciclo biologico di questa specie, è facile pensare come la sua resilienza sia molto bassa e che i tempi di raddoppio della popolazione siano alquanto lunghi. Tra gli anni '70 e '80 le dimensioni della specie hanno avuto un declino pari al 90% delle sue dimensioni (Dekker, 2003).

Secondo l'International Council for the Exploration of the Sea del 2006 (ICES), il declino nella quantità di sub-adulti potrà portare a un crollo nello stock degli stessi in futuro.

Nella quasi totalità dell'areale di distribuzione, tutti gli stadi del ciclo vitale sono stati soggetti a declino e le dimensioni degli stock sono inferiori ai limiti biologici per la sopravvivenza della popolazione (ICES, 2002).

Il minore reclutamento dei giovanili potrebbe comportare un collasso di tutta la popolazione, così da perdere una componente fondamentale di biodiversità (Beaulaton *et al.*, 2007). Per questo motivo l'Unione Europea ha fornito a ciascun Paese membro le basi per istituire un piano di gestione dell'anguilla per ogni bacino idrico che costituisca un habitat naturale per questa specie (Regolamento 1100/2007, Council of the European Union).

Idonei regimi di gestione permetterebbero una ripresa dello stock nel prossimo decennio, ma potrebbero non essere sostenibili nel lungo periodo (Astrom *et al.*, 2007). L'estinzione della specie rappresenterebbe un danno non solo di tipo ecologico, ma anche economico. Infatti l'anguilla è una delle specie principali per la pesca e l'acquacoltura, sia in Italia (Ciccotti *et al.*, 2000), che nel resto dell'Europa.

Il declino nella popolazione di *Anguilla anguilla* è imputabile a diversi fattori concomitanti. L'eccessivo sforzo di pesca è la causa principale vista la sempre crescente domanda da parte della comunità europea (Aarestrup *et al.*, 2010) ed asiatica.

Altro fattore è l'introduzione dal Giappone del parassita *Anguillicola crassus* (Koops *et al.*, 1989) che porta vari problemi di salute all'animale e riduce il successo della migrazione transoceanica dei riproduttori (Feunteun, 2002). Infatti le anguille infette hanno una minor velocità di crociera (Barni *et al.*, 1985) arrecando gravi conseguenze

per le anguille argentine quando migrano verso il sito di riproduzione. Inoltre può causare la morte sia in anguille selvatiche che in cattività, in associazione con altri fattori di stress (Kirk, 2003). Questo nematode, presente nella vescica natatoria (Fig.7), riduce la disponibilità di ossigeno (Haenen *et al.*, 2010) e diminuisce l'efficienza natatoria, compromettendo la capacità migratoria e riproduttiva delle anguille argentine (Szekely *et al.*, 2003).

Al declino della specie hanno contribuito anche fattori quali l'alterazione e la conseguente perdita di habitat necessari per lo sviluppo della specie, la presenza di barriere artificiali che ne impediscono la diffusione e la migrazione. L'accumulo di contaminanti, in particolare di PCB, interferisce con la regolazione ormonale, con lo sviluppo delle gonadi e sulla fertilità (Spies *et al.*, 1988). Inoltre ha conseguenze sulla qualità dei gameti e sulle uova (Palstra *et al.*, 2005).



Fig.7 Infestazione di *Anguillicola crassus* nella vescica natatoria di un'anguilla argentina (J.Simon)

1.1.7 Riproduzione

I giovani di anguilla presentano le gonadi indifferenziate fino a 12-15 cm di lunghezza. Tra i 14 e i 18 cm avviene la differenziazione del sesso. Nel periodo iniziale di questa fase si hanno oogoni ed ovociti, ma successivamente si formano anche spermatogoni e spermatociti. A questo punto hanno un'età compresa fra i 5 e gli 8 anni e una lunghezza che varia tra i 18 e i 30 cm.

Si trovano in una condizione d'intersessualità, poichè nella stessa gonade coesistono elementi germinali maschili e femminili, anche se ancora immaturi. Solo in seguito uno dei due sessi prende il sopravvento con una mascolinizzazione o una femminilizzazione definitiva (Davey, 2005).

L'anguilla è una specie migratoria e catadroma, per cui fra l'autunno e l'inizio dell'inverno, gli esemplari sessualmente maturi (cioè le anguille argentine) percorrono 43 km al giorno per un totale di 5.500 km in 139 giorni (Van Ginneken *et al.*, 2000) migrando fino al Mar dei Sargassi, zona della loro riproduzione.

Si pensa che ciascuna femmina possa emettere da 1 a 6 milioni di uova del diametro di 3 mm, che schiudono solo se la temperatura è superiore ai 20°C.

Dopo la fregola, gli adulti muoiono e le larve cominciano a spostarsi verso oriente, grazie all'aiuto della Corrente del Golfo e di quella Nord-Atlantica, fino a raggiungere le coste africane ed europee.

Questo ciclo biologico implica che si tratta di uno stock unico che dipende dall'emigrazione dei riproduttori dei diversi bacini idrografici dell'areale di distribuzione, il quale comprende l'Europa e il bacino del Mediterraneo, estendendosi dalla Scandinavia fino al Nord Africa. L'uniformità genetica di questa specie conferma la panmissia.

Alcuni studiosi canadesi scoprirono, alla fine degli anni '90, alcune differenze (Wirth *et al.*, 2001) tra anguille provenienti da diverse zone geografiche.

In realtà esistono differenze limitate, legate più a una scala temporale che non spaziale (Dannewitz *et al.*, 2005). L'ipotesi di una sola area di riproduzione sembrerebbe quindi accettata con studi più recenti che supportano l'ipotesi della panmissia. A tal proposito un gruppo di ricercatori ha paragonato anguille argentine di età nota dal Sud al Nord

dell'Europa (Italia e Mar Baltico), e nonostante la notevole dimensione del campione (1200 anguille), non hanno osservato segni di differenziazione genetica (Palm *et al.*, 2009).

Un secondo lavoro, condotto anch'esso su base comparativa sull'intero range di distribuzione dell'anguilla (Pujolar *et al.*, 2009), ha evidenziato che le differenze tra campioni di ceche di diverse regioni (Mediterraneo vs. Atlantico) non sono significative e l'omogeneità nella composizione genetica che si riscontra tra regioni diverse è secondo gli autori da attribuirsi all'opportunità di rimescolamento degli individui in un unico sito riproduttivo.

Ambedue gli studi hanno reiterato la conclusione che la differenziazione genetica a livello continentale riscontrata nei lavori precedenti può essere spiegata da variazione su base temporale dei lotti di giovanili presi in esame, e ciò ha dato ulteriore credito all'ipotesi della panmissia.

1.1.8 Il processo di argentinizzazione

Le anguille hanno un complesso ciclo biologico caratterizzato da due metamorfosi (Sinha *et al.*, 1975): la prima, tipicamente larvale permette al leptocefalo di trasformarsi in cieca; la seconda, invece, trasforma l'anguilla gialla in argentina attraverso una fase detta di "argentinizzazione" nella quale si assistono a preadattamenti alla maturazione sessuale che sarà completa durante la migrazione oceanica verso il Mar dei Sargassi. Allo stadio di argentina, l'anguilla si trova in una fase prepuberale nella quale la mancanza della maturazione sessuale è dovuta ad una produzione carente di gonadotropine ipofisarie (GtHs).

La metamorfosi e la pubertà sono i due principali eventi dello sviluppo postembrionale nei vertebrati. Essi presentano caratteristiche comuni che riguardano modifiche morfologiche e comportamentali, e sono controllati da diversi assi neuroendocrini.

La metamorfosi permette il passaggio da uno stadio di sviluppo in un specifico ambiente ad un altro stadio in un diverso ambiente e include una migrazione tra i due habitat. La metamorfosi corrisponde a cambiamenti drastici nella forma del corpo, nella fisiologia e nel comportamento.

Sono stati proposti tre percorsi di ontogenesi tra l'embrione e l'adulto (Youson, 1988): lo sviluppo diretto dallo stadio embrionale che porta a quello giovanile e degli adulti; il tipico sviluppo indiretto che coinvolge una metamorfosi larvale che porta allo stadio giovanile (come nel caso dell'anguilla); e infine una metamorfosi non classica che si verifica durante lo stadio giovanile.

Nei pesci, sono stati svolti alcuni studi (Murr *et al.*, 1928) circa il coinvolgimento dell'asse tiroideo nella metamorfosi larvale (metamorfosi primaria) che hanno mostrato un aumento nello sviluppo della ghiandola tiroidea di larve di leptocefalo di anguilla europea. Questa osservazione è stata confermata in un'altra specie anguilliforme, *Conger myriaster* (Yamano *et al.*, 1991). L'attivazione della ghiandola tiroidea è stata osservata anche durante la metamorfosi larvale della passera di mare, *Paralichthys olivaceus* (Miwa *et al.*, 1987). Inoltre, le misurazioni del contenuto plasmatico dell'ormone tiroideo indicano un significativo aumento di T3 e T4 nella fase iniziale della metamorfosi larvale in passere (Tagawa *et al.*, 1990) nonché nei conghi. Il trattamento con TSH induce nella passera metamorfosi sia a livello di tutto il corpo, sia a livello dei tessuti: eritrociti, muscolo scheletrico, ghiandole gastriche (Soffientino *et al.*, 2001), cellule del cloro nelle branchie e rimodellamento osseo per la

delocalizzazione degli occhi (Solbakken *et al.*, 1999). Esperimenti con deficit di TSH hanno portato all'inibizione della pigmentazione sul lato sinistro del corpo e del rimodellamento osseo con trasferimento dell'occhio destro (Okada *et al.*, 2003). La carenza di TH inibisce anche lo sviluppo della pinna anale, la riduzione dell'altezza del corpo e l'adsorbimento dei raggi della pinna dorsale (Inui *et al.*, 1985). In contrasto, sia l'estradiolo che il testosterone attenuano la risposta dei raggi della pinna col T3 *in vitro* (De Jesus *et al.*, 1992). Analogamente, quando le larve di passere sono immerse in soluzioni contenenti steroidi, l'accorciamento della pinna è ritardata così come la migrazione dell'occhio. La prolattina antagonizza l'azione del TSH sia *in vitro* che *in vivo*. L'ormone tiroideo stimola la metamorfosi nei leptocefali di *Conger myriaster* e di *Anguilla anguilla* (Vilter, 1946), a conferma del ruolo di primo piano del TSH nell'induzione della metamorfosi larvale. Il ruolo del TSH sarebbe fondamentale fino alle fasi finali della metamorfosi nelle anguille ceche. Un ruolo centrale del TSH nella regolazione dei meccanismi che portano alla colonizzazione degli habitat continentali da parte dell'anguilla ceca è stato ipotizzato e dimostrato da alcuni studiosi (Edeline *et al.*, 2004). In effetti, nelle anguille cieche europee, si riscontra uno sviluppo maggiore della tiroide rispetto agli individui che migrano in estuario, e l'attività locomotoria delle ceche è aumentata in modo significativo mediante trattamento con T4 mentre era diminuita la tiourea. Una correlazione tra i livelli diminuiti di T4 e il passaggio da una vita pelagica a comportamenti bentonici è stato documentato in anguille ceche tenute in acquario (Jegstrup *et al.*, 2003). Questi dati dimostrano il coinvolgimento degli ormoni tiroidei come fattore determinante nell'induzione della metamorfosi nelle anguille, così come nei pesci piatti.

Ulteriori studi sono chiaramente necessari per studiare il ruolo sinergico o antagonista degli altri ormoni, nonché per determinare il controllo ipofisario della funzione tiroidea nei teleostei.

La pubertà avviene una sola volta nel ciclo vitale di una specie. In tutti i vertebrati è attivata dall'asse gonadotropico, costituito da un neuropeptide (ormone rilasciante gonadotropina, GnRH), ormoni glicoproteici ipofisari (gonadotropine: ormone luteinizzante, LH e ormone follicolo stimolante, FSH) e steroidi gonadici. Gli steroidi sessuali inducono trasformazioni morfo-fisiologiche e comportamentali caratteristici della pubertà.

Lo schema (GnRH/LH-FSH/steroidi sessuali) è largamente conservata tra i vertebrati (Okuzawa, 2002). Per quanto riguarda le prime fasi della gametogenesi e il controllo della pubertà, è stato studiato il possibile coinvolgimento della dopamina (DA) solo nell'anguilla, nell'orata e nella triglia. Nell'anguilla europea solo un trattamento triplo con testosterone, antagonista del GnRH e pimozide (DA tipo D2 antagonista del recettore) potrebbe indurre un aumento della sintesi e rilascio di LH, il che indica che la rimozione dell'inibizione dal DA è richiesta nell'anguilla in fase prepuberale per innescare la stimolazione del GnRH e la sintesi e il rilascio di LH.

Durante la fase di crescita sedentaria, il dorso dell'anguilla è verdastro-marrone con il ventre giallo, mentre con l'inizio della migrazione oceanica necessaria per la riproduzione, sono rispettivamente nerastro-marrone e argenteo-bianco.

L'argininizzazione della pelle, la quale diventa più spessa, è il risultato di un aumento di melanina e purine (Bertin, 1951).

L'occhio è probabilmente uno degli organi di senso più modificati durante il processo di argentinizzazione (Lythgoe, 1979).

Avvengono una serie di modifiche strutturali della retina con un aumento del numero dei bastoncelli e una conseguente diminuzione dei coni (Braekevelt, 1985). Si assiste ad un cambiamento nel pigmento visivo a livello cromoforo con una predominanza della rodopsina in anguille argentine rispetto a quelle gialle (Carlisle *et al.*, 1959). Queste modifiche del sistema visivo sembrano coinvolte in una migliore visione delle profondità oceaniche.

Per ampliare le conoscenze sulla riproduzione delle anguille è necessario applicare un indice sintetico descrittivo dello stato di sviluppo delle gonadi. Tale indice, definito Indice gonadosomatico (GSI), fornisce un'espressione quantitativa dello stato di maturità sessuale (Gelli *et al.*, 2011). Il GSI aumenta da 0.3 nelle femmine di anguilla gialla fino a 1.5 in quelle argentine con un aumento del diametro follicolare, ispessimento della parete follicolare e la comparsa di molte vescicole lipidiche nell'ooplasma (Lopez *et al.*, 1990). Tramite l'utilizzo di questo indice si è in grado di classificare lo stadio di maturazione delle anguille che precede e innesca l'istinto alla migrazione per fini riproduttivi con il ritorno in mare.

Il processo di maturazione delle anguille, definito anche argentinizzazione, è una metamorfosi che avvia la pubertà e innesca modificazioni fisiologiche, morfologiche e comportamentali necessarie per eseguire la migrazione riproduttiva in mare. Se si considera l'enorme variabilità degli ecosistemi nei quali vive l'anguilla, si comprende quanto sia complicato capire quali fattori possano influire sul processo di maturazione gonadica.

Per le anguille delle Valli, integrando parametri come l'età delle anguille con quella del relativo indice gonadosomatico, si è potuto comprendere come l'ambiente incida sullo

sviluppo e la crescita, determinando il momento in cui un'anguilla è pronta per migrare e quindi riprodursi.

Durante il processo di argentinizzazione, le anguille smettono di nutrirsi e ciò comporta una regressione del tratto digestivo (Han *et al.*, 2003). Le anguille hanno bisogno di cambiamenti metabolici per essere poi in grado di compiere la loro lunga migrazione, che è stimata essere di 4.000 km per l'anguilla giapponese (*A.japonica*) e quella americana (*A.rostrata*) e di 6.000 km per quella europea (*A.anguilla*). Per riuscire nella migrazione, questi animali devono accumulare grandi riserve energetiche allo stadio di anguille gialle sia per nuotare sia per la maturazione sessuale. Il 60% delle loro riserve energetiche viene usato per lo sviluppo delle gonadi. Vi è un grande quantitativo di acidi grassi insaturi nei muscoli (Eggington, 1986) e una redistribuzione del colesterolo dai tessuti alle gonadi nelle anguille argentine (Lewander *et al.*, 1974). Questi cambiamenti metabolici possono essere amplificati dalle condizioni ambientali riscontrate durante la migrazione, come la profondità e la temperatura dell'acqua (Theron *et al.*, 2000).

Uno dei fenomeni noti dell'argentinizzazione è la regressione del tratto digestivo che spiega un basso DTSI (indice somatico del tratto digestivo) con fase crescente durante la migrazione che impedirà alle anguille da alimentarsi. Anche l'abbassamento dell'HSI (indice epatosomatico) come indicatore delle attività del fegato può essere correlato ad una cessazione dell'alimentazione e non con la produzione epatica di vitellogenina.

Il fegato gioca un ruolo cruciale nella disponibilità dei lipidi circolanti e nella sintesi della vitellogenina. Il metabolismo dei lipidi nel fegato è principalmente legato al metabolismo energetico, tra cui la lipolisi, la trasformazione dei lipidi e la produzione di proteine di trasporto.

La sintesi epatica di vitellogenina è generalmente indotta da estrogeni ovarici rilasciati dalle cellule della granulosa. Le azioni degli estrogeni sul fegato sono mediate dai recettori nucleari di cui il genoma contiene due tipi: il recettore estrogeno 1 (Esr1) e 2 (Esr2). Nell'anguilla europea Esr1 svolge un ruolo importante nell'insorgenza della vitellogenesi epatica, mentre il ruolo di Esr2 in questa fase non è chiaro. L'assenza di vitellogenesi nelle anguille europee in acqua dolce è in contrasto con le specie di Anguilla che devono migrare per una minore distanza fino alla zona di riproduzione, come accade per *Anguilla dieffenbachii* e *A. australis*.

Mentre la metamorfosi è per lo più scatenata nei vertebrati dall'attivazione dell'asse tireotropo, la pubertà è indotta dall'attivazione dell'asse gonadotropico. Per valutare quale asse neuroendocrino possa essere coinvolto nell'induzione del processo di argentinizzazione, è necessario analizzare i profili di ormoni ipofisari e periferici durante la transizione da anguille gialle ad argentine.

Per quanto riguarda l'anguilla argentina, si assiste ad una iperattività della tiroide sia prima che durante la migrazione a valle (Callamand *et al.*, 1942).

L'attivazione della tiroide è responsabile di importanti modifiche morfologiche nel corso dell'argentinizzazione. In esemplari subadulti di anguille americane, elevati livelli di T4 sono correlati con un aumento dell'attività locomotoria (Castonguay *et al.*, 1990).

Lo studio dei profili di espressione del TSH mostrano un non significativo o un debole aumento tra anguille gialle ed argentine. Stime dei livelli di plasma di ormoni tiroidei in gialle ed argentine indicano un moderato aumento in tiroxina (T4) e senza variazioni significative in triiodotironina (T3) durante il processo di argentinizzazione (Marchelidon *et al.*, 1999).

Questi risultati suggeriscono che l'asse tireotropo è scarsamente implicato nel controllo endocrino del processo di argentinizzazione dell'anguilla. Le deboli variazioni osservate nei livelli plasmatici di TSH e T4 potrebbero essere coinvolte nella maggior attività delle anguille relative al loro comportamento migratorio.

In anguille argentine il ruolo del GH è meno critico, probabilmente a causa del fatto che anche le anguille gialle sono in grado di passare in acqua di mare. Studi focalizzati sulla regolazione cellulare del GH hanno dimostrato che il rilascio basale e la sintesi dello stesso GH persistono *in vitro*, in assenza di siero, utilizzando l'ipofisi (Baker *et al.*, 1975) o colture di cellule primarie. Tutte queste osservazioni portano a pensare che il principale controllo di queste cellule *in vivo* sia inibitorio. Studi sull'anguilla europea condotti *in vitro* dimostrano che il controllo inibitorio del GH è esercitato dalla somatostatina (SRIH) e che l'insulina come fattore di crescita (IGF) esercita un feedback negativo sul GH. Nel corso dell'argentinizzazione, la regolazione principale delle cellule somatotropi, che sono responsabili della sintesi del GH, sarebbe un aumento del loro controllo inibitorio.

Importante è sottolineare che un picco del GH e quindi della crescita corporea può verificarsi in estate. Questo suggerisce che mentre il GH non può essere coinvolto nel controllo del processo di argentinizzazione, l'asse somatotropo può partecipare nell'avvio del processo dell'argentinizzazione.

Studi recenti hanno dimostrato elevati livelli di cortisolo in anguille argentine precedente alla loro migrazione. Ciò è in accordo col fatto che durante la migrazione a valle, le anguille sono a digiuno ed è ben noto che la produzione del cortisolo è indotta in risposta alla fame. Il ruolo del cortisolo potrebbe essere quello di consentire la mobilitazione di riserve energetiche necessarie per il pesce in questo periodo critico.

In aggiunta all'effetto del cortisolo sulla mobilitazione dell'energia e sull'adattamento all'acqua di mare, nell'anguilla europea lo stesso cortisolo ha anche un effetto positivo nella produzione dell'LH sia *in vivo* che *in vitro*. Interessante è notare la sinergia tra il cortisolo e gli steroidi sessuali nel controllo dell'argininizzazione.

I vari effetti del cortisolo indicano che l'asse corticotropo può svolgere un ruolo importante nel corso dell'argininizzazione permettendo la mobilitazione di energia e agendo nel momento della comparsa della pubertà.

La fase di argininizzazione è caratterizzato da modifiche delle gonadi. Si assiste ad un aumento del peso delle gonadi e modifiche della struttura ovocita durante tutto il processo di argininizzazione. In aggiunta, misurazioni degli steroidi sessuali, estrogeni (E2) e androgeni (T e 11-KT) nel plasma mostrano un aumento tra la fase gialla ed arginina (Cottrill *et al.*, 2001). Tutti questi risultati suggeriscono che l'asse gonadotropo occupa una posizione importante durante il processo di argininizzazione. Due ormoni pituitari sono coinvolti nel controllo della riproduzione, le gonadotropine (ormone luteinizzante, LH e ormone follicolo stimolante, FSH). In *A.anguilla*, LH e FSH sono espressi diversamente durante il processo di argininizzazione, con un aumento precoce nell'espressione di FSH e un aumento tardivo dell'LH. Ciò suggerisce che FSH potrebbe svolgere un ruolo nelle prime fasi dell'attivazione delle gonadi, mentre LH potrebbe avere un ruolo importante in seguito nel processo di argininizzazione. Infatti esiste una concomitanza tra l'aumento dell'espressione di FSH e l'inizio dell'incorporazione lipidica in oociti (chiamata anche "vitellogenesi endogena"), il che suggerisce che FSH potrebbe essere responsabile dell'avvio della vitellogenesi lipidica. L'aumento precoce in FSH può anche essere responsabile per il primo aumento della produzione di steroidi (E2), osservato nelle anguille nella fase

intermedia. Al contrario, l'aumento ritardato dei livelli plasmatici della vitellogenina (Vg), in concomitanza con l'aumento nell'espressione tardiva dell'LH, e la leggera diminuzione di FSH, suggerisce che l'LH può partecipare nell'induzione della produzione di vitellogenina e all'iniziazione della "vitellogenesi endogena". Le gonadotropine, LH e FSH, hanno mostrato le maggiori variazioni nel corso dell'argentinizzazione.

L'asse gonadotropo è attivato durante l'argentinizzazione. Precedenti studi sull'induzione della maturazione sessuale dell'anguilla hanno mostrato un'amplificazione dei cambiamenti anatomici durante l'argentinizzazione. Cambiamenti morfologici come l'aumento del diametro dell'occhio (Boetius *et al.*, 1999), la valorizzazione del corpo color argenteo e la riduzione dell'intestino potrebbero essere ulteriormente indotti da trattamenti gonadotropici. Dati sperimentali che utilizzano steroidi sessuali esogeni confermano questo coinvolgimento dell'asse gonadotropo nell'induzione dell'argentinizzazione.

Iniezioni con metiltestosterone in esemplari maschi di anguille europee hanno determinato un maggior diametro dell'occhio, un aumento dello spessore della pelle e un color più scuro della testa. Trattamenti con testosterone inducono una diminuzione del tratto digestivo e un aumento dell'indice oculare, mentre E2 non ha effetto.

Tutti questi dati suggeriscono che i cambiamenti correlati all'argentinizzazione osservati sono androgeno dipendenti. Al contrario, trattamenti con l'ormone tiroideo (T3) in anguille gialle non hanno indotto alcuna alterazione dell'indice oculare.

Tuttavia, il cortisolo potrebbe avere un'azione sinergica con gli steroidi in questo complesso processo di argentinizzazione dell'anguilla, poiché la somministrazione

contemporanea di E2, T e cortisolo risulta più efficace nell'indurre il colore argenteo della pelle nelle anguille.

1.1.9 Migrazione e comportamento dell'anguilla argentina

Una volta che l'anguilla ha subito la sua metamorfosi "pre-puberale" (argentinizzazione) è pronta per intraprendere il ritorno verso il Mar dei Sargassi, un'ampia area dell'Atlantico occidentale, a est dell'arcipelago delle Grandi Antille, dove l'anguilla depone una sola volta, prima di morire per la fatica e il digiuno (Fricke *et al.*, 1995). I movimenti migratori sono stati correlati con diversi fattori ambientali: piovosità, eventi alluvionali, vento, torbidità dell'acqua e fasi lunari (Okamura, 2002).

La migrazione delle anguille argentine europee, che coincide con una diminuzione della temperatura, di solito inizia in autunno e può durare fino all'inizio della primavera.

La temperatura agisce maggiormente sull'argentinizzazione che sui movimenti migratori. Ciò che percepiscono è probabilmente più una differenza di temperatura piuttosto che un valore definito della stessa.

Le anguille sono fotofobiche e la luna piena potrebbe inibire la loro migrazione. Sembra che ci sia davvero un ritmo interno, che può essere oscurato da fattori idrologici e meteorologici (Cullen *et al.*, 2003). Il fotoperiodo influisce sulla migrazione delle anguille che nuotano più velocemente con una diminuzione della luce del giorno (Vollestad *et al.*, 1994). Inoltre, il fotoperiodo ha un effetto sul processo di argentinizzazione attivando l'ultima fase. L'inibizione causata dalla luce supera l'effetto stimolante del flusso.

Molti autori indicano l'effetto positivo del vento che aumenta la torbidità. Le diverse condizioni ambientali come la profondità, le correnti e i predatori riscontrate durante la migrazione possono influire sulla velocità di nuoto delle anguille.

La loro invidiabile capacità di navigazione potrebbe basarsi sul rilevamento magnetico dell'inclinazione o della forza del campo magnetico.

Una migrazione verticale all'interno della colonna d'acqua è stata dimostrata nel corso di studi di monitoraggio basati su segnalatori satellitari (Tsukamoto, 2009). Le anguille risalivano durante il crepuscolo e si immergevano all'alba in modo da sfuggire ai predatori. Migravano a profondità comprese tra i 200 e i 700 m, anche se sostavano maggiormente a 300 m, che è in accordo con l'intervallo di profondità mantenuto dai leptocefali dopo la loro schiusa dalle uova. Questi segnalatori sono relativamente grandi per le anguille poiché hanno quasi la stessa sezione di un'anguilla di 1 kg che quindi raddoppia la propria resistenza idrodinamica. Infatti questi PSATs possono aumentare la resistenza, diminuire la velocità di nuoto e l'efficienza, e influire sulla scelta della rotta.

La migrazione verticale, in un range tra i 200 e i 700 m, può provocare una più alta efficienza ad una maggiore profondità durante il giorno. Del resto le temperature a 700 m in mare aperto sono intorno a 6°C. In conclusione, i risultati mostrano un effetto drammatico sull'efficienza del nuoto delle anguille con un consumo di ossigeno due volte superiore e con una performance del nuoto gravemente ridotta. Ciononostante PSATs con dimensioni ridotte per minimizzare le prestazioni sono da tenere in grande considerazione per svelare il mistero sulla zona di riproduzione della anguille europee.

La migrazione delle anguille argentine avviene principalmente durante il periodo successivo alla luna piena e all'aumento del flusso dei fiumi, spesso a causa di pioggia in autunno.

I principali eventi di migrazione a valle si verificano dopo il tramonto e prima di mezzanotte. I parametri più importanti che inducono questo lungo viaggio sembrano essere la torbidità e la portata dei fiumi. Le anguille, infatti, sono fortemente attratte dalle correnti d'acqua e questa preferenza potrebbe essere spiegata con il risparmio energetico, evitando così un nuoto attivo (Hansen *et al.*, 1985).

Recenti studi hanno dimostrato che è importante differenziare le modificazioni fisiologiche che portano alla fase argentina dalla migrazione. Le anguille sono fisiologicamente pronte per migrare a fine estate e questo probabilmente determina in gran parte l'insorgere della migrazione. Le variazioni di temperatura e del fotoperiodo sembrano innescare l'argentinizzazione nei pesci che sono fisiologicamente pronti (lunghezza, età, contenuto di grassi).

1.1.10 Fisiologia del nuoto dell'anguilla argentina

Gli individui di sesso maschile, che sono anche i più piccoli (in media 40 cm), migrano verso il mar dei Sargassi nel mese di agosto (Usui, 1991). Le femmine, invece, molto più grandi (in media 80 cm), compiono il loro viaggio di ritorno tra ottobre e dicembre per arrivare circa 3,5 mesi più tardi nella zona di riproduzione. Quando sono completamente maturi, in primavera, i maschi raggiungono una massa della gonade massima del 10% rispetto alla loro massa corporea; mentre le femmine arrivano, addirittura, fino al 60%.

Ovviamente il nuoto è un requisito fondamentale per il successo riproduttivo. Le anguille, durante la migrazione, non si alimentano affidandosi per la loro energia per lo più a depositi di grasso (Tesch, 2003), che possono essere pari al 30% del loro peso corporeo.

La fase continentale può essere considerata come una fase di alimentazione col fine di raggiungere le riserve lipidiche necessarie per la migrazione, ma anche per la riproduzione. Le gonadotropine FSH e LH controllano lo sviluppo della gonade direttamente o indirettamente agendo sul metabolismo degli steroidi nella produzione di estrogeni e androgeni nelle anguille di sesso maschile e femminile.

Le anguille europee lasciano il continente in una condizione di età prepuberale, nuotano per mesi e solo allora sono pienamente mature e in grado di riprodursi. La lipolisi diventa attiva durante e grazie al nuoto sostenuto. Il nuoto, infatti, stimola il processo di argentinizzazione e l'inizio della maturazione, ma il rallentamento di questo progresso che avviene nelle fasi più avanzate nelle femmine, compresa la vitellogenesi, è probabilmente necessario per consentire la migrazione fino al luogo della riproduzione.

Quando la velocità di nuoto arriva sopra all'80% della velocità massima, il metabolismo anaerobico viene attivato. Non c'è un interruttore metabolico vero e proprio, ma i processi anaerobici sono innescati per fornire quell'energia in più, necessaria per la contrazione muscolare. Sia la glicolisi anaerobica che l'attività creatina chinasi sono attivate da un basso rapporto ATP/ADP (in realtà dal ridotto potenziale di fosforilazione). Inizialmente, l'acido lattico viene tamponato dalla reazione alcalina di fosfo-creatina (PCr) idrolisi. L'acidosi metabolica si sviluppa quando la maggior parte della PCr è esaurita, il pH basso insieme con l'elevato fosfato inorganico provoca un affaticamento muscolare, che si traduce in ultima analisi in un collasso. Probabilmente il massimo tasso di consumo di ossigeno determina la velocità massima di nuoto sostenuta, che è la velocità in cui l'animale non fatica quando nuota per qualche ora.

Tra il massimo consumo di ossigeno e quello a riposo, si trova la velocità di nuoto ottimale (U_{opt}).

Questa è, per definizione, la velocità in cui il costo del trasporto è il più basso. Il costo del trasporto (COT O₂ in mg kg⁻¹ km⁻¹) è il rapporto del tasso di consumo di ossigeno sulla velocità nuoto, che è elevato a bassa velocità e ad alta velocità. A bassa velocità perché il tasso metabolico standard rappresenta una grande parte del consumo di energia, che non viene utilizzata per il nuoto. La minima COT si trova ad una velocità intermedia, che è la velocità di nuoto ottimale. In particolare per la migrazione degli animali il costo del trasporto è cruciale perché determina la distanza massima che può essere coperta per l'energia disponibile, per nuotare alla velocità ottimale. Un basso costo di trasporto è certamente un prerequisito per un'elevata resistenza. Pertanto, la resistenza massima dovrebbe essere prevista alla velocità di nuoto ottimale. Secondo criteri biochimici, la migliore resistenza è la velocità massima in cui il tasso di consumo di ossigeno rimane stabile e la modalità di nuoto non cambia (Videler, 1993).

Durante la lunga migrazione, le anguille cercano di migrare al minor costo del trasporto. L'efficienza biochimica di propulsione è diversa da quella complessiva del nuoto. Il primo riguarda il trasferimento di energia cinetica dal muscolo all'ambiente e il conseguente spostamento del corpo. L'efficienza complessiva del nuoto, invece, è l'energia totale necessaria per l'animale per trasportare se stesso ad una certa distanza. Durante il lungo periodo di nuoto le anguille perdono peso, a causa delle minori riserve di energia, ma anche per la perdita di acqua. Le analisi effettuate sul corpo delle anguille hanno rivelato che il rapporto dei tre substrati (lipidi, carboidrati e proteine) è rimasto costante nonostante una significativa perdita di massa.

Questo significa che la composizione corporea non è cambiata durante i sei mesi di nuoto e che il grasso, le proteine e i carboidrati sono stati metabolizzati nella stessa proporzione.

Esemplari adulti di anguille hanno mostrato una maggiore capacità di integrare un aumento dei lipidi dal muscolo negli ovociti ed erano più sensibili alla stimolazione ormonale.

Le ovaie di anguille europee mostrano ovociti dopo la trasformazione dell'oogonio nei primi stadi di sviluppo (I-II; Adachi *et al.*, 2003). Viene richiesta anche l'incorporazione di lipidi (III) e vitellogenina (IV). Il GSI aumenta e gli ovociti si ingrandiscono con un gran numero di gocce lipidiche. Un elevato livello di mobilizzazione dei lipidi indotto dal nuoto è necessario non solo a scopo energetico, ma anche per una naturale incorporazione di goccioline lipidiche negli oociti. Gli oociti più sviluppati presentavano goccioline lipidiche che coprivano più del 50% del citoplasma e formavano un anello completo attorno alla circonferenza dell'ovocita (Couillard *et al.*, 1997). Il nuoto attiva il metabolismo dei lipidi. Questo può rappresentare un passo decisivo nella maturazione degli oociti, poiché la quantità di gocce lipidiche influenza gli eventi successivi di sviluppo prima e dopo la fecondazione, e fornisce le riserve necessarie per la riproduzione.

Dopo un nuoto in acqua dolce di 5.500 km, che simula la migrazione, le giovani anguille di allevamento hanno presentato un aumento dei livelli di LH nella ghiandola pituitaria. Il nuoto stimola la produzione di gonadotropine da parte dell'ipofisi, ma non è ancora chiaro se la secrezione è stimolata. Le anguille hanno anche mostrato un aumento dei livelli plasmatici di 17beta-estradiolo (E2) e 11-ketotestosterone (11-KT), mentre l'ACTH e l'MSH non sono stati influenzati.

L'11-KT è considerato come il principale mediatore ormonale del processo di argentinizzazione in anguille femmine (Lokman *et al.*, 2003), come testimoniano i numerosi effetti, ad esempio l'allargamento degli occhi.

L'11-KT ha un ruolo importante nella crescita degli oociti previtellogenicici e nel trasferimento e deposizione dei lipidi (Endo *et al.*, 2008). E2 non ha mostrato questi effetti nè *in vitro* nè *in vivo*.

Le anguille argentine selvatiche, dopo una migrazione di 1.000 km nelle acque dolci, hanno mostrato bassi livelli plasmatici; mentre il testosterone (T) e l'estradiolo (E2) non sono stati influenzati. I livelli di catecolamine sono risultati essere più bassi durante il nuoto che non a riposo. La vitellogenesi epatica è ridotta nelle anguille argentine che nuotano in acqua salata. Il nuoto inibisce l'intero processo della vitellogenesi.

Le anguille di sesso femminile soggiornano 7-30 anni in acqua dolce prima della migrazione, a differenza dei soli 4-9 anni per i maschi. Di conseguenza, le femmine raggiungono dimensioni dieci volte più grandi dei maschi. Poiché i requisiti energetici per i maschi sono molto inferiori a quelli per le femmine, è possibile che l'inibizione dopaminergica sia sesso-specifico. Alcuni studiosi hanno testato questa ipotesi iniettando sia nei maschi che nelle femmine di anguille un antagonista del GnRH (GnRH_a). I maschi che nuotavano per 3 mesi mostravano un maggiore livello di espressione della catena beta dell'LH rispetto agli esemplari a riposo.

I trattamenti hanno anche causato un aumento da tre a cinque volte maggiori del GSI e una indotta spermatogenesi. Al contrario, le femmine non sono state stimolate dal GnRH_a e hanno mostrato una regressione di maturazione nel corso del tempo, come dimostrato da una minore espressione di LH, GSI e diametro degli oociti. Si è osservata una maturazione sessuale nei maschi dopo iniezione del GnRH_a, indicando che l'inibizione dopaminergica non è efficace.

Poiché l'espressione dell'LH non è stata superata nelle femmine che o nuotavano o ricevevano un'iniezione del GnRH_a, le ipofisi sono state considerate come non

sensibilizzate e ancora sotto controllo dopaminergico. Le femmine possono essere stimolate in modo da eludere il controllo inibitorio dopaminergico mediante iniezione di omogenati ipofisari che aumentano l'espressione della subunità beta dell'LH (Jeng *et al.*, 2007).

Mentre l'espressione di gonadotropine e la vitellogenesi nelle femmine durante il nuoto in acqua salata vengono soppresse, il completo sviluppo degli spermatozoi può essere visualizzato nei maschi dopo un lungo periodo di nuoto. Esemplari di anguille maschi che nuotavano per 3 mesi in acqua salata e che sono stati successivamente trattati con gonadotropina corionica umana hanno iniziato la formazione degli spermatozoi prima, e hanno prodotto più volume di sperma di maggiore densità.

La concentrazione plasmatica totale degli acidi grassi non esterificati (NEFA) sembra seguire la tendenza di E2 e del GSI, aumentando con la maturità sessuale nella migrazione di *A. rostrata*.

Inoltre, almeno durante la prima parte della migrazione oceanica, la vitellogenesi sembra essere soppressa: le anguille non hanno mostrato un aumento della GSI, ma hanno evidenziato un'espressione ridotta di *esr1*, *vtg1* e *vtg2* dopo aver nuotato per 3 mesi in acqua salata. Ciò può essere dovuto al fatto che gli effetti indesiderati della vitellogenesi durante il nuoto vengono impediti. La vitellogenesi induce atrofia muscolare (Salem *et al.*, 2006) ed è associata con la mobilitazione delle riserve di fosforo e calcio provenienti dal riassorbimento di vertebre (Sbaihi *et al.*, 2007), che sono ovviamente un processo indesiderato durante il nuoto. La crescita degli ovociti è più pronunciata durante la vitellogenesi e successivamente alla maturazione.

La vitellogenesi e la maturazione potrebbero verificarsi in prossimità o nella zona stessa di riproduzione. Un innalzamento della temperatura dell'acqua è noto per aumentare la capacità di risposta del fegato agli estrogeni nella vitellogenesi (Yaran *et al.*, 1980).

Le anguille argentine hanno livelli di cortisolo più elevati. Il cortisolo è noto per essere coinvolto nella mobilizzazione dei lipidi. Picchi di cortisolo comportano lipolisi dei lipidi muscolari ed epatici (Mommsen *et al.*, 1999) liberando acidi grassi nel sangue.

Il cortisolo è anche conosciuto come stimolatore della sintesi di LH *in vitro* ed *in vivo* (Huang *et al.*, 1999) e come inibitore della sintesi di vitellogenina.

Altri candidati che hanno una funzione metabolica e che possono presentare effetti positivi sulla funzione gonadotropa sono l'insulina e la leptina. Altri candidati interessanti sono la grelina e l'IGF (Insulin-like Growth Factor). Come la leptina, la grelina può essere un integratore neuroendocrino importante della crescita somatica.

Il suo ruolo nella riproduzione dell'anguilla è però ancora sconosciuto. IGF 1 viene prodotto principalmente dal fegato sotto il controllo stimolatorio di GH e insieme svolgono un ruolo importante nella regolazione della crescita corporea (Duguay *et al.*, 1996). Nell'anguilla europea, le IGF esercitano un effetto diretto a livello ipofisario, stimolando la sintesi di LH. IGF può anche avere altri obiettivi diretti, come un effetto stimolante su tutti gli stadi di 11-ketotestosterone indotta spermatogenesi (Nader *et al.*, 1999).

La quantità di energia richiesta per una migrazione di 5.500 chilometri corrisponde a 60-80 g di grassi. Le anguille sono in grado di raggiungere il Sargassi lasciando riserve sufficienti per la riproduzione.

Diverse condizioni oceaniche potrebbero influenzare la velocità di nuoto e il COT positivamente o negativamente.

Le anguille potrebbero beneficiare di correnti per aumentare la velocità di avanzamento o diminuire il COT, ad esempio prendendo le correnti sud-ovest e che scorrono dal Nord Africa occidentale ai Caraibi. La migrazione verticale diminuisce il COT in relazione alla pressione negativa. Le variazioni giornaliere di temperatura che derivano dalla migrazione verticale (da 7 a 12°C) non influenzano l'efficienza del nuoto. La migrazione verticale potrebbe avere effetti sull'alternanza della pressione, temperatura e prevenzione della luce.

L'inizio della migrazione riproduttiva segna l'inizio della mobilitazione dei lipidi e della maturazione, il nuoto può essere un innesco cruciale di questi processi. In particolare il nuoto in acqua dolce stimola lo sviluppo precoce degli ovociti e il deposito di lipidi in ovociti di anguille femmine, probabilmente regolati da un aumento dei livelli di 11-ketotestosterone (11-KT). L'aumento dei livelli di LH nell'ipofisi mostra che il nuoto in acqua dolce stimola la produzione di gonadotropina. Il nuoto aumenta anche plasma 17 β -estradiolo (E2), ma la vitellogenesi epatica non è iniziata: nel plasma livelli di Vtg restano bassi e i globuli non appaiono negli ovociti. Il nuoto in acqua salata inibisce l'espressione della gonadotropina e della vitellogenesi, l'espressione di LHB nella ghiandola pituitaria e dell'esr1, vtg1 e vtg2 nel fegato erano più bassi nei nuotatori di sesso femminile e livelli plasmatici di Vtg erano ridotti. Le femmine di anguille sono probabilmente ancora sotto controllo dopaminergico in contrasto con le anguille argentine di sesso maschile, che continuano la maturazione in acqua salata. Sia l'induzione di deposizione lipidica in ovociti che l'inibizione della vitellogenesi in femmine che nuotano può consentire una naturale sequenza di eventi che portano ad una qualità superiore del gamete in contrasto con la stimolazione mediante iniezioni di estratti ipofisari.

Le anguille argentine europee spendono il 39% dei depositi di grasso con percentuali medie di grasso del 20%. La quantità di grassi che si depositano è positivamente correlata all'età delle anguille. Quindi, in totale il 67% dei depositi di grasso sono spesi per la migrazione riproduttiva e la maturazione degli ovociti, e poiché la composizione corporea rimane la stessa ciò corrisponderebbe al 67% delle riserve di energia totale.

La migrazione verso il Mar dei Sargassi, per le anguille delle Valli di Comacchio, inizia tra il mese di novembre e quello di dicembre. Dati recenti rilevati su diversi ambienti salmastri dell'area alto-adriatica, mostrano che il conseguimento della condizione di anguilla argentina avviene per i maschi dopo 3.5-9.5 anni (36-54 cm) e per le femmine dopo 3.5-14.5 anni (39-100 cm) a partire dallo stadio di ceca.

A Comacchio i maschi hanno taglie equivalenti a quelle delle femmine fino al 5° anno, quando misurano 30-35 cm in lunghezza totale; in seguito l'accrescimento delle femmine procede con incrementi superiori a quelli dei maschi: a 8 anni i maschi misurano circa 40 cm e le femmine circa 50 cm.

Nelle popolazioni di anguilla il rapporto numerico tra maschi e femmine sembra essere regolato da fattori ambientali che agiscono su un probabile sistema poligenico di determinazione del sesso: partendo da giovani individui indifferenziati che hanno una struttura della gonade di tipo maschile, i maschi si differenziano in modo definitivo allo stadio di anguilla argentina, mentre le femmine iniziano il differenziamento già allo stadio di anguilla gialla. Si suppone che in una determinata area la quantità di femmine sia regolata dalle capacità dell'ambiente: in condizioni di affollamento, non solo in allevamento, ma anche in condizioni naturali quando il reclutamento sia stato aumentato artificialmente, si avrebbe una maggiore produzione di maschi.

Il sovraffollamento avrebbe due effetti: in condizioni favorevoli entrambi i sessi raggiungono più precocemente lo stadio di anguilla argentina e iniziano la migrazione riproduttiva; inoltre, la quota di esemplari indifferenziati che si differenziano in femmine è ridotta in proporzione, dato che i maschi consumano meno risorse e migrano prima delle femmine.

Una progressione delle fasi migratorie è chiaramente legata ad una maggiore deposizione di grasso nelle ovociti. Tuttavia, il livello di grassi nelle gonadi è rimasto simile in tutte le fasi migratorie in relazione alle dimensioni delle anguille.

Come la qualità delle uova dipende fortemente dalle incorporazioni delle riserve, questa più alta capacità suggerisce una potenza riproduttiva superiore.

Il fatto che vari stadi abbiano simili livelli gonadici di grasso dimostra che il grasso stesso dovrebbe già essere presente nelle riserve extracellulari delle gonadi.

Quindi forse non è la traslocazione del grasso alla gonade che è stimolata durante queste fasi della migrazione, ma è, in particolare, l'assorbimento dello stesso grasso da parte degli ovociti

2 – SCOPO DELLA TESI

L'anguilla ha un ciclo vitale peculiare nel quale si distinguono due fasi principali. La prima è data da quegli individui sessualmente immaturi, che vivono in acqua dolce, hanno un colore marrone tendente al verdastro nella parte dorsale e giallo nella porzione ventrale (stadio di anguilla gialla). La seconda fase che culminerà con la maturazione delle cellule sessuali, è caratterizzata dalla nuova pigmentazione del corpo dell'anguilla, presentando una colorazione nera sul dorso e grigia sui fianchi e sul ventre (stadio di anguilla argentina).

Tra anguille gialle ed argentine si vengono a determinare differenze evidenti sia nella morfologia (Fig.8) (una nuova pigmentazione, l'occhio diventa più grande, un aumento della massa corporea, le narici si dilatano, allungamento delle pinne pettorali) sia nelle funzioni metaboliche (accumulo di lipidi, riduzione dell'intestino con conseguente perdita delle funzioni) che nei livelli ormonali (aumenta la concentrazione di gonodotrofine, alti livelli dell'ormone della crescita). Queste differenze sono state messe in relazione alla lunga migrazione che l'animale si prepara a compiere in mare, ed alla contemporanea maturazione delle gonadi.

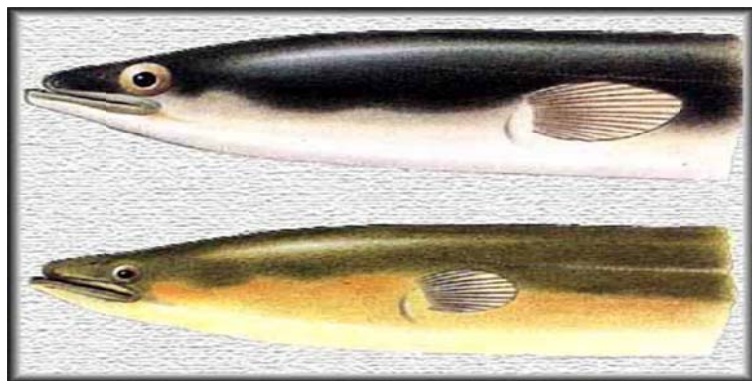


Fig.8 Differenze morfologiche tra anguilla gialla ed argentina (www.ittiofauna.org)

Per fornire nuove conoscenze circa il processo di trasformazione delle anguille gialle in argentine, questo lavoro di tesi ha indagato se vi sia una modificazione del quadro proteico del siero e quali proteine eventualmente risultino sovra- o sotto- espresse nell'una e nell'altra fase del ciclo biologico, a sostegno delle nuove performance.

A tale fine si è applicata una tecnica innovativa e molto sensibile quale l'analisi proteomica che permette di identificare in modo sistematico le proteine all'interno di un substrato biologico, ad es. il citoplasma, il siero, etc. Per proteoma si intende l'insieme di tutti i prodotti proteici espressi incluse le eventuali isoforme proteiche. Il proteoma, dato che le proteine rispecchiano le funzioni che la cellula o l'organismo deve svolgere per mantenere l'omeostasi, è diverso nei diversi tipi cellulari ed è dinamico nel tempo e varia per esempio in risposta a stimoli ambientali. Molto importante nel nostro caso, il proteoma cambia sensibilmente nelle varie fasi del ciclo di vita di un organismo.

Nel caso specifico di questa tesi abbiamo condotto una analisi proteomica di tipo "differenziale" ossia ci siamo concentrati sulla espressione differenziale delle proteine nel siero durante la fase gialla e la fase argentina degli organismi in esame.

Le anguille gialle ed argentine sono state prelevate dalla medesima laguna costiera (Valli di Comacchio, Ferrara); in particolare le anguille argentine sono state prelevate al "lavoriero" in coincidenza della loro fuoriuscita dalla valle per l'ingresso in mare durante i mesi di novembre-gennaio; le anguille gialle pescate non reti tradizionali durante i mesi primaverili.

3 – MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Nelle Valli di Comacchio, presso la stazione da pesca “Foce”, otto anguille sono state prelevate dalla medesima stazione di pesca.

Questi individui erano stati pescati 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 dei pesci è avvenuto a secco.

In un secondo campionamento sono state prelevate, nel mese di Aprile 2012, otto anguille, la cui cattura è avvenuta con l’utilizzo di particolari reti chiamate cogolli. Gli esemplari campionati erano anguille dalla livrea gialla del peso medio di 256.2 g e di lunghezza media di 528.8 mm. Il trasporto degli animali è avvenuto a secco.

In laboratorio gli animali sono stati posizionati in acquario, della capacità di 300 litri, contenente acqua salmastra proveniente dalla stessa zona del campionamento, areata alla temperatura di 16°C e tenuta al buio. Inoltre le anguille sono state a digiuno 24 ore prima dell’esperimento.

A tale proposito, una volta prelevate dall’acquario e poste in ghiaccio secco per renderle meno attive, sono state effettuate diverse misure (Fig.9) fra le quali:

peso del corpo (W),

lunghezza del corpo (L),

lunghezza della pinna pettorale (FL),

diametro orizzontale e verticale dell’intero occhio (EDh, EDv).



Fig.9 Analisi biometriche di *Anguilla anguilla* (EELREP)

3.2 Misure morfometriche

Sono stati calcolati diversi indici tra i quali:

l'indice di argentinizzazione (SI),

il fattore di condizione (CF), dato dal rapporto tra (W) e (L) al cubo dell'animale, moltiplicato per un fattore (10^5),

l'indice dell'occhio (EI) 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 (Fulton, 1904).

Tramite l'utilizzo di questi indici si è potuto caratterizzare l'animale definendone il sesso, lo stadio di maturazione, il benessere e discriminare tra anguilla gialla e argentina (Tab.1 e 2).

L'argentinizzazione è un processo graduale, influenzato da fattori abiotici e biotici.

Per questo motivo è stata proposta una classificazione più dettagliata che tiene conto di diversi parametri interni ed esterni (Durif *et al.*, 2009) come: la degenerazione del tratto digestivo, il diametro dell'occhio, il fattore di condizione, i livelli gonadotropinici, la lunghezza della pinna pettorale e lo sviluppo delle gonadi.

Sono state definite 5 fasi di sviluppo per le femmine:

(FI, FII), fase di crescita in cui le anguille si nutrono e iniziano a differenziarsi sessualmente (anguille gialle). Corrisponde allo stadio di anguilla gialla con un indice gonadosomatico $GSI < 0.4\%$; le gonadi mostrano piccoli ovociti, un denso ooplasma e un denso nucleo con un grande nucleolo.

(FIII), fase premigratoria caratterizzata da alti livelli dell'ormone della crescita (GH) e dallo sviluppo delle gonadi.

Lo stadio intermedio presenta un $0.4\% < GSI < 1.2\%$; gli ovociti sono di maggiori dimensioni e si osserva la presenza di vescicole lipidiche nell'ooplasma, il che indica l'inizio dell'incorporazione delle riserve negli ovociti, anche denominata "vitellogenesi endogena" (Aroua *et al.*, 2005).

(FIV, FV), fase migratoria contraddistinta dalla produzione dell'ormone gonadotropina, dalla cessazione dell'alimentazione con conseguente degenerazione del tratto digestivo e dall'allungamento della pinna pettorale. Corrisponde alla tappa di argentinizzazione con $GSI > 1.2\%$; gli ovociti sono ingranditi ulteriormente con un nucleo grande e piccolo nucleolo in posizione periferica e numerose vescicole lipidiche nell'ooplasma.

Anguilla	L (mm)	W (g)	FL (mm)	EDh (mm)	EDv (mm)	CF	EI	SI
1	600	364	25.8	6.6	5.7	0.17	4.59	FII
2	540	325	21.2	5.9	5.2	0.21	4.20	FII
3	550	293	22.5	6.5	5.8	0.18	5.10	FII
4	510	191	20.4	5.4	5.2	0.14	4.24	FII
5	480	194	19.5	5.6	5.0	0.18	4.34	FII
6	530	237	23.0	5.5	4.8	0.16	3.67	FII
7	500	222	18.9	5.1	4.7	0.18	3.62	FII
8	520	223	20.9	5.4	5.0	0.16	3.93	FII
Media	528.8 ± 12.9	256.2 ± 22.6	21.5 ± 0.8	5.75 ± 0.2	5.18 ± 0.1	0.17 ± 0.01	4.20 ± 0.2	FII

Tab.1 Misure morfometriche di 8 anguille gialle immature allo stadio II. 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 argentizzazione (SI).

Anguilla	L (mm)	W (g)	FL (mm)	EDh (mm)	EDv (mm)	CF	EI	SI
1	820	1860	42.2	9.2	8.5	0.3	7.5	FIV
2	840	1400	39.6	11.0	9.8	0.2	10.0	FIV
3	890	1560	43.6	12.0	11.4	0.2	12.1	FIV
4	935	1690	41.4	11.6	11.2	0.2	10.9	FIV
5	830	1377	34.9	10.0	8.9	0.2	8.4	FIV
6	910	1817	47.7	11.3	10.9	0.2	10.6	FIV
7	790	1168	34.4	9.8	9.4	0.2	9.1	FIV
8	840	1408	41.6	10.9	10.8	0.2	11.0	FIV
Media	856 ±	1535 ±	40.7 ±	10.7 ±	10.1 ±	0.2 ±	10 ±	FIV
	17	85	1.6	0.3	0.4	0.01	0.5	

Tab.2 Misure morfometriche di 8 anguille argentine. 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).

Ogni anguilla è stata poi rapidamente decapitata anteriormente alle pinne pettorali, tra queste e la testa. La raccolta del plasma delle anguille gialle ed argentine è stata fatta tramite pipetta e trasferito in 16 eppendorf (8 per le gialle e 8 per le argentine) da 1.5 ml (separando i due tipi diversi di campioni). Una volta scritto sul tappo il numero del campione e la data, queste sono state poste in un porta eppendorf e conservate a -80°C.

3.3 Dosaggio delle proteine con metodo Bradford

La quantità di proteine presenti nel campione viene determinata con kit appositamente studiati per l'elettroforesi bidimensionale, come il Bradford. Si procede preparando la curva di taratura con la BSA (soluzione 1 ug/ul) in presenza del buffer.

	ug BSA	ul BSA	ul Reb II + IP	ul Bradford
Standard 0	-	-	1	999
Standard 1	1	1	1	998
Standard 2	2.5	2.5	1	996.5
Standard 3	5	5	1	994
Standard 4	10	10	1	989

Si preparano gli Standard (in doppio) nel tubo aggiungendo il Bradford IX, il Reb II e il BSA. Si vortexa per 5 secondi e si incubano a temperatura ambiente per 5 minuti.

Terminata l'incubazione, si rovescia la soluzione nelle cuvette di plastica e si legge l'assorbanza (Abs) a 595 nm. Si preparano allo stesso modo i campioni in doppio, lasciandoli successivamente incubare sempre per 5 minuti e leggendo l'Abs a 595.

3.4 Preparazione dei campioni per 2D

Tramite l'utilizzo del kit ReadyPrep 2-D Cleanup della Bio-Rad si purificano i campioni migliorando notevolmente la risoluzione delle mappe. Ciascun campione di anguilla gialla è stato posto in unica eppendorf con scritto pool 1. Stessa cosa è stata fatta per quanta riguarda le anguille argentine (eppendorf pool 2).

Successivamente si è portato a volume finale di 100 ul il pool 1 (anguille gialle) aggiungendo 87,65 ul di acqua Milli Q.

Stesso procedimento è stato svolto per il pool 2 (anguille argentine) aggiungendo 89,04 ul di Milli Q.

Si aggiungono poi con 300 ul di precipitation agent 1 a ciascuno dei pool. Dopo l'utilizzo del vortex, si incubano in ghiaccio per 15 minuti.

Dopo il tempo di incubazione, si aggiungono 300 ul di precipitation agent 2 sempre ai pool 1 e 2, i quali vengono centrifugati per 5 minuti alla massima velocità ($>12,000 \times g$) in modo da formare il pellet.

Si posizionano le due eppendorf nella centrifuga con il pellet rivolto esternamente e si centrifuga per un tempo di 15-30 secondi per permettere ad eventuali residui di posizionarsi in fondo all'eppendorf. Si procede poi alla rimozione del supernatante.

Si aggiungono 40 ul di wash reagent 1 sopra ciascuno dei pellet. Si posizionano quindi le eppendorf nella centrifuga e si centrifuga alla massima velocità per 5 minuti. Si rimuove poi il supernatante.

Si procede con l'aggiunta di 25 ul di acqua ultrapura e si utilizza il vortex per 10-20 secondi. Il pellet, in questo modo, si disperde senza dissolversi nell'acqua.

Si continua con l'aggiunta di 1 ml di wash reagent 2 e 5 ul di wash 2 additive. Si vortexano quindi i pool 1 e 2 per 1 minuto.

I campioni vengono incubati a -20°C per 30 minuti. I due campioni contenuti nelle eppendorf vengono poi vortexati per 30 secondi ogni 10 minuti durante il periodo di incubazione.

Dopo l'incubazione, si centrifugano a $12,000 \times g$ per 5 minuti in modo da formare il pellet. Una volta rimosso il supernatante, si centrifugano nuovamente per 15-30 secondi.

Il pellet apparirà bianco in questa fase. Si tengono poi aperte le eppendorf a temperatura ambiente per non più di 5 minuti. Durante questa fase il pellet apparirà traslucido.

Si passa poi a risospendere ciascun pellet aggiungendovi sopra un volume appropriato di 2-D rehydration/sample buffer.

Si risospendono quindi i campioni che vengono successivamente incubati a temperatura ambiente per 3-5 minuti.

Si centrifugano poi alla massima velocità per 2-5 minuti a temperatura ambiente. Così facendo, il supernatante può essere usato direttamente per le strip IPG, dopo aggiunta di Reb buffer II a ciascuno dei campioni.

3.5 Caricamento dell'estratto proteico su strip per la prima dimensione

Si procede caricando l'estratto proteico su strip per la prima dimensione, che hanno lunghezza di 13 cm e range di pH compreso tra 4 e 7. L'utilizzo di strip non lineari, come in questo caso, permette una maggiore definizione nella zona centrale della stessa strip dove si concentrano più proteine. L'assorbimento del campione da parte della strip (o reidratazione della strip) avviene O/N.

Prima di essere caricato sulla strip al campione proteico vengono aggiunte altre sostanze (Amfoline e Ditiotritolo, DTT), che consentiranno la corretta separazione delle proteine in base al loro punto isoelettrico (pI) durante la prima dimensione ("isoelettrofocusing"), e un colorante (Blu di Bromofenolo) che permette di visualizzare il campione durante le varie fasi.

Alcune proteine tendono a precipitare al loro punto isoelettrico. I sali favoriscono la solubilizzazione ma sono dannosi per l'isoelettrofocalizzazione e vengono rimossi nei

primi step dell'IEF. Gli anfiliti permettono alle proteine di rimanere solubili al loro pI.

Il volume finale del campione da caricare su strip è di 250 ul.

Il tempo di reidratazione dipende sia dalla lunghezza della strip che dalla concentrazione del campione. La miscela di caricamento è preparata come indicato in tabella.

Proteine da caricare	A.gialla 110 ug (19.6 ul)	A.argentina 110 ug (17.4 ul)
DeStreak (1.2%)	3	3
Blu di Bromofenolo	1.6	1.6
Amfoline IPG 4-7	2.5	2.5
Reb Buffer II	223.3	225.4

Si prepara quindi in un'unica eppendorf il volume necessario per tutti i campioni.

I campioni si agitano bene al vortex e si distribuiscono nelle singole eppendorf in cui si aggiunge il campione. Dopo l'aggiunta della miscela di caricamento, il campione viene mescolato con il vortex, poi centrifugato alla massima velocità (13,000 x g) per 10 minuti in modo da rimuovere eventuali precipitati.

Il campione viene distribuito negli appositi canalini dello Strip holder, poi vi si appoggia sopra la strip, con la faccia del gel rivolta verso il campione (cioè verso il basso).

Si tolgono le eventuali bolle e si aggiungono dall'altro lato del canale, 4 ml di paraffina liquida (olio minerale) per coprire completamente il campione, evitando l'evaporazione.

Si lascia quindi reidratare la strip il tempo necessario. Una volta avvenuta la reidratazione, si prepara la elettroforesi di prima dimensione.

3.6 Prima dimensione (isoelettrofocalizzazione)

L'isoelettrofocalizzazione si basa sul fatto che le proteine sono molecole anfoteriche, cioè hanno carica positiva o negativa a seconda del pH dell'ambiente ($\text{pH} > \text{pI}$ carica netta -; $\text{pH} < \text{pI}$ carica netta +). Se la proteina si trova in una regione con pH più basso del proprio punto isoelettrico, avrà carica positiva e si muoverà verso il catodo. Quando la proteina raggiunge la zona con pH pari al proprio pI avrà carica neutra e rimarrà in quella regione.

Se la proteina si trova in una regione con pH più alto del proprio pI si muoverà verso l'anodo perché carica negativamente

Un gradiente di pH immobilizzato viene creato incorporando buffer a pH specifico durante la polimerizzazione del gel di poliacrilammide.

Si prelevano le strip reidratate, si lavano rapidamente per immersione in un becker con acqua Milli Q e si immergono le strip dopo leggera asciugatura negli appositi canalini, facendo attenzione a mettere il polo positivo della strip verso il polo positivo della macchina e la faccia con il gel rivolta verso l'alto, quindi al contrario rispetto a prima.

Si preparano gli appositi rettangoli di carta Whatman, idratandoli con 150 μl di acqua Milli Q. Questi vengono messi alle due estremità di ciascuna strip (sovrapponendoli ad esse) e servono per condurre la corrente ed assorbire ciò che fuoriesce dal gel durante la corsa (ad es. il Blu di Bromofenolo che migra verso il polo positivo).

Le strip devono essere tutte allineate fra loro e poi ai due poli si dispongono gli elettrodi, in modo che i loro filamenti tocchino i rettangoli di carta Whatman. Gli elettrodi vengono fermati con le apposite alette.

Si chiude il coperchio dello strumento (Ettan IPGphor3 della GE Healthcare) e si fa partire la corsa che ha come condizione limitante i Volt/ora, utilizzando i seguenti parametri:

Tappa	Voltaggio da raggiungere (V)	Durata (ora)
1. Step	500	4
2. Gradiente	1000	2
3. Gradiente	8000	3
4. Step	8000	Fino a 20000 VoltHours totali
5. Step	500	30

Al termine della corsa le strip si possono congelare a -80°C in eppendorf da 2 ml per proseguire in un altro momento, oppure si prosegue immediatamente con la seconda dimensione dopo un brevissimo lavaggio in Milli Q per togliere dalle strip l'olio in eccesso.

3.7 Seconda dimensione

Nel nostro caso utilizziamo gel criterion XT precast al 12% di acrilamide. I vantaggi dei precast sono la qualità standard, il fatto di non manipolare acrilamide.

Gli svantaggi sono dati dai costi elevati e dalla limitata conservazione (pochi mesi). Le strip appena corse o scongelate devono essere sottoposte a due successivi trattamenti di riduzione ed alchilazione, in un tampone (equilibration buffer) che contiene anche sodio dodecil solfato (SDS).

Questo detergente denatura le proteine che diventano lineari. Inoltre l'SDS conferisce alle proteine stesse carica negativa, in modo che possano migrare attraverso il gel della seconda dimensione (contenente anch'esso SDS) verso il polo positivo, separandosi soltanto in base al loro peso molecolare, essendo divenute lineari.

Si utilizzano agenti caotropici capaci di rompere i legami idrofobici (o idrogeno) delle proteine. L'urea è il più comune, mentre la tiourea favorisce la solubilizzazione di proteine difficili da trattare.

L'Equilibration buffer ha la seguente composizione:

Componente	Concentrazione	Totale 100 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	50 mM	10 ml
Urea	6 M	36 g
Glicerolo	30% (v/v)	30 ml
SDS	2%	2 g
H2O Milli Q		Fino a 100 ml

Le strip vengono poste in Equilibrium buffer con SDS e colorato con blu di bromofenolo, prima con DTT poi con Iodoacetamide, nelle quantità indicate dalla tabella sotto. La riduzione del campione viene fatta con DTT perché non altera le mappe, come invece può succedere utilizzando altri reagenti (mercaptoetanol). L'alchilazione serve ad impedire la successiva ossidazione dei gruppi SH con iodoacetamide.

		1 Strip da 11-13 cm
RIDUZIONE	DTT	0.04 g
	Equilibration buffer	2 ml
	Blu di Bromofenolo	3 ul
ALCHILAZIONE	IDOACETAMIDE	0.05 g
	Equilibration buffer	2 ml
	Blu di Bromofenolo	3 ul

Si preparano quindi per ogni strip 2 frammenti di pipette da 2 ml tagliate in base alla lunghezza della strip. Si chiudono ad una estremità con parafilm. Si inserisce la strip (dopo averla sciacquata) nella pipetta, poi si versa l'Equilibration buffer + DTT. Si chiude con parafilm la seconda estremità di ogni pipetta, che poi viene messa a ruotare su T-roll per 15-20 min.

Terminato il tempo si passano le strip in nuove pipette, contenenti Equilibration buffer + Iodoacetamide (preparata fresca e aggiunta subito prima), per altri 15-20 minuti in agitazione.

Durante questa seconda incubazione si scongelano i marker per le proteine e si adsorbono in giusta quantità su quadrati di carta di 6x6 mm (uno per ogni gel di seconda dimensione).

Si mettono a bollire 2 eppendorf con 1.5 ml cad, per ogni gel, contenenti l'agarosio (Agarosio 1% in Running buffer MOPS contenente 2.5 ul di Blu di Bromofenolo per ml).

Terminata l'incubazione equilibrante, si sciacqua rapidamente la strip in Milli Q e la si appoggia con la parte della plastica appoggiata sul vetro grosso, il polo + convenzionalmente verso destra e il polo - dal lato dei marker e la si fa scendere verso il gel con l'aiuto di una pinzetta, facendo attenzione a non danneggiarla.

Si preleva l'agarosio caldo e si pipetta sul vetro sopra la strip, facendo in modo che la corrente di agarosio fuso e la gravità portino la strip dentro al pozzetto, a contatto col gel. Importante è prestare attenzione alla temperatura dell'agarosio che non deve essere bollente per non danneggiare la strip (60°C). Con una pinzetta si spinge delicatamente verso il basso la strip fino a farla toccare sul gel, spostandola tutta a sinistra.

Controllare attentamente che tutto lo spazio dello stacking sia uniformemente riempito di agarosio e che non ci siano bolle tra la strip e il Running, altrimenti potrebbero formarsi delle onde durante la corsa.

Per i gel Criterion la corrente è costante a 40 mA/gel (2.5 h).

Terminata la corsa (cioè quando il fronte di migrazione, indicato dal colorante blu, giunge in fondo al gel) si smontano i gel tenendoli separati come campioni e procedendo con un bisturi ad allontanare la strip.

Al termine della corsa si procede alla fissazione delle proteine nel gel, con un'opportuna soluzione di fissazione.

Si utilizza la Fixing (Metanolo 40% + Acido acetico 10%) in acqua Milli Q con un volume di 200 ml in modo da evitare l'eluizione delle proteine. La fissazione procede per 1 ora a temperatura ambiente, mantenendo i gel in agitazione.

Dopo la fissazione, i gel vengono sottoposti a colorazione con il colorante Blu Coomassie colloidale (Coomassie Brilliant Blu G250).

Per prepararlo si devono mescolare 98 ml di soluzione A (2% di H₃PO₃ + 10% di Ammonio solfato) con 2 ml di soluzione B (5% Coomassie) per ogni gel.

Il colorante viene versato sopra ogni gel, dopo aver tolto la soluzione di fissazione, e si procede alla colorazione per tutta la notte in agitazione, coprendo le vaschette che contengono i gel con pellicola.

3.8 Decolorazione e acquisizione del gel

Si provvede a decolorare il fondo del gel con 3-4 lavaggi di 10 minuti in acqua, per poi trasferire il gel in una nuova vaschetta contenente acqua pulita, lasciandolo in decolorazione fino al momento dell'acquisizione delle immagini con scanner. In seguito alla decolorazione del fondo risulteranno infatti evidenti nel gel gli spot corrispondenti alle proteine.

L'acquisizione delle immagini dei gel avviene tramite lo scanner Molecular Imager Pharos-FX della Bio-Rad, con il software Quantity One, attraverso un'eccitazione (Ex) di 532 nm e un'emissione (Bp) di 605 nm con e può essere eventualmente sottoposta ad analisi densitometrica degli spot, mentre il gel può essere conservato in acqua Milli Q con 0.1% di acido acetico in camera fredda, per essere sottoposto al prelievo di spot interessanti per l'identificazione proteica.

Tramite l'utilizzo del programma Proteomweaver si sono confrontate le diverse mappe proteiche, evidenziando gli spot di maggiore interesse.

3.9 Identificazione degli spot

Gli spot differenzialmente espressi, con un rapporto superiore a 3 o inferiore ad 1/3 sono stati prelevati per poi essere identificati tramite spettrometria di massa MS/MS presso il dipartimento DIASV dell'Università del Piemonte Orientale, sede di Alessandria grazie al Prof. Aldo Viarengo e al lavoro svolto dall'esperto di proteomica Dott. Francesco Marsano.

Gli spot scelti sono stati sottoposti a identificazione mediante ricerca con i database NCBI, MSDB e SWISS-PROT. Lo score dell'identificazione viene attribuito dal programma Mascot (Mascot Score). Score individuali > 42 indicano un'identità o una estensiva omologia con $p < 0.05$.

4 – RISULTATI

L'elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilamide (2D-PAGE) conserva un ruolo centrale nella ricerca proteomica come tecnica separativa sulla base di due differenti proprietà fisico-chimiche, punto isoelettrico (pI) e massa molecolare relativa. La valutazione quantitativa delle proteine, separate con questa sistema, si fonda sull'analisi delle immagini attraverso appositi programmi (Proteomweaver). A tale proposito, si sono confrontati tramite analisi i gel di anguilla gialla ed argentina individuando gli spot e quantificandoli.

Sono state preparate in totale tre coppie di gel per quanto riguarda le anguille gialle ed argentine. Dopo avere acquisito le relative immagini con il programma Quantity One, si è fatto il prelievo degli spot che differivano tra anguille gialle ed argentine.

Di seguito vengono riportate le immagini relative ad una coppia dei gel delle anguille gialle ed argentine (Fig.10 e 11), dopo essere state acquisite con Quantity One.

La differenza più significativa è rappresentata dal treno di spot con peso molecolare di 75 kDa e pI medio intorno a 6, evidente nei gel dell'anguilla gialla ed appena accennato in quelli dell'argentina.

Tramite il software Proteomweaver, si sono impostati i parametri per la "spot detection" cambiando maggiormente il limite di intensità e il contrasto, in modo da evidenziare principalmente gli spot più interessanti, i quali sono stati evidenziati nelle due diverse mappe proteiche relative alle anguille gialle (Fig.12) e a quelle argentine (Fig.13).

Infine, dopo avere effettuato l'analisi (sempre tramite Proteomweaver) delle 3 coppie di gel preparati è stato possibile creare un average gel (Fig.14) (cioè una media di tutti i gel) che ha confermato la presenza di quel treno di spot presente nell'anguilla gialla che è, invece, davvero poco espresso nell'argentina.

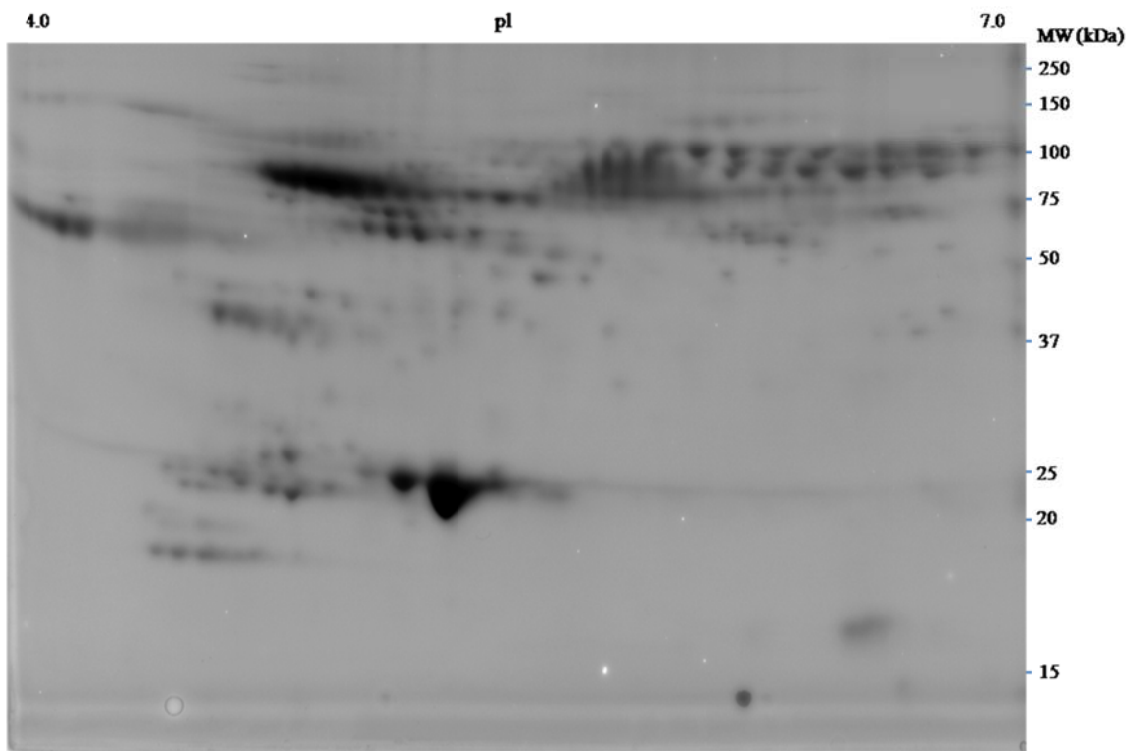


Fig. 10 Immagine relativa al gel di anguilla gialla dopo acquisizione con il programma Quantity One

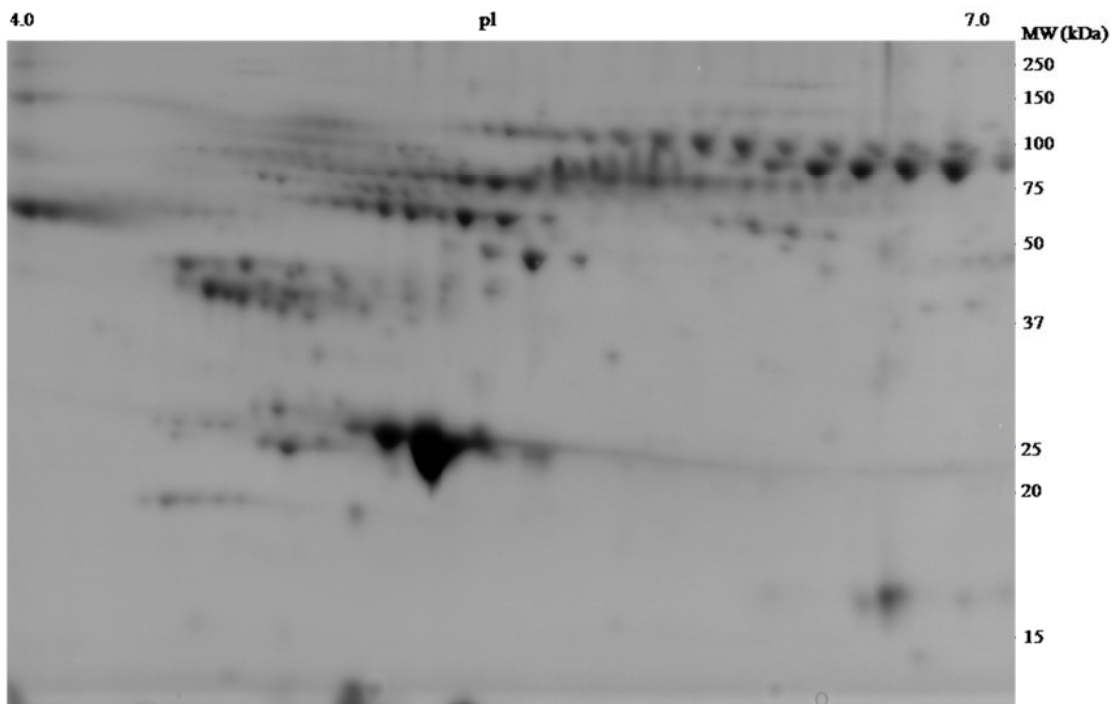


Fig.11 Immagine relativa al gel di anguilla argentina dopo acquisizione con il programma Quantity One

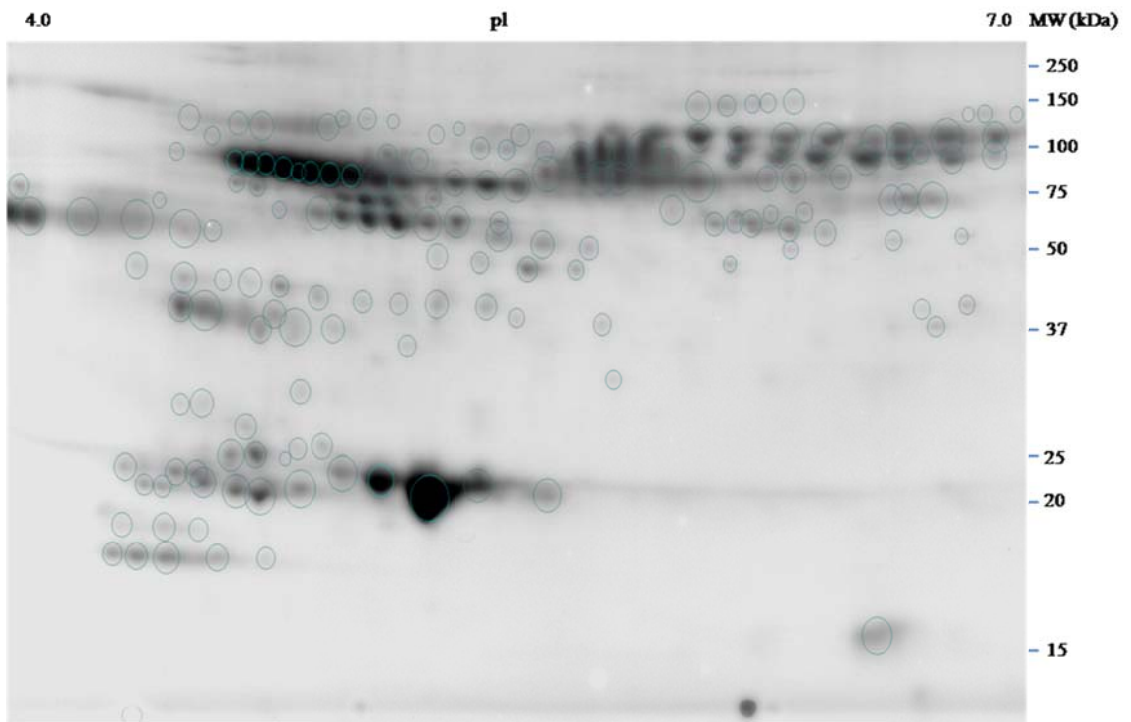


Fig.12 Immagine relativa al gel di anguilla gialla dopo l'identificazione degli spot effettuata con il programma Proteomweaver

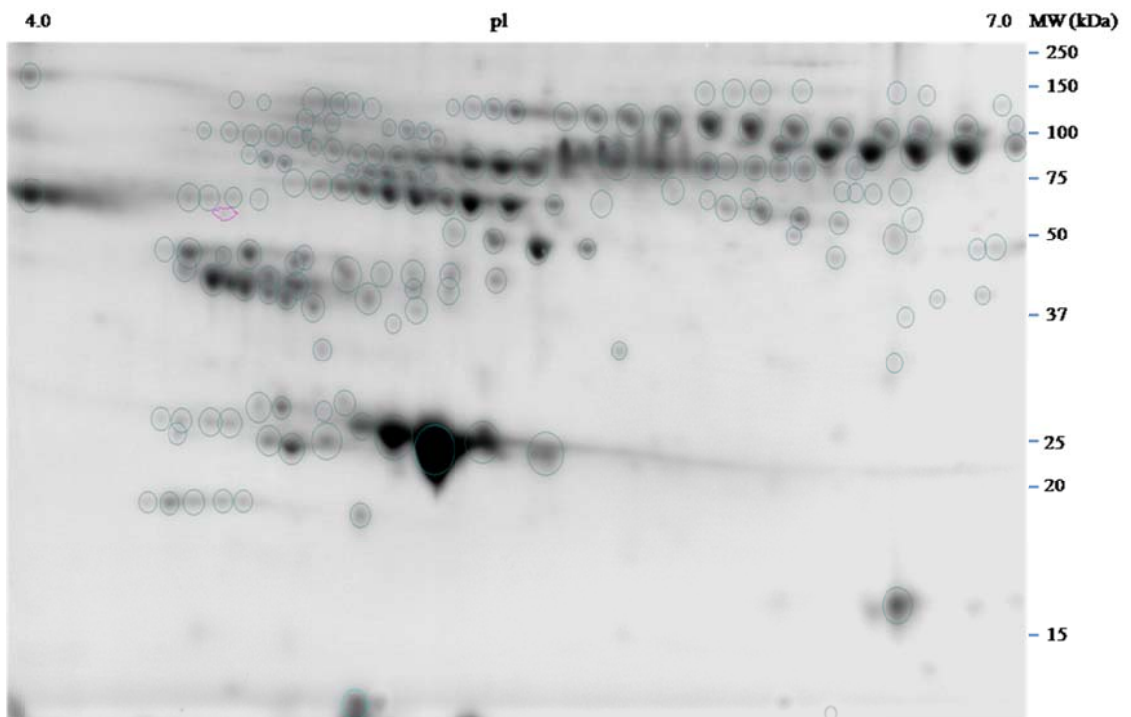


Fig.13 Immagine relativa al gel di anguilla argentina dopo l'identificazione degli spot effettuata con il programma Proteomweaver

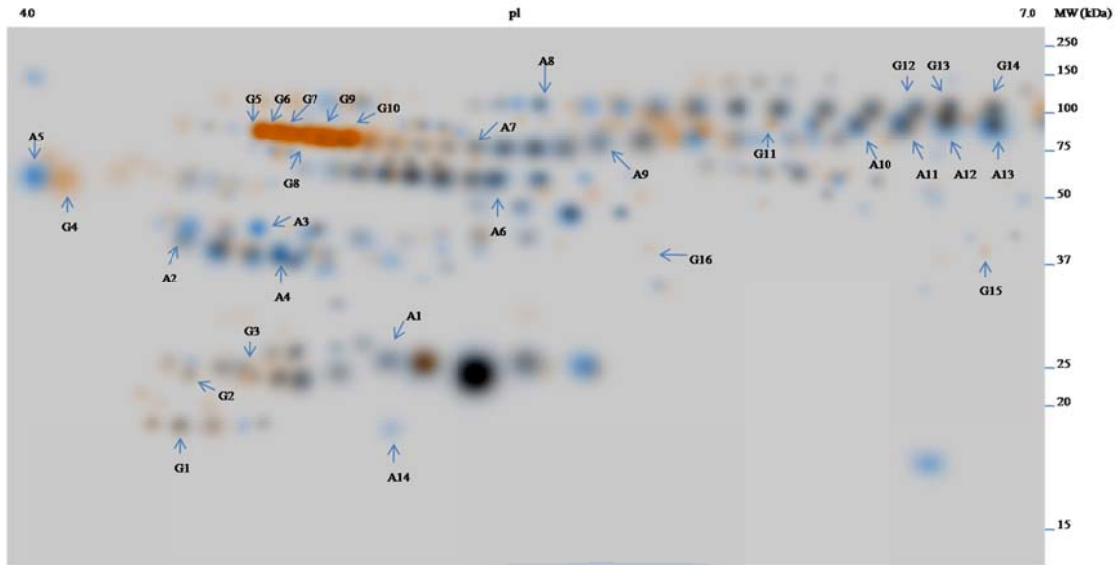


Fig.14 Immagine della sovrapposizione dei gel medi (average gel) ottenuta con il programma Proteomweaver. In giallo gli spot sovraespressi nell'average gel dell'anguilla gialla, in azzurro gli spot sovraespressi nell'average gel dell'anguilla argentina. In grigio e nero gli spot espressi in egual modo nei due average gel. Le frecce indicano gli spot differenzialmente espressi che sono stati prelevati e successivamente inviati per l'identificazione.

Successivamente viene creato un grafico a dispersione (scatter plot) che mostra le intensità della coppia di gel, per valutare come l'intensità del punto varia da un gel ad un altro. Solitamente questi grafici a dispersione tengono conto delle intensità medie di gruppi di gel. Proteomweaver fornisce la possibilità di ottenere due grafici diversi.

Nel grafico a dispersione (Fig.15) è possibile vedere le intensità di tutti i punti di entrambe le immagini di gel visualizzate in un sistema di coordinate, colorati in base al fattore di intervallo in cui sono stati trovati. L'asse x mostra l'intensità del gel che era sul lato sinistro della matrice di abbinamento. L'asse y mostra, invece, le intensità dei punti dell'immagine del gel che era in alto nella matrice di abbinamento. I punti che sono presenti soltanto in un asse si trovano esclusivamente nella corrispondente immagine del gel e non in quell'altra. Si avranno, quindi, punti di colore blu o rosa fino a quando ci sono punti che si trovano in un gel e non in un altro. I punti con la stessa intensità in entrambi i gel si trovano sulla diagonale del diagramma a dispersione.

La distanza della diagonale è la misura della differenza di intensità di una proteina nei due gel. Nel grafico a dispersione due linee sono tracciate parallelamente alla linea diagonale. I numeri accanto a ciascuna linea mostrano il fattore di intensità del punto in questa linea nel sistema di coordinate. I punti che si trovano sotto la linea inferiore indicano proteine sovraesprese; mentre i punti situati al di sopra della linea superiore indicano proteine sottoregolate.

Nel grafico a dispersione, il fattore delle intensità di un punto, chiamato fattore di regolazione, viene calcolato secondo la seguente formula:

$$\text{Fattore di intensità} = \text{Intensità Gel asse x} / \text{Intensità Gel asse y}$$

Nell'analizzare le immagini dei gel è desiderabile che il maggior numero di punti siano nell'intervallo centrale.

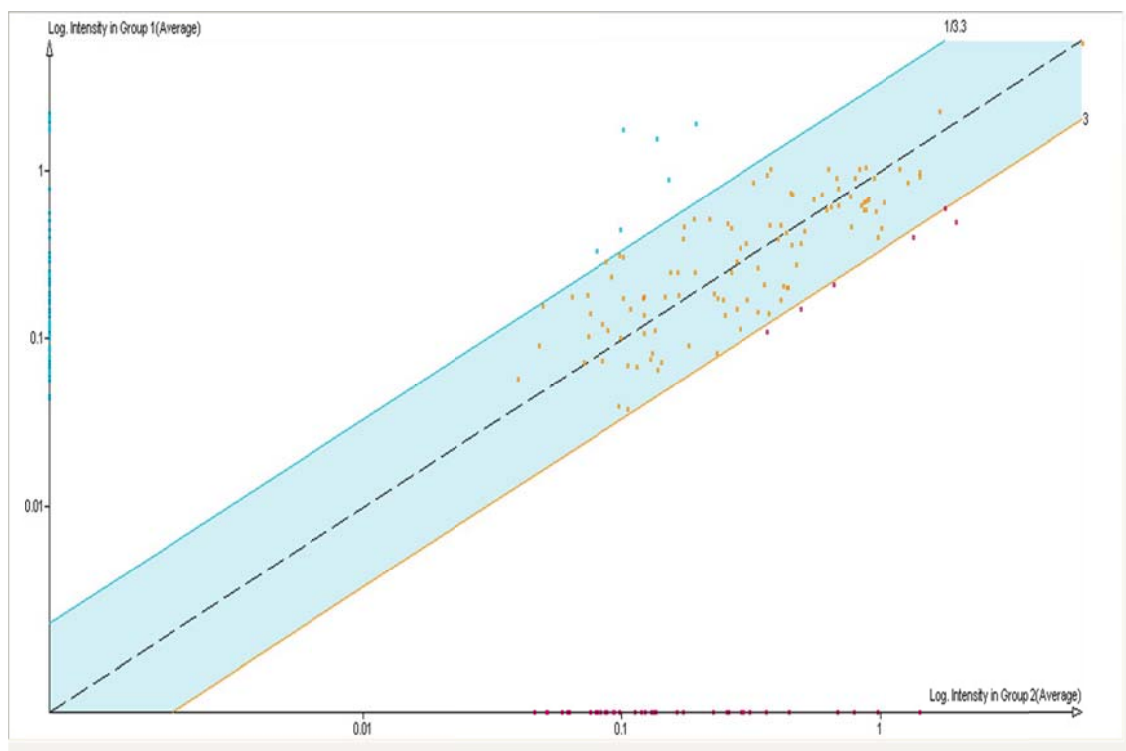


Fig.15 Immagine del grafico a dispersione relativa al confronto tra gli average gel

Nel grafico a torta (Fig.16) sono riassunte tutte le informazioni riguardanti il confronto tra gli average gel.

Il gel 1 relativo alle anguille gialle presenta in totale 171 spot, mentre il gel 2 relativo alle anguille argentine ne presenta 156 riscontrati. Gli spot comuni a entrambe le mappe proteiche sono 104 (in arancio nel grafico a torta), che rappresenta l'89% degli spot totali. Gli spot sovraespressi o presenti solo nell'average gel delle anguille gialle sono rappresentati in rosa nel diagramma a torta, quelli sovraespressi o presenti solo nell'average gel delle anguille argentine sono rappresentati in blu nel diagramma a torta.

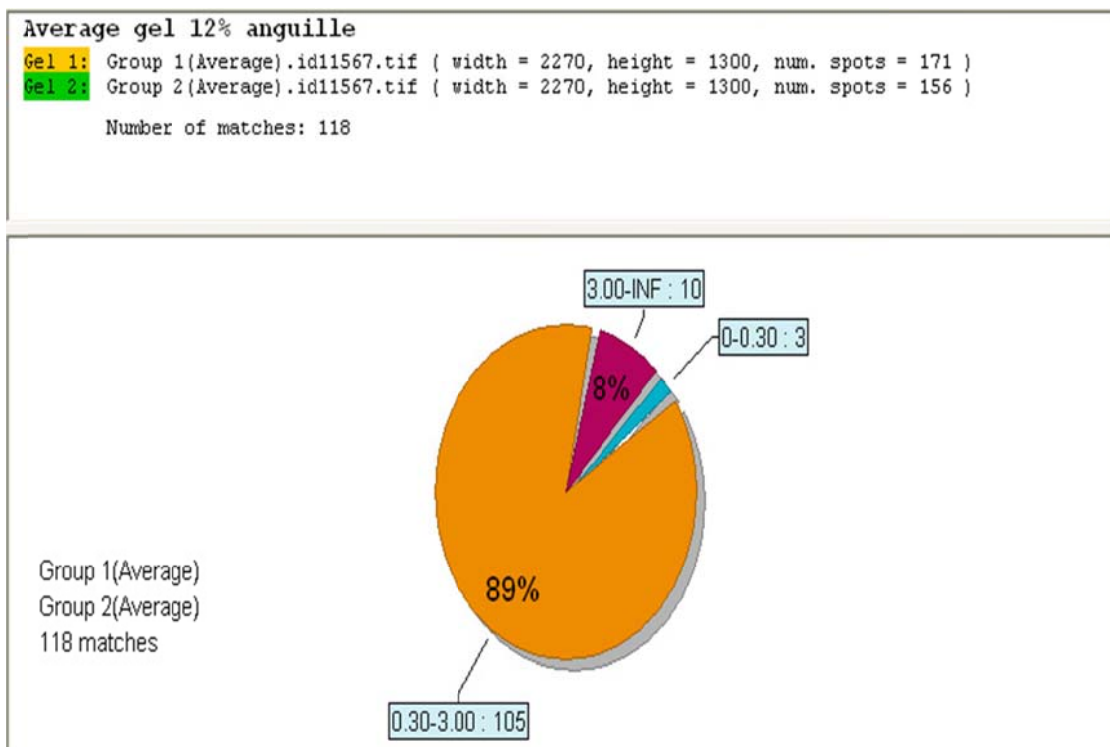


Fig.16 Immagine del grafico a torta relativa all'average gel

Dopo l'identificazione degli spot, avvenuta applicando la tecnica della spettrometria di massa MS/MS, si è arrivati al riconoscimento di diverse proteine che sono elencate nella seguente tabella.

Spot	Gel	Peso molecolare (MW)	Punto isoelettrico (pI)	Proteina e Accession number	Rapporto di espressione	Score/Matches
1	Gialla	15	4-5.5	Non identificata		
2	Gialla	25	4.0-5.5	Apolipoproteina Ig I 13591610 (<i>Anguilla japonica</i>)	Overespressa in gialla	56/1
3	Gialla	25	4.0-5.5	Apolipoproteina Ig I 13591610 (<i>Anguilla japonica</i>)	Overespressa in gialla	56/1
4	Gialla	50	4.0	Non identificata	Overespressa in gialla	
5	Gialla	25	4.0-5.5	Warm Temperature acclimation Ig I 158021046 (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Overespressa in gialla	70/1
6	Gialla	75	4.0-5.5	Warm Temperature acclimation Ig I 158021046 (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Overespressa in gialla	90/1
7	Gialla	75	4.0-5.5	Warm Temperature acclimation gi I 158021046	Overespressa in gialla	82/2

				<i>(Ictalurus punctatus)</i>		
8	Gialla	75	4.0-5.5	Non identificata		
9	Gialla	75	4.0-5.5	Non identificata		
10	Gialla	75	4.0-5.5	Warm Temperature Acclimation gi I 158621046 <i>(Ictalurus punctatus)</i>	Overespressa in gialla	39/1
11	Gialla	75-100	5.5	Non identificata		
12	Gialla	100	7.0	Transferrina Ig I 33113484 <i>(Pagrus major)</i>	Overespressa in gialla	65/2
13	Gialla	100	7.0	Transferrina Ig I 47228215 <i>(Tetradon nigroviridis)</i>	Overespressa in gialla	34/1
14	Gialla	100	7.0	Transferrina gi I 33113484 <i>(Pagrus major)</i>	Overespressa in gialla	66/3
15	Gialla	37	7.0	Arginina chinasi gi I 22693231 <i>(Neocardina denticulata)</i>	Overespressa in gialla	312/6
16	Gialla	37	7.0	Non identificata		
1	Argentina	25	4.0-5.0	Non identificata		
2	Argentina	37-50	4.5	Aptoglobina gi I 11095751	Overespressa in argentina	36/2

				<i>(Oncorhynchus mykiss)</i>		
3	Argentina	37-50	5.0	Aptoglobina gi I 11095751 <i>(Oncorhynchus mykiss)</i>	Overespressa in argentina	82/3
4	Argentina	37-50	5.0	Aptoglobina gi I 11095751 <i>(Oncorhynchus mykiss)</i>	Overespressa in argentina	71/3
5	Argentina	50-75	4.0	Non identificata		
6	Argentina	50-75	5.5	Fibrinogeno gi I 47086505 <i>(Danio rerio)</i>	Overespressa in argentina	49/1
7	Argentina	75	5.5	Non identificata		
8	Argentina	75-100	5.5	Fibrinogeno Ig I 47086505 <i>(Danio rerio)</i>	Overespressa in argentina	34/1
9	Argentina	75	5.5	Non identificata		
10	Argentina	75	5.5	Immunoglobina gi I 161015992 <i>(Anguilla anguilla)</i>	Overespressa in argentina	154/5
11	Argentina	75	5.5	Non identificata		
12	Argentina	75	5.5	Transferrina gi I 33113484 <i>(Pagrus major)</i>	Overespressa in argentina	81/4
13	Argentina	75	5.5	Transferrina	Overespressa	69/3

				gi I 33113484 (<i>Pagrus major</i>)	in argentina	
14	Argentina	75	5.5	Apolipoproteina gi I 327342994 (<i>Anguilla japonica</i>)	Overespressa in argentina	124/3

Nonostante l'alto potere di risoluzione dello strumento, non è stato possibile identificare tutti gli spot prelevati, visto che un limite a questo tipo di analisi è dato da alcune caratteristiche delle proteine stesse: proteine poco abbondanti e/o non presenti nei database utilizzati.

5 – DISCUSSIONE

Apolipoproteine

Nel plasma i lipidi sono trasportati all'interno di particelle quasi sferiche denominate lipoproteine, dove si associano a proteine idrofiliche chiamate apolipoproteine (apo). Queste ultime sono componenti strutturali delle lipoproteine come (apoA-I e apoA-II). Le apolipoproteine possono inoltre agire da attivatori o inibitori di enzimi (apoA-I) o sistemi di trasporto (apoA-IV).

I lipidi meno idrofobici come i fosfolipidi (PL) e il colesterolo libero (FC) formano lo scheletro esterno delle lipoproteine mentre i lipidi con elevata idrofobicità, colesterolo esterificato (CE) e trigliceridi (TG) formano il core delle particelle. Sulla base della loro densità, diametro, composizione e mobilità elettroforetica, le lipoproteine possono essere suddivise in alcune classi principali. I chilomicroni, le lipoproteine di maggiori dimensioni, sono costituite principalmente da trigliceridi e sono presenti nel plasma solo nella fase postdiale. Le apo presenti in queste lipoproteine sono principalmente apoA-I oltre a piccole quantità di apoA-II e A-IV. Le lipoproteine a bassissima densità (VLDL) sono lipoproteine ricche in trigliceridi. Le lipoproteine a bassa densità (LDL) sono più piccole delle VLDL e possiedono un rapporto componente proteica/lipidica più elevato. Le lipoproteine ad alta densità (HDL) sono le più piccole e pesanti. Circa il 45% è costituito da apo nelle seguenti proporzioni: 65% apoA-I; 23% apoA-II; 3% apoA-IV. Il destino dei lipidi nel plasma segue tre vie principali, la prima detta anche via esogena rende conto del metabolismo dei lipidi introdotti con la dieta ed è legata all'azione dei chilomicroni, la seconda ha inizio con la secrezione di VLDL da parte del fegato, la terza definita trasporto inverso del colesterolo catalizza il ritorno del colesterolo al

fegato. Sia la via esogena che quella endogena contribuiscono ai livelli di lipidi circolanti (Heeren *et al.*, 2001).

Le apolipoproteine, componenti proteici delle lipoproteine, svolgono un ruolo importante nel trasporto di lipidi e altre molecole idrofobiche nel sangue. I pesci utilizzano i lipidi come fonte principale di energia, a differenza dei mammiferi che usano principalmente carboidrati. Il metabolismo lipidico e quindi la fisiologia delle lipoproteine sono più importanti per il mantenimento dell'omeostasi nei pesci rispetto agli animali omeotermi.

L'apolipoproteina AI è la proteina principale delle lipoproteine ad alta densità (HDL); essa promuove il flusso del colesterolo dai tessuti al fegato ed è un cofattore per la lecitina. L'enzima colesterolo acil-transferasi è responsabile della formazione di esteri del colesterolo plasmatico. La presenza di un enzima lecitina colesterolo acil transferasi con cofattore apo-AI, che costituisce il suo coenzima, consente la funzione di trasporto di un acido grasso dalla lecitina, un fosfolipide, al colesterolo per l'esterificazione.

Studi clinici ed epidemiologici hanno dimostrato una correlazione inversa tra la concentrazione di lipoproteine ad alta densità per il colesterolo e malattie cardiovascolari (Criqui *et al.*, 1998). Nei pesci, la funzione dell'apoA-I è anche quella di proteina antibatterica e antimicrobica (Johnson *et al.*, 2008). Pertanto, la struttura e le funzioni di apoA-I sono molto importanti per la comprensione della fisiologia dei pesci.

Le apolipoproteine presenti nella trota iridea *Oncorhynchus mykiss* rappresentano il 36% delle proteine plasmatiche totali, rispetto al 10% riscontrato nel sangue dei mammiferi.

Le lipoproteine ad alta densità dei pesci contengono due componenti principali chiamati apoA-I e apoA-II. Il primo è quello più abbondante, raggiungendo 12 mg/ml nella trota iridea, che è quasi nove volte superiore a quella di HDL umana, stimata a 1.3 mg/ml.

L'apoA-II della trota iridea rappresenta il 33% del totale delle apolipoproteine nell'HDL, mentre apoA-I rappresenta il 65%. Gli studi sui recettori delle lipoproteine sulla trota iridea *Oncorhynchus mykiss* (Prat *et al.*, 1998) e sul salmone argentato *O. kisutch* (Luckenbach *et al.*, 2008) hanno suggerito che il recettore somatico lipoproteico sia coinvolto nella diffusione delle diverse lipoproteine ed sia già presente durante la fase previtellogena.

Il peso molecolare (Mw) di apoA-I varia tra i 25 e i 29 kDa nei vertebrati, compresi i pesci (Ando *et al.*, 2005). Tra le principali lipoproteine, lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), lipoproteine a bassa densità (LDL) e lipoproteine ad alta densità (HDL), sono state isolate dal plasma di anguilla giapponese, *Anguilla japonica*.

L'HDL consisteva di apolipoproteine con Mw di 28 kDa e 14 kDa, mentre apoB aveva un peso molecolare superiore ai 200 kDa.

L'anguilla giapponese, *Anguilla japonica*, presenta nel plasma due importanti apolipoproteine che in base alle loro masse molecolari di 14 kDa e 28 kDa sono state classificate rispettivamente come apoA-II e apoA-I (Kondo *et al.*, 2001).

Esperimenti condotti *in vitro* sull'anguilla hanno mostrato un aumento dei livelli di LPL con trattamento di 11-ketotestosterone suggerendo che LPL ovarico è direttamente coinvolto nella diffusione di lipidi sotto controllo regolamentato dall'11-KT.

Nei nostri esperimenti abbiamo identificato due diverse isoforme di Apolipoproteina, l'una più espressa nell'anguilla argentina (apolipoproteina IA-II1), l'altra più espressa nell'anguilla gialla (apolipoproteina di 28 KDa).

La fase continentale del ciclo di vita dell'anguilla europea può essere considerata come una fase di alimentazione col fine di raggiungere le riserve lipidiche necessarie per la migrazione. La mobilitazione dei lipidi è legata alla migrazione e il nuoto può essere l'innescò naturale per questo processo. Infatti, è probabile che la lipolisi si attivi durante e grazie al nuoto sostenuto. Questa modificazione dell'assetto lipoproteico nella maturazione dell'anguilla potrebbe essere in relazione con il forte accumulo di lipidi che avviene nelle anguille gialle, che si preparano ad una lunga nuotata in condizioni di digiuno. Questi risultati indicano che un elevato livello di mobilitazione dei lipidi indotto dal nuoto è necessario non solo per la migrazione, ma anche per una naturale incorporazione di goccioline lipidiche negli oociti. Le lipoproteine lipasiche (LPL) possono svolgere un ruolo importante nella facilitazione del trasporto lipidico attraverso le membrane biologiche e nell'assorbimento dei lipidi associato con la crescita secondaria degli ovociti. Nelle anguille argentine, infatti, sono presenti ovociti di grandi dimensioni contenenti una grande quantità di gocce lipidiche. La quantità di gocce lipidiche fornisce le riserve necessarie per la riproduzione.

Warm Temperature acclimation

Quando un animale è sottoposto a temperature molto basse, è possibile la formazione di cristalli di ghiaccio che crescendo rapidamente danneggiano i tessuti. I cristalli si formano su nuclei di accrescimento nei fluidi extra ed intracellulari. Per evitare questi danni è necessario che i cristalli crescano lentamente anche a temperatura al di sotto del punto di congelamento.

Fino ad ora sono stati scoperti cinque tipi di proteine antigelo (Anti Freeze Protein, AFP) tra cui AFP III e AFP IV.

Il tipo III che ha un peso molecolare che varia tra i 7 kDa e i 14 kDa è presente nell'anguilla artica, *Pachycara brachycephalum*. Il tipo IV, invece, ha un peso molecolare di circa 15 kDa e il suo precursore/omologo è un'apolipoproteina. Le proteine antigelo che interferiscono con la cristallizzazione del ghiaccio nei tessuti, sono prodotte dal fegato e secrete nel sangue; circondano i piccoli cristalli di ghiaccio impedendone la crescita.

La temperatura dell'acqua è uno dei fattori ambientali più importanti che influenzano la fisiologia e il comportamento degli animali, compresi i pesci (Hirayama *et al.*, 2004). Le diverse risposte fisiologiche compensano le variazioni di temperatura (Johnston *et al.*, 2002).

La risposta più significativa dell'acclimatazione è stata osservata nei pesci come carpe e pesci gatto, i quali possono sopravvivere in una vasta gamma di temperature che vanno da un range di circa 0°C ad oltre 30°C. Un adattamento di questo tipo richiede significativi cambiamenti dell'espressione fisiologica.

In particolare, il livello di espressione di alcuni geni come quello relativo alla proteina Wap65, sono stati segnalati per essere regolati per adattarsi alle variazioni di temperatura (Watabe, 2002). Wap65 è stato inizialmente identificata nei pesci rossi e successivamente anche nelle carpe e nei pesci palla.

In studi recenti è stato possibile identificare due geni Wap65 del pesce gatto e analizzare la loro espressione a seconda della variazione della temperatura e a fronte di infezioni batteriche.

Inoltre è stato dimostrato, per la prima volta, che il gene per Wap65 non è solo regolato dalla temperatura, ma anche da stimoli immunitari.

I geni Wap65 del pesce gatto sono strutturalmente simili alla famiglia della emopossina, glicoproteina plasmatica sintetizzata nel fegato e presente nei mammiferi.

In alcune specie di mammiferi, l'emopossina impedisce il danno ossidativo dei tessuti. Sono stati determinati i pattern di espressione di due geni Wap65. Wap65-1 è stata espressa in una vasta gamma di tessuti, mentre Wap65-2 era specifico del fegato. Inoltre, Wap65-2 è un gene a singola copia, mentre Wap65-1 ha quattro copie nel genoma del pesce gatto. In relazione ad un livello maggiore di conservazione della sequenza, il pattern di espressione di Wap65-2 è più simile a quello dell'emopossina. Wap65-2 potrebbe essere più importante nella risposta immunitaria e in caso di una variazione della temperatura.

Il meccanismo di come tali stimoli molto diversi tra loro causino questa induzione genica è ancora sconosciuta, ma certamente di grande interesse per ulteriori studi relativi alla risposta immunitaria, così come il ruolo che gioca Wap65-2 come proteina di acclimatazione alla temperatura calda.

La Wap da 65 KDa è fortemente overespressa nelle gialle, ma presente anche nelle argentine. La forte overespressione di questa proteina in un lunghissimo treno di spot nelle anguille gialle, che non devono affrontare situazioni estreme né dal punto di vista delle temperature, né da quello immunitario, lascia supporre che questa proteina possa avere anche altre funzioni, probabilmente non ancora definite.

Transferrina

Il ferro è un elemento essenziale per la formazione del pigmento dei globuli rossi e quindi per il trasporto dell'ossigeno a tutti i tessuti del corpo.

Il ferro è presente nell'organismo sotto diverse forme (la principale è il ferro emoglobinico, che costituisce il 65% del totale: ogni molecola di emoglobina può contenere fino a 4 atomi di ferro, ognuno veicolante un atomo di ossigeno) e viene trasportato dal plasma agli organi di deposito tramite la transferrina. La transferrina è la principale proteina di trasporto del ferro nel sangue. Si tratta di una glicoproteina costituita da una singola catena polipeptidica di 78 kDa che possiede due siti di legame per lo ione ferrico (Fe^{3+}), mentre non presenta affinità per lo ione ferroso (Fe^{2+}).

Normalmente nel sangue 1/9 di tutta la transferrina è saturata in entrambi i siti di legame, i 4/9 in uno dei due siti e i restanti 4/9 presentano siti insaturi.

Questa porzione di transferrina insatura è fondamentale per il contrasto delle infezioni e la cattura del ferro libero.

L'affinità della proteina per lo ione ferrico è infatti altissima, tanto che è la proteina conosciuta con maggiore affinità per il suo ligando. Così, in caso di eccesso di transferrina si può assumere che non vi siano ioni ferrici liberi.

I livelli ematici sono regolati dalla disponibilità di ferro, cioè in condizioni di carenza di ferro si ha un aumento delle concentrazioni plasmatiche di transferrina mentre dopo somministrazione di ferro ritorna a livelli normali. In condizioni normali la transferrina è saturata al 50%. Essa è inoltre una molecola eterogenea, si possono avere variazioni genetiche dovute alla sostituzione di uno o più aminoacidi oppure la presenza e la composizione delle due catene oligosaccaridiche N-glicate o differenze sul contenuto di ferro, apotransferrina, transferrina monoferrica, transferrina diferrica.

Il legame di uno ione ferrico nel sito di legame è dipendente dalla sua associazione con uno ione carbonato (CO_3^{2-}).

La transferrina è internalizzata da recettori per la transferrina, delle proteine del peso molecolare di 90 kDa sulla membrana plasmatica di alcune cellule che legano transferrina semi-satura oppure, preferibilmente, satura in entrambi i siti di legame del ferro.

Affinché la transferrina sia internalizzata, un complesso calmodulina-proteina chinasi (C-Ca²⁺) deve fosforilare il recettore. Dopo la fosforilazione, il complesso transferrina-recettore per la transferrina è internalizzato in lisosomi, dove il ferro è liberato sotto forma di Fe²⁺ a causa dell'ambiente acido. Il complesso transferrina-recettore per la transferrina è poi riportato nella membrana plasmatica, quindi la transferrina, insatura, è rilasciata nel plasma. La transferrina è sintetizzata prevalentemente a livello epatico. Nei pesci, la vitamina C interviene nel metabolismo del ferro per convertire la transferrina dalla forma ossidata alla forma ridotta, nel metabolismo della tirosina e nella conversione dell'acido folico in folinico.

Nei nostri campioni, il treno di spot relativo alla transferrina è decisamente più evidente nelle anguille argentine.

Anche in questo caso non è difficile mettere in relazione gli aumentati livelli di transferrina nell'anguilla argentina con un alterato metabolismo del ferro che potrebbe essere legato ad un aumentata richiesta di apporto di ossigeno ai tessuti durante la lunga migrazione riproduttiva che questi animali si preparano ad affrontare. Complessivamente l'efficienza metabolica è influenzata dall'efficienza dei processi di respirazione e conversione energetica. La prestazione locomotoria dell'intero organismo è determinata dal consumo di ossigeno (tasso metabolico di routine).

Fibrinogeno

Il fibrinogeno è una glicoproteina del plasma sanguigno sintetizzata dal fegato e dal tessuto endoteliale. Il suo ruolo è essenziale nella coagulazione del sangue. Il fibrinogeno è il precursore della fibrina, presente nel plasma sanguigno sotto forma di molecole proteiche.

La molecola del fibrinogeno è composta a sua volta da tre catene più semplici di aminoacidi, indicate rispettivamente come A-alfa, B-beta, gamma. Le tre catene sono poste l'una vicina all'altra, con una struttura approssimativamente lineare. Due triplette di catene si uniscono per la regione amino-terminale per formare un'unica molecola di fibrinogeno. La struttura della molecola di fibrinogeno è allungata e presenta tre nodi: uno centrale, detto regione E, che contiene le estremità amino-terminali delle catene, e due laterali, dette D.

L'espressione del fibrinogeno diminuisce in modo significativo nel plasma di anguille gialle. Allo stato attuale delle conoscenze, è difficile correlare questo dato con la fisiologia dell'anguilla.

Immunoglobuline

Le immunoglobuline (Ig) condividono una struttura di base formata da 2 catene pesanti e 2 catene leggere. Nei teleostei, sono stati identificati cinque isotipi di geni della catena pesante delle immunoglobuline.

La massima abbondanza di trascritti IgM della catena pesante è stata trovata nel rene, seguito dalla milza, dal fegato e dalle branchie in esemplari di anguilla europea, *Anguilla anguilla*. Scarsa abbondanza, invece, è stata rilevata nel muscolo cardiaco.

La cinetica della risposta umorale nei pesci ossei è stata ampiamente studiata (Rijkers, 1982).

Nelle risposte secondarie dei pesci, l'aumento dell'affinità anticorpale è molto limitato, paragonato a quello dei mammiferi (Kaattari, 1992). Le IgM sono considerate la sola classe di immunoglobuline universalmente presenti in tutti i vertebrati mandibolati (Bengtén *et al.*, 2000).

Studi molecolari e biochimici hanno evidenziato che le Ig dei teleostei appartengono a una sola classe (IgM simile) con un singolo tipo di catena pesante (μ) (Warr, 1995).

Tuttavia, recentemente nei pesci sono state trovate altri isotipi di IgM. Inoltre è stato dimostrato che le IgM di superficie si associano ad altre molecole per formare il complesso del "recettore specifico per l'antigene dei linfociti B" (BCR), il quale ha la funzione di attivare i linfociti B che si trasformano in plasmacellule, iniziando la secrezione di interleuchine ed immunoglobuline. Nei teleostei, la sequenza genica del BCR è stata evidenziata nel pesce gatto (MacDougall *et al.*, 1999). La comparsa di IgM citoplasmatiche e di superficie sui linfociti varia in modo considerevole tra le varie specie di teleostei. In generale la prima comparsa di linfociti B e di immunoglobuline avviene più tardi nelle specie marine rispetto a quelle di acqua dolce (Chantanachookhin *et al.*, 1991).

La struttura del recettore di membrana delle Ig è capace di attivare un secondo messaggero intracellulare in risposta al cross-linking (Van Ginkel *et al.*, 1994) con l'immunoglobulina e al legame con l'antigene.

L'eterogeneità delle catene pesanti e leggere delle Ig è stata descritta in molti teleostei, mediante l'uso di anticorpi monoclonali e antisieri policlonali, ed è stato postulato che

derivi da splicing alternativo o da differente glicosilazione di catene peptidiche (Scapigliati *et al.*, 1999).

La maggior parte di questi anticorpi monoclonali riconosce la catena pesante delle Ig, mentre solo pochi di essi sono stati sviluppati contro la catena leggera. Inoltre, è stata dimostrata la presenza delle Ig sia nelle uova che negli avannotti di alcune specie di pesci, e l'uptake delle Ig è stato studiato in dettaglio nelle uova dell'orata e della spigola (Picchietti *et al.*, 2006).

Nei nostri gel, diminuisce l'espressione di questa catena pesante immunoglobulinica nelle anguille gialle. Anche in questo caso, è difficile ipotizzare un significato fisiologico per questa alterata espressione proteica.

Aptoglobina

La funzione principale che l'aptoglobina svolge è quella di legare l'emoglobina (Hb), rilasciata durante l'emolisi, per trasportarla al fegato, così da ridurre i potenziali danni ossidativi del ferro libero e riciclarlo per l'emopoiesi. Come è noto, Hb è una proteina tetrameric (α₂β₂) contenente un anello protoporfirinico complessato con Fe²⁺(eme), che lega l'ossigeno a livello polmonare e lo porta in circolo ai vari distretti del corpo.

Se rilasciato in circolo, in caso di emolisi (elevata in seguito ad una forte infiammazione), Hb ha un'intensa attività ossidante: essa è in grado di produrre, grazie allo ione ferroso, radicali ossidrilici a partire da H₂O₂.

Il legame Hb-Hpt sembra coinvolgere solo legami non covalenti, vista l'inibizione per mezzo di polielettroliti (Rogers *et al.*, 1998).

Esso coinvolge la sola catena β di Hpt, che si lega in modo stechiometrico ad un dimero αβ di Hb, ma ne evita la deposizione a livello dei glomeruli renali: il complesso Hb-Hpt

è troppo grande, infatti, per passare o restare imprigionata attraverso le maglie del setaccio glomerulare. Il complesso Hb-Hpt, inoltre, permette la rapida rimozione del gruppo eme ad opera del fegato e, in parte, anche del midollo spinale e della milza. Dunque, Hpt, dovrebbe contribuire a prevenire danni ossidativi in circolo. Un'altra funzione di Hpt è quella di legare l'apoA-I, proteina maggioritaria delle HDL. Studi precedenti hanno dimostrato che, in seguito al legame Hpt-apoA-I, viene ridotta l'attività dell'enzima lecitina colesterolo acil trasferasi (LCAT), la cui funzione è necessaria per il normale svolgimento del trasporto inverso del colesterolo (Balestrieri *et al.*, 2001). L'aptoglobina lega l'elica 6 di apoA-I (aa 143-164) sulla sequenza che va da Leu141 ad Ala164.

Questa sequenza è coinvolta anche nell'attivazione dell'enzima; è proprio in seguito a tale competizione con LCAT, per il legame ad apoA-I, che Hpt inibisce l'enzima. Quindi, l'aumento di Hpt in circolo può avere effetti negativi sul corretto funzionamento del trasporto inverso del colesterolo (Spagnuolo *et al.*, 2005).

Nei nostri gel, diminuisce l'espressione di questa proteina nelle anguille gialle. Anche se l'aptoglobina è stata identificata come proteina collegata al funzionamento del sistema immunitario nella trota, è difficile ipotizzare un significato fisiologico per questa alterata espressione proteica. Di certo, insieme all'alterata espressione di immunoglobuline e di Wap65, sembra di capire che anche il sistema immunitario subisce un rimodellamento nella maturazione sessuale dell'anguilla.

Arginina chinasi

L'arginina chinasi (AK) è un fosfogeno monomero che gioca un ruolo critico nel metabolismo energetico.

L'omeostasi di ATP è particolarmente rilevante in quei tessuti che richiedono energia elevata come il cervello, il cuore e il muscolo scheletrico. AK catalizza la fosforilazione reversibile di arginina utilizzando il fosforo dell'ATP, con formazione di fosfoarginina.

L'aumentata espressione di questo enzima nell'anguilla gialla è molto probabilmente da mettere in relazione con il mutato metabolismo energetico. L'arginina chinasi ha infatti un importante ruolo nel mantenere fosforilati i fosfageni per la produzione rapida di molecole di ATP. utilizzate per la contrazione muscolare.

Inoltre durante la migrazione, le anguille argentine non nuotano in superficie, ma nelle profondità del mare, dove a causa delle maggiori pressioni si potrebbe avere un aumento ulteriore dell'efficienza metabolica a livello mitocondriale, aumentando l'efficienza della fosforilazione ossidativa (Theron *et al.*, 2000).

6 – CONCLUSIONI

Questa tesi riporta la prima applicazione dell'analisi proteomica allo studio delle proteine del siero di anguilla, utilizzata in particolare per il confronto tra anguille gialle ed argentine. Il nome contraddistingue due fasi diverse del ciclo di vita di *A. anguilla*; l'anguilla gialla vive e si accresce per molti anni in acque dolci o salmastre, trasformandosi poi nella anguilla argentina, che inizia la maturazione delle gonadi e nuota in mare aperto. Arrivate nelle aree riproduttive lontane anche migliaia di Km, queste anguille rilasciano i gameti e muoiono. Le anguille argentine non si nutrono per molti mesi, pur andando incontro a grandi necessità energetiche sia per la lunga migrazione che per la riproduzione. Per questo è oltremodo interessante caratterizzare le due fasi, oltre che dal punto di vista fisiologico, anche dal punto di vista biochimico e molecolare.

Le anguille oggetto dello studio sono state prelevate nella medesima laguna (Comacchio) per garantire che l'ambiente di provenienza, e quindi le caratteristiche geologiche e chimico-fisiche, e gli alimenti disponibili fossero simili. Non era intrinsecamente possibile la raccolta di campioni di dimensione ed età identiche, in quanto le anguille gialle e le anguille argentine si discostano significativamente per età e dimensione. Tutte le anguille erano comunque femmine, e nell'ambito della stessa fase del ciclo di vita, erano molto simili per dimensione e stato di differenziamento. L'elettroforesi bidimensionale ha identificato significative differenze nella espressione di proteine seriche tra i campioni prelevati dalle anguille gialle ed argentine. Le scarse conoscenze sull'ematologia e la biochimica del sangue di questi pesci, e l'assoluta novità rappresentata da questo studio di proteomica, permettono alcune correlazioni ma non certo conclusioni definitive.

E' possibile in particolare notare fra le proteine con espressione differente riconosciute, la presenza di quelle coinvolte nel metabolismo energetico (apolipoproteine, arginina chinasi) e nel trasporto dell'ossigeno (aptoglobina, transferrina). Questi due aspetti sono cruciali per l'anguilla argentina, da un lato per un utilizzo estremamente efficiente e bilanciato delle risorse nella protratta attività natatoria in assenza di cibo, e dall'altro per la necessaria disponibilità di ossigeno ai fini del metabolismo ossidativo, ben più redditizio di quello glicolitico. La proteina "warm temperature acclimation" maggiormente espressa nelle anguille gialle potrebbe essere messa in relazione alla necessità di citoprotezione rispetto alle rapide fluttuazioni di temperatura tipiche degli ambienti lagunari o delle acque interne, in cui invece non incorrono le anguille in mare, molto stabile dal punto di vista termico. E' impossibile al momento correlare all'una o all'altra fase le differenze nella espressione di fibrinogeno e della catena pesante delle immunoglobuline, l'una correlata alla coagulazione del sangue e l'altra alla risposta immunitaria.

Indubbiamente lo studio non è conclusivo, ma da esso emergono suggerimenti importanti per approfondimenti futuri.

7 – BIBLIOGRAFIA

- Aarestrup K., Thorstad E.B., Koed A., Svendsen J.C., Jepsen N., Pedersen I.M., Okland F. (2010). Survival and progression rates of large European silver eel *Anguilla anguilla* in late freshwater and early marine phases. *Aquatic Biology*, **9**: 263-270.
- Adachi S., Ijiri S., Kazeto Y., Yamauchi K. (2003). Oogenesis in the Japanese Eel, *Anguilla japonica*. In: Aida K., Tsukamoto K., Yamauchi K., (eds) Eel biology. Springer, Tokyo, pp. 502-518.
- Ando S., Tachibana A., Yamada S., Kishimura H. (2005). Apolipoprotein complexity in Japanese eel *Anguilla japonica*: truncated apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-I-like protein in plasma lipoproteins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **69**: 2258-2262.
- Aroua S., Schmitz M., Baloche S., Vidal B., Rousseau K., Dufour S. (2005). Endocrine evidence that silvering, a secondary metamorphosis in the eel, is a pubertal rather a metamorphic event. *Neuroendocrinology*, **82**: 221-232.
- Astrom M., Dekker W. (2007). When will the eel recover? A full life-cycle model. *Ices Journal of Marine Science*, **64** (7): 1491-1498.
- Baker B.I., Ingleton P.M. (1975). Secretion of prolactin and growth hormone by teleost pituitaries *in vitro*. Effect of salt concentration during long-term organs culture. *Journal of Comparative Physiology*, **100**: 269-282.

- Balestrieri M., Cigliano L., De Simone M.L., Dale B., Abrescia P. (2001). Haptoglobin inhibits Lecithin-Cholesterol Acyltransferase in human ovarian follicular fluid. *Molecular Reproduction and Development*, **59**: 186-191.
- Barni S., Bernocchi G., Gerzeli G. (1985). Morphohistochemical changes during the life cycle of the European eel. *Tissue Cells*, **17**: 97-109.
- Bayne C.J., Gerwick L., Fujiki K., Nakao M., Yano T. (2001). Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**: 205-217.
- Beaulaton L., Briand C. (2007). Effect of management measures on glass eel escapement. *Ices Journal of Marine Science*, **64** (7): 1402-1413.
- Bengten E., Wilson M., Miller N., Clem L.W., Pilstrom L., Warr G.W. (2000). Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **248**: 189-219.
- Bertin L. (1951). Les anguilles. Variation, Croissance, Euryhalinité, Toxicité, Hermaphrodisme Juvenile et Sexualité, Migrations, Métamorphoses. Paris: Payot.
- Boetius I., Larsen L.O. (1991). Effects of testosterone on eye size and spermiation in silver eels, *Anguilla anguilla*. *General and Comparative Endocrinology*, **82**: 238.

- Braekevelt C.R. (1985). Retinal fine structure in the European eel *Anguilla anguilla*. IV. Photoreceptors of the yellow eel stage. *Anatomischer Anzeiger*, **158**: 23-32.
- Burgerhout E., Manabe R., Brittijn S.A., Aoyama J., Tsukamoto K., van den Thillart G.E. (2011). Dramatic effect of pop-up satellite tags on eel swimming. *Naturwissenschaften*, **98** (7): 631-634.
- Callamand O., Fontaine M. (1942). L'activité thyroïdienne de l'anguille au cours de son développement. Springer, **82**: 129-136.
- Carlisle D.B., Denton E.J. (1959). On the metamorphosis of the visual pigments of *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of The Marine Biological Association of The United Kingdom*, **38**: 97-102.
- Carrieri A., Cavallini G., Plazzi M., Rossi R. (1992). Struttura della popolazione di anguille gialle e argentine (*Anguilla anguilla*) nelle Valli di Comacchio (biennio 1989-1990).
- Castonguay M., Dutil J.D., Audet C., Miller R. (1990). Locomotor activity and concentration of thyroid hormones in migratory and sedentary juvenile American eels. *Transactions of the American Fisheries Society*, **119**: 946-956.
- Chantanachookhin C., Seikai T., Tanaka M. (1991). Comparative study on the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Acquaculture*, **99**: 143-156.

- Ciccotti E., Busilacchi S., Cataudella S. (2000). Eel, *Anguilla anguilla* (L.), in Italy: recruitment, fisheries and aquaculture. *Dana*, **12**: 7-15
- CITES (2008). A Brief Introduction to the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: appendices I, II and III. United Nations Environmental Programme.
- 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.
- Cottrill R.A., McKinley R.S., Van der Kraak G., Dutil J.D., Reid K.B., McGrath K.J. (2001). Plasma non-esterified fatty acid profiles and 17 β -estradiol levels of juvenile immature and maturing adult American eels in the St. Lawrence River. *Journal of Fish Biology*, **59**: 364-379.
- Couillard C.M., Hodson P.V., Castonquay M. (1997). Correlation between pathological changes and chemical contamination in American eels, *Anguilla rostrata*, from the St. Lawrence River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**: 1916-1927.
- Criqui M.H., Kinosian B., Glick H., Deedwania P.C., Krauss R.M. (1998). The American College of Physicians guidelines for screening blood cholesterol levels: a commentary. *American Journal of Medicine*, **105**: 75-76.

- Cullen P., McCarthy T.K. (2003). Hydrometric and meteorological factors affecting the seaward migration of silver eels (*Anguilla anguilla*, L.) in the lower River Shannon. *Environmental Biology of Fishes*, **67**: 349-357.
- Dave G., Johansson M.L., Larsson A., Lewander K., Lidman U. (1974). Metabolic and haematological studies on the yellow and silver phases of the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). Fatty acid composition. *Comparative Physiology and Biochemistry*, **47** (B): 583-591.
- Dekker W. (2003). Eel stocks dangerously close to collapse. ICES newsletter, **40**: 10-11.
- De Jesus E.G., Hirano T., Inui Y. (1992). Gonadal steroids delay spontaneous flounder metamorphosis and inhibit T3-induced fin ray shortening *in vitro*. *Zoological Science*, **9**: 633-638.
- Dannewitz J., Maes G.E., Johansson L., Wickstrom H., Volckaert F.A.M., Jarvi T. (2005). Panmixia in the European eel: a matter of time. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, **272**: 1129-1137.
- Davey J.H., Donald J.J. (2005). Sex determination in freshwater eels and management options for manipulation of sex. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **15**: 37-52.
- Desaunay Y., Guerault D. (1997). Seasonal and long-term changes in biometrics of eel larvae: a possible relationships between recruitment variation and North Atlantic ecosystems productivity. *Journal of Fish Biology*, **51**: 317-339.

- Dufour S., Burzawa-Gerard E., Le Belle N., Sbaihi M., Vidal B. (2003). Reproductive endocrinology of the European eel, *Anguilla anguilla*. In: Aida K., Tsukamoto K., Yamauchi K., (eds) Eel biology. Springer, Tokyo, pp. 373-386.
- Duguay S.J., Lai-Zhang J., Streiner D.F., Funkenstein B., Chan S.J. (1996). Developmental and tissue-regulated expression of IGF-I and IGF-II mRNA in *Sparus aurata*. *Journal of Molecular Endocrinology*, **16**: 123-132.
- Durif C., Guibert A., Elie P. (2009). Morphological discrimination of the silvering stages of the European eel. *American Fisheries Society Symposium*, **58**: 103-111.
- Edeline E., Dufour S., Briand C., Fatin D., Elie P. (2004). Thyroid status is related to migratory behaviour in *Anguilla anguilla* glass eels. *Marine Ecology Progress Series*, **282**: 261-270.
- Endo T., Todo T., Lokman P.M., Ijiri S., Adachi S., Yamauchi K. (2008). *In vitro* induction of oil droplet accumulation into previtellogenic oocytes of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Cybium*, **32**: 239-240.
- Feunteun E.E. (2002). Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain. *Ecological Engineering*, **18** (5): 575-591.
- Fontaine M. (1975). Physiological mechanisms in the migration of marine and amphihaline fish. *Advanced Marine Biology*, **13**: 241-355.

- Fulton T.W., (1904). The rate of growth of fishes. *22nd Annual Report of the Fishery Board of Scotland*, **3**:141-241.
- Fricke H., Kaese R. (1995). Tracking of artificially matured eels (*Anguilla anguilla*) in the Sargasso Sea and the problem of the Eel's Spawning Site. *Naturwissenschaften*, **82**: 32-36.
- Gelli F., Savorelli F., Holthaus K. (2011). Uno studio sulla riproduzione delle anguille. *Ecoscienza*, **4**: 84-85.
- Haenen O.L.M., Lehmann J., Engelsma M.Y., Sturenberg F.J., Roozenburg I., Kerkhoff S., Breteler J.K. (2010). The health status of European silver eels, *Anguilla anguilla*, in the Dutch River Rhine Watershed and Lake IJsselmeer. *Aquaculture*, **309**: 15-24.
- Han Y.S., Liao I.C., Tzeng W.N., Huang Y.S., Yu J.Y.L. (2003). Serum estradiol-17B and testosterone levels during silvering in wild Japanese eel *Anguilla Japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **136** (B): 913-920.
- Hansen L.P., Jonsson B. (1985). Downstream migration of hatchery-reared smolts of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the river Imsa, Norway. *Aquaculture*, **45**: 237-248.
- Hara A., Yamauchi K., Hirai H., (1980). Studies on female specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comparative Physiology and Biochemistry*, **65** (B): 315-320.

- Heeren J., Beisiegel U. (2001). Intracellular metabolism of triglycerides-rich lipoproteins. *Current Opinion in Lipidology*, **12**: 255- 260.
- Hirayama M., Kobiyama A., Kinoshita S., Watabe S. (2004). The occurrence of two types of hemopexin-like protein in medaka and differences in their affinity to heme. *Journal of Experimental Biology*, **207**: 1387–1398.
- Huang Y., Rousseau K., Sbaihi M., Le Belle N., Schmitz M., Dufour S. (1999). Cortisol selectively stimulates pituitary gonadotropin B-subunit in a primitive teleost, *Anguilla Anguilla*. *Endocrinology*, **130**: 1228-1235.
- ICES (2002). ICES CM 2002/ACFM: 03. Report of the ICES/EIFAC Working Group on Eels.
- ICES (2006). ICES CM 2006/ACFM: 16 Ref. DFC, LRC, RMC. *Report of the 2006 session of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels*.
- Inui Y., Miwa S. (1985). Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae. *General and Comparative Endocrinology*, **60**: 450-454.
- Jegstrup I.M., Rosenkilde P. (2003). Regulation of post-larval development in the European eel: thyroid hormone level, progress of pigmentation and changes in behaviour. *Journal of Fish Biology*, **63**: 168-175.
- Jeng S.R., Yueh W.S., Chen G.R., Lee Y.H., Dufour S., Chang C.F. (2007). Differential expression and regulation of gonadotropins and their receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *General and Comparative Endocrinology*, **154**: 161-173.

- Johnson L.D., Brown G., Gauthier D., Reece K., Kator H., Van Veld P. (2008). Apolipoprotein A-I from striped bass (*Morone saxatilis*) demonstrates antibacterial activity in vitro, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **151** (B): 167-175.
- Johnston I.A., Temple G.K. (2002). Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour. *Journal of Experimental Biology*, **205**: 2305–2322.
- Kaattari S.L. (1992). Fish B lymphocytes: Defining their form and function. *Annual Review Fish Diseases*, **161**: 80.
- Kirk R.S. (2003). The impact of *Anguillicola crassus* on European eels. *Fisheries Management Ecology*, **10**: 385-394.
- Kleckner R.C., McCleave J.D. (1988). The northern limit of spawning by Atlantic eels (*Anguilla spp.*) in the Sargasso Sea in relation to the thermal fronts and surface water masses. *Journal of Marine Research*, **46**: 647-667.
- Kondo H., Kawazoe I., Nakaya M., Kikuchi K., Aida K., Watabe S. (2011). The novel sequences of major plasma apolipoproteins in the eel *Anguilla japonica*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1531**: 132-142.
- Koops H., Hartmann F. (1989). *Anguillicola* infestations in Germany and in German eel imports. *Journal of Applied Ichthyology*, **5**: 41-45.

- Lecomte-Finiger R. (1992). Growth history and age recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure. *Marine Biology*, **114**: 205-210.
- Lewander K., Dave G., Johansson M.L., Larsson A., Lidman U. (1974). Metabolic and hematological studies on the yellow and silver phases of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **47** (B): 571-581.
- Lokman P.M., Rohr D.H., Davie P.S., Young G. (2003). The physiology of silvering in anguillid eels: androgens and control of metamorphosis from the yellow to silver stage. In: Aida K., Tsukamoto K., Yamauchi K., (eds) *Eel biology*. Springer, Tokyo, pp. 331-350.
- Lopez E., Fontaine Y.A. (1990). Stimulation hormonale *in vivo* de l'ovaire d'anguille européenne au stade jaune. *Reproduction Nutrition Development*, **30**: 577-582.
- Luckenbach J.A., Iliev D.B., Goetz F.W., Swanson P. (2008). Identification of differentially expressed ovarian genes during primary and early secondary oocyte growth in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **6**: 2.
- Lythgoe J.N. (1979). *The Ecology of Vision*. Oxford: Clarendon Press.

- MacDougal K.C., Mericko P.A., Burnett K.G. (1999). Antigen receptor-mediated activation of extracellular related kinase (ERK) in B lymphocytes of teleost fishes. *Developmental and Comparative Immunology*, **23**: 221-230.
- Marchelidon J., Le Belle N., Hardy A., Vidal B., Sbaihi M., Burzawa-Gérard E., Scmitz M., Dufour S. (1999). Etude des variations de paramètres anatomiques et endocriniens chez l'anguille européenne (*Anguilla Anguilla*) femelle, sédentaire et d'avalaison: application à la caractérisation du stade argenté. *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture*, **355**: 349-368.
- McCleave J.D., Wippelhauser G.S. (1987). Behavioral aspects of selective tidal stream transport in juvenile American eels (*Anguilla rostrata*). *American Fisheries Society Symposium*, **1**: 138-150.
- Miwa S., Inui Y. (1987). Effects of various doses of thyroxine and triiodothyronine on the metamorphosis of flounder (*Paralichthys olivaceus*). *General and Comparative Endocrinology*, **67**: 356-363.
- Mommsen T.P., Vijayan M.M., Moon T.W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **9**: 211-268.
- Murr E., Sklower A. (1928). Untersuchungen über die inkretorischen Organe der Fische. Das Verhalten der Schilddrüse in der Metamorphose des Aales. *Physiology*, **7**: 279-288.

- Nader M.R., Miura T., Ando N., Miura C., Yamauchi K. (1999). Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, *in vitro*. *Biology of Reproduction*, **61**: 944-947.
- Okada N., Tanaka M., Tagawa M. (2003). Bone development during metamorphosis of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): differential responses to thyroid hormone. In The Big Fish Bang. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference (Browman HI and Skitftesvik AB. Eds). Bergen: Institute of Marine Research, 11 pp.
- Okamura A., Yamanda Y., Mikawa N., Tanaka S., Oka H.P. (2002). Exotic silver eels *Anguilla anguilla* in Japanese waters: seaward migration and environmental factors. *Aquatic Living Resources*, **15**: 335-341.
- Okuzawa K. (2002). Puberty in teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*, **26**: 31-41.
- Palm S., Dannewitz, J., Prestegard, T., Wickström H. (2009). Panmixia in European eel revisited: no genetic difference between maturing adults from southern and northern Europe. *Heredity*, **103**: 82-89.
- Palstra A.P., Van Ginneken V.J.T., Murk A. J., Van Den Thillart G.E.E.J.M. (2006). Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften*, **93** (3): 145-148.

- 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). *Canadian Journal of Zoology*, **62** (6): 1143-1149.
- Picchietti S., Abelli L., Buonocore F., Randelli E., Fausto A.M., Scapigliati G. (2006). Immunoglobulin protein and gene transcripts in sea bream (*Sparus aurata* L.) oocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, **20**: 398-404.
- Prat F., Coward K., Sumpter J.P., Tyler C.R. (1998). Molecular characterization and expression of two ovarian lipoprotein receptors in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biology of Reproduction*, **58**: 1146-1153.
- Pujolar, J.M., de Leon G.A., Ciccotti E., Zane L. (2009). Genetic composition of Atlantic and Mediterranean recruits of European eel *Anguilla anguilla* based on EST-linked microsatellite loci. *Journal of Fish Biology*, **74**: 2034-2046.
- Rijkers G.T. (1982). Kinetics of humoral and cellular immune reactions in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, **2**: 93-100.
- Rogers D.P., Roberts L.M., Lebowitz J., Datta G., Anantharamaiah G.M., Engler L.A., Brouillette C.G. (1998). The lipid-free structure of apolipoprotein A-1: effects of amino-terminal deletions. *Biochemistry*, **37**: 11714-11725.
- Salem M., Kenney P.B., Rexroad C.E., Yao J. (2006). Micro-array gene expression analysis in atrophying rainbow trout muscle: a unique nonmammalian muscle degradation model. *Physiology Genomics*, **28**: 33-45.

- Sbaihi M., Kacem A., Aroua S., Baloché S., Rousseau K., Lopez E., Meunier F., Dufour S. (2007). Thyroid hormone-induced demineralization of the vertebral skeleton of the eel, *Anguilla anguilla*. *General and Comparative Endocrinology*, **151**: 98-107.
- Scapigliati G., Romano N., Abelli L. (1999). Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B- lymphocytes. *Aquaculture*, **172**: 3-28.
- Schmidt J. (1923). Breeding places and migration of the eel. *Nature*, **111**: 51-54.
- Sinha V.P.R., Jones J.W. (1975). *The European Freshwater Eel*. Liverpool: Liverpool University Press.
- Soffientino B., Specker J.L. (2001). Metamorphosis of summer flounder, *Paralichthys dentatus*: cell proliferation and differentiation of the gastric mucosa and developmental effects of altered thyroidal status. *Journal of Experimental Zoology*, **290**: 31-40.
- Székely C.S., Molnár K., Rácz O. (2004). Radiodiagnostic method for studying the dynamics of *Anguillicola crassus* (Nematoda: Dracunculoidea) infection and pathological status of the swimbladder in Lake Balaton eels. *Diseases of Aquatic Organisms*, **64** (1): 723-732.

- Spagnuolo M.S., Cigliano L., D'Andrea L., Pedone C., Abrescia P. (2005). Assignment of the binding site for haptoglobin on apolipoprotein A-1. *Journal of Biological Chemistry*, **280**: 1193-1198.
- Spies R.B., Rice D.W., Felton J.H. (1988). Effects of organic contaminants on reproduction of the starry flounder *Platichthys stellatus*, in San Francisco Bay. Reproductive success of fish captured in San Francisco Bay and spawned in the laboratory. *Marine Biology*, **98**: 191-200.
- Tagawa M., Miwa S., Inui Y., De Jesus E.G., Hirano T. (1990). Changes in thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis of the flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zoological Science*, **7**: 93-96.
- Tesch F.W. (2003). The eel. Blackwell Science, Oxford (UK): 1-408.
- Theron M., Guerrero F., Sébert P. (2000). Improvement in the efficiency of oxidative phosphorylation in the freshwater eel acclimated to 10.1 MPa hydrostatic pressure. *Journal of Experimental Biology*, **203**: 3019-3023.
- Tortonese E. (1975). Fauna D'Italia – Osteichthyes. Calderini Editore (Bologna), vol. X (1970), pp. 307-315 e vol. XI (1975): p. 636.
- Tsukamoto K. (2009). Oceanic migration and spawning of anguillid eels. *Journal of Fish Biology*, **74**: 1833-1852.
- Usui A. (1991). Eel culture. Blackwell Scientific Publications Ltd, London.

- Videler J.J. (1993). Fish swimming. Chapman & Hall, London.
- Vilter V. (1946). Action de la thyroxine sur la metamorphose larvaire de l'Anguille. *CR Seances de la Societe de Biologie et des Ses Filiales*, **140**: 783-785.
- Vincent J.T. van Ginneken, Guido E.E.J.M van den Thillart (2000). Physiology: Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature*, **403**: 156-157.
- Vollestad L.A., Jonsson B., Hvidsten N.A., Naesje T.F. (1994). Experimental test of environmental factors influencing the seaward migration of European silver eels. *Journal of Fish Biology*, **45**: 641-651.
- Warr G.W. (1995). The immunoglobulin genes of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, **19**: 1-12.
- Watabe S. (2002). Temperature plasticity of contractile proteins in fish muscle. *Journal of Experimental Biology*, **205**: 2231–2236.
- Wirth T., Bernatchez L. (2001). Genetic evidence against panmixia in European eel. *Nature*, **409**: 1037-1040.
- Yamano K., Tagawa M., De Jesus E.G., Hirano T., Miwa S., Inui Y. (1991). Changes in whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in metamorphosing conger eel. *Journal of Comparative Physiology*, **161** (B): 371-375.

- Youson J.H. (1997). Is lamprey metamorphosis regulated by thyroid hormones? *American Zoology*, **37**: 441-460.
- Yaran Z., Cocos M., Salzer H. (1980). Effects of temperature and photoperiod on ovarian recrudescence in the cyprinid fish *Mirogrex terrae-sanctae*. *Journal of Fish Biology*, **16**: 371-382.