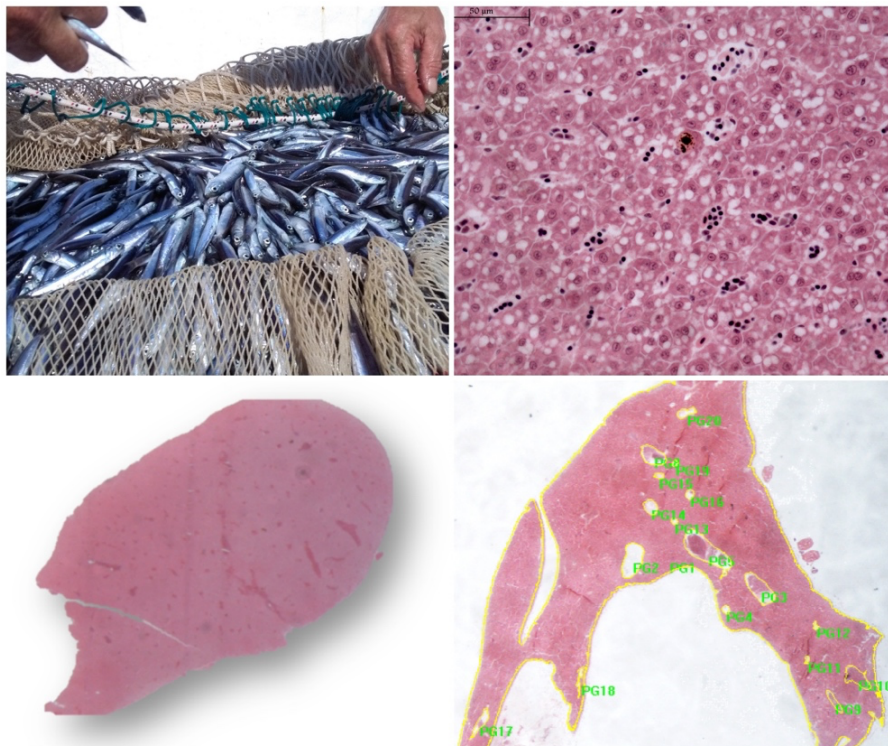


**RELAZIONE TECNICA SULLA CARATTERIZZAZIONE DELLO STATO
DI SALUTE DELL'ACCIUGA EUROPEA IN RELAZIONE ALLO STATO
DEL FEGATO: STUDIO DEI BIOMARKER DA ESPOSIZIONE A
XENOBIOTICI**



A. Gargano; R. Ferreri; A. Di Maria; G. Giacalone; I. Fontana; S. Aronica;
P. Calandrino; M. Pulizzi; S. Genovese; A. Bonanno; G. Basilone.

Sommario

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 3 |
| 1.1. BIOLOGIA ED ECOLOGIA DELL'ACCIUGA EUROPEA (ENGRAULIS ENCRASICOLUS) | 4 |
| 1.2. MORFOLOGIA DEL FEGATO NEI PESCI | 5 |
| 1.3. L'IMPORTANTE RUOLO DEL FEGATO | 7 |
| 1.3.1 IL RUOLO DEL FEGATO NELLA DIFESA IMMUNITARIA | 9 |
| 1.4. MORFOLOGIA DEL FEGATO DI ACCIUGA | 10 |
| 2. MATERIALE E METODI | 14 |
| 2.1. ANALISI ISTOLOGICA DEL TESSUTO EPATICO DI ACCIUGA | 14 |
| 2.2. OSSERVAZIONE DEI PREPARATI ISTOLOGICI | 19 |
| 3. RISULTATI E OSSERVAZIONI | 23 |
| 3.1. I CENTRI MELANOMACROFAGI: MORFOLOGIA E FUNZIONE | 23 |
| 3.2. I CENTRI MELANOMACROFAGI: BIOMARCATORI DA XENOBIOTICI | 27 |
| 4. BIBLIOGRAFIA | 29 |

1. INTRODUZIONE

L'acciuga europea *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) è un piccolo pesce pelagico con ciclo vitale di breve durata, distribuito in tutto il mondo (Crawford, 1987; Schwartzlose et al., 1999; Palomera et al., 2007). L'acciuga europea rappresenta un'importante risorsa ittica per i paesi del Mediterraneo, rappresentando circa il 30% della produzione totale di pesce (Leonart e Maynou, 2003). Le catture annuali di acciughe europee nel Mediterraneo sono state comprese tra 200.000 e 700.000 t nel ventennio 1980-2000 (FAO, 2005) e gli sbarchi medi annui hanno raggiunto quasi 400.000 t nel periodo 2010-2013 (FAO, 2016). Fin dall'antichità, il Mediterraneo e il Mar Nero (FAO principale zona di pesca 37) hanno sostenuto importanti attività di pesca. Oggi coesistono pesca industriale, semi-industriale e artigianale, utilizzando un'ampia varietà di attrezzi da pesca. A differenza di altre principali zone di pesca e, con poche eccezioni, la pesca in Mediterraneo e Mar Nero è generalmente multispecie, sfruttando la varietà di stock di pesci bentonici e pelagici, nonché di molluschi e crostacei, presenti in questi bacini. A causa della natura semichiusa del Mediterraneo e del Mar Nero, gli stock sono spesso condivisi tra flotte di diversi paesi, il che significa che il settore pesca svolge un importante ruolo di collegamento tra stati; e crea molti altri benefici indiretti, mantenendo così il tessuto sociale di molte comunità. In quanto tale, la pesca è una parte intrinseca della cultura paesaggio dei paesi del Mediterraneo e del Mar Nero. Il Mar Mediterraneo è soggetto a un degrado ambientale che si è accelerato negli ultimi decenni del 20° secolo (EEA, 2008; Cinnirella et al., 2013) e gli Stati membri dell'UE sono stati chiamati a sviluppare strumenti per definire descrittori qualitativi di “buon *Environmental Status*” entro il 2020, compreso il monitoraggio dei livelli di contaminazione negli habitat e nei pesci (EC, 2008).

Il fegato dei pesci è un organo chiave che controlla molte funzioni vitali e svolge un ruolo di primo piano nella fisiologia dei pesci, sia nell'anabolismo che nel catabolismo, così come nel metabolismo degli xenobiotici, ed è considerato un buon indicatore dello stato di salute di un pesce (Bruslé e Anadon, 1996; Ghosh et al., 2001; Desantis et al., 2005; Cionna et al., 2006; Kirchhoff et al., 2011; Corriero et al., 2013; Passantino et al., 2014). I centri melanomacrofagici (MMC) sono aggregati di cellule simili a macrofagi, che sono frammenti derivati da cellule e pigmenti fagocitati come melanina, emosiderina e lipofuscina (Roberts, 1975; Fournie et al., 2001; Agius and Roberts, 2003). I MMC si trovano nel tessuto reticoloendoteliale degli organi emolinfopoietici di vari vertebrati non mammiferi (Wolke, 1992; Christiansen et al., 1996; Rund et al., 1998; Barni et al., 2002; Loumbourdis e Vogiatzis, 2002; Fournie et al. al., 2001; Koppang et al., 2005; Fishelson, 2006). I MMC svolgono un ruolo nella distruzione, disintossicazione e riciclaggio di materiali endogeni ed esogeni, comprese cellule morte e detriti cellulari (Agius e Roberts, 1981; Van der Oost et al., 2003;

Mela et al., 2007). Numerosi studi hanno appurato un aumento della densità di MMC insieme ad aumenti dell'espressione di CYP450 e alla morte cellulare per apoptosi (Gogal et al., 1999; Corriero et al., 2013; van der Weiden et al., 1994; Passantino et al., 2014), dopo che i pesci sono stati esposti a composti tossici; in generale, i MMC sono utili biomarcatori di risposta (effetto) per diversi tipi di stress, inclusi gli inquinanti ambientali (Agius, 1979; Agius e Roberts, 1981, Agius e Roberts, 2003; Fishelson, 2006; Passantino et al., 2014; Basilone, G., et al., 2018).

1.1. BIOLOGIA ED ECOLOGIA DELL'ACCIUGA EUROPEA (*ENGRAULIS ENCRASICOLUS*)

L'alice fa parte della famiglia Engraulidae, di cui in Mediterraneo è l'unica rappresentante. L'acciuga è una specie comune nel Mediterraneo (fig.1), presente anche in Mar Nero. E' distribuita lungo le coste dell'Atlantico orientale, dalla Norvegia al Sud Africa. Vive principalmente in acque marine e salmastre, è una specie strettamente pelagica, che sopporta bene variazioni di temperatura e salinità. L'acciuga è un pesce gregario e vive in grossi banchi che compiono importanti migrazioni avvicinandosi alla costa in primavera-estate, mentre trascorrono il restante periodo scendendo a maggiori profondità (Fischer et al., 1987). Ha abitudini trofiche diurne e si nutre principalmente di zooplancton (essenzialmente copepodi e larve di molluschi), uova di pesce e larve (Rumolo et al., 2016), filtrando l'acqua mediante una struttura anatomica posta sugli archi branchiali. Di contro, le alici giovanili e adulte rappresentano alimento primario di merluzzo (*Merluccius merluccius*) (Frogliola, 1973), l'anzardo (*Scomber japonicus*), tonnidi (in particolare il tonno rosso, *Thunnus thynnus*; Orsi Relini et al., 1999), altri grandi pesci pelagici, ma anche uccelli marini e delfini (Coll et al., 2007).

I sessi sono separati e la maturità viene raggiunta al termine del primo anno di vita alla taglia di circa 9 cm (Basilone et al., 2006; Ferreri et al., 2021). La stagione riproduttiva per l'acciuga nel Mediterraneo centrale va da aprile a ottobre, con picchi di deposizione durante i mesi più caldi (Basilone et al., 2006). Le femmine producono circa 4.000 uova alla volta, che vengono, generalmente, rilasciate negli strati superficiali (primi 100 m di profondità), a piccoli lotti (Varagnolo, 1965; Ghirardelli, 1967) e, generalmente, dopo il tramonto e nelle prime ore della sera (Basilone et al., 2015). Le uova generalmente schiudono in circa 36 ore alle temperature temperate del Mar Mediterraneo e le larve alla schiusa sono lunghe circa 2 mm. Come altri piccoli pelagici a ciclo vitale breve, soffrono di un alto tasso di mortalità nelle prime fasi della vita fino al reclutamento. L'effetto delle condizioni ambientali, in particolare della temperatura della superficie del mare e della

concentrazione di clorofilla-a, è stato dimostrato sulla crescita dei giovanili di acciuga (Basilone et al., 2018).



Fig.1 Esempio di acciuga europea (*Engraulis encrasicolus*)

Generalmente, sono gli individui maschili a crescere più velocemente. Inoltre la densità influenza negativamente la crescita: osservando i dati relativi alla lunghezza corporea e all'età degli animali, gli studiosi hanno osservato una crescita più lenta negli anni in cui si è stimata una biomassa maggiore. Infatti nel 2005, anno in cui si osserva un recupero dello stock di alici, i tassi di crescita si abbassano (Santojanni et al., 2003). I grossi eventi di upwelling tipici del periodo estivo influiscono in maniera significativa sulla riproduzione delle acciughe. Recenti studi che hanno analizzato l'interazione tra parametri oceanografici e caratteristiche biologiche dell'acciuga hanno confermato l'importanza dell'arricchimento delle acque legati ai fenomeni di upwelling sia come motore della crescita somatica soprattutto nel primo anno di vita sia per l'investimento energetico nello sviluppo gonadico (aumento dell'indice gonado-somatico), nonché della produzione di uova (aumento della fecondità). Lo stesso studio ha identificato un meccanismo dipendente dalla densità che riduce la crescita e la fecondità a densità più elevate di popolazione ittica; migliori condizioni dei pesci (indice di condizione somatica) influiscono positivamente sulla crescita degli stessi; una maggiore disponibilità di cibo influisce positivamente sulla maturazione delle gonadi (Basilone et al., 2020).

1.2. MORFOLOGIA DEL FEGATO NEI PESCI

Nei teleostei il fegato è presente nella zona craniale della cavità generale (Fig.2), dove sono presenti tutti gli organi. Alcuni Teleostei hanno un fegato trilobato, mentre altri non mostrano alcuna lobulazione (Bruslé & Anadon, 1996). Le sue dimensioni e volume dipendono dalla disposizione degli altri organi (Bertolucci et al., 2008).

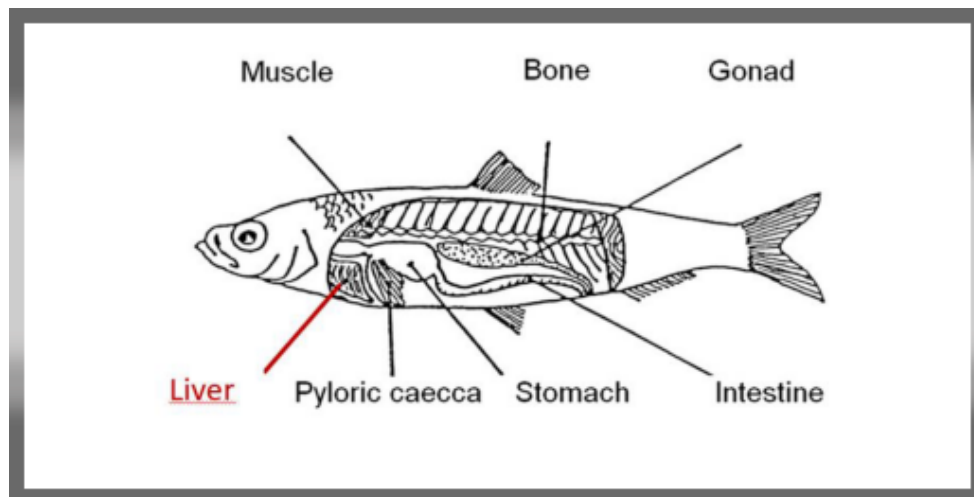


Fig. 2 Anatomia schematica (Carvalo, 2011).

Il fegato è diviso in due compartimenti: parenchima e non parenchima (stroma) (Fig.3). Il parenchima è costituito da cellule (epatociti, macrofagi, cellule endoteliali, epiteliali biliari, Ito) e sinusoidi; mentre lo stroma presenta: dotti biliari, arterie, vene e tessuto connettivo (Hinton & Lauren, 1990).

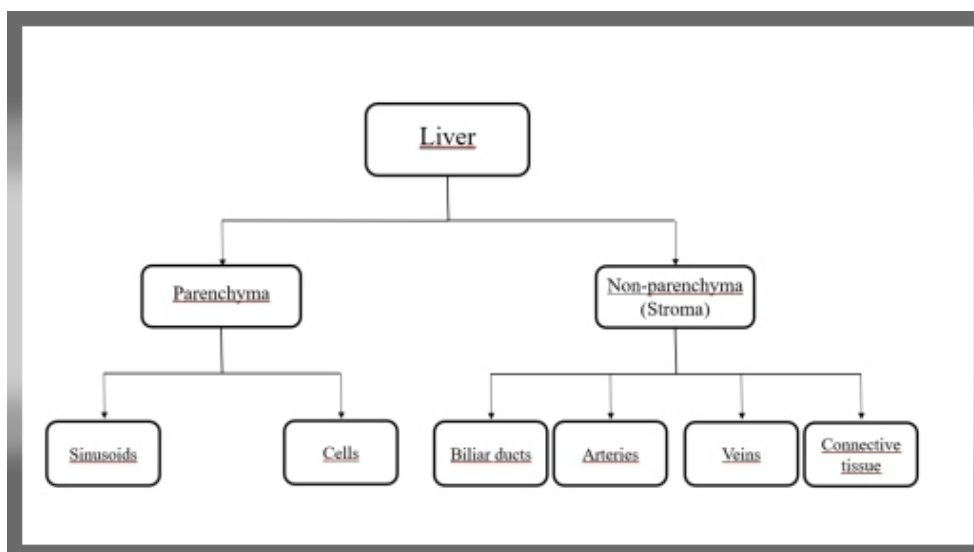


Fig. 3 Schema di fegato dei Teleostei (Tavolazzi, 2021)

Il fegato è un tessuto altamente perfuso, riceve sangue dall'arteria epatica e dalla vena porta (Damjanov, 1996), che si diramano e convogliano il sangue ai sinusoidi. La maggior parte del fegato è costituita da epatociti, che sono distribuiti in tubuli o cordoni (Hampton et al., 1985; Shore & Jones, 1989). Gli epatociti sono cellule poligonali, più precisamente sono esagoni (Geyer, 1989). Altri tipi di cellule sono le cellule di Ito, che hanno gocce lipidiche con vitamina A, le cellule di Kupffer, che sono caratterizzate da un'azione fagocitica e i macrofagi, in particolare i melanomacrofagi (MM) (Munshi & Dutta, 1996).

1.3. L'IMPORTANTE RUOLO DEL FEGATO

Il fegato è un organo fondamentale perché svolge diverse funzioni. Svolge un ruolo importante nel metabolismo, sia nell'anabolismo (sintesi di nuove sostanze) che nel catabolismo (degradazione di molecole più complesse in molecole più semplici, con rilascio di energia) (Bruslé & Anadon, 1996). Riceve i nutrienti assorbiti dall'intestino attraverso la vena porta, che porta il 70-80% del sangue al fegato (Akiyoshi & Inoue, 2004; Rappaport, 1963); solo i lipidi complessi, come i chilomitroni, sono trasportati dai vasi linfatici (Rappaport, 1963). I pesci utilizzano principalmente lipidi e proteine come fonte di energia, scarsamente i carboidrati (Cowey & Sargent, 1972; Walton & Cowey, 1979). Il muscolo, che è la massa principale del pesce, utilizza il glicogeno per mantenere l'attività di contrazione; questo glicogeno proviene dal glucosio che viene prodotto attraverso il processo di gluconeogenesi da amminoacidi, triacilglicerolo e lattato (dalla glicolisi anaerobica). La principale risorsa della gluconeogenesi è il lattato (Moon et al., 1985), infatti, in uno studio sulla trota iridea, Mommsen e Suarez (1984) hanno dimostrato che il ruolo principale della gluconeogenesi è quello di convertire il lattato, prodotto dalla contrazione muscolare azione, in glucosio. Ma, in altre specie, è stato dimostrato che la risorsa principale erano gli amminoacidi (Cornish & Moon, 1985). Questo mostra com'è il substrato di partenza principale specifico della specie. Il fegato è l'organo principale in cui si verifica la gluconeogenesi (Moon et al., 1985). Altre funzioni del fegato sono la produzione di eritrociti, la produzione di bile e la risposta immunitaria (stimola l'azione dei granulociti e dei linfociti).

Un altro ruolo importante del fegato è il processamento dei lipidi: sintetizza nuovi lipidi a partire dai lipidi ricevuti dall'intestino. Inoltre, poiché i lipidi sono molecole insolubili, il fegato secerne anche le lipoproteine che servono per il loro trasporto (Very Low Density Lipoprotein, VLDL) (Sheridan, 1988). Nei pesci, a differenza dei mammiferi, l'immagazzinamento e la deposizione dei lipidi è differente. Nel pesce, i lipidi possono essere immagazzinati nel fegato, nei muscoli o come grasso mesenterico (Sheridan, 1994) (Fig. 6).

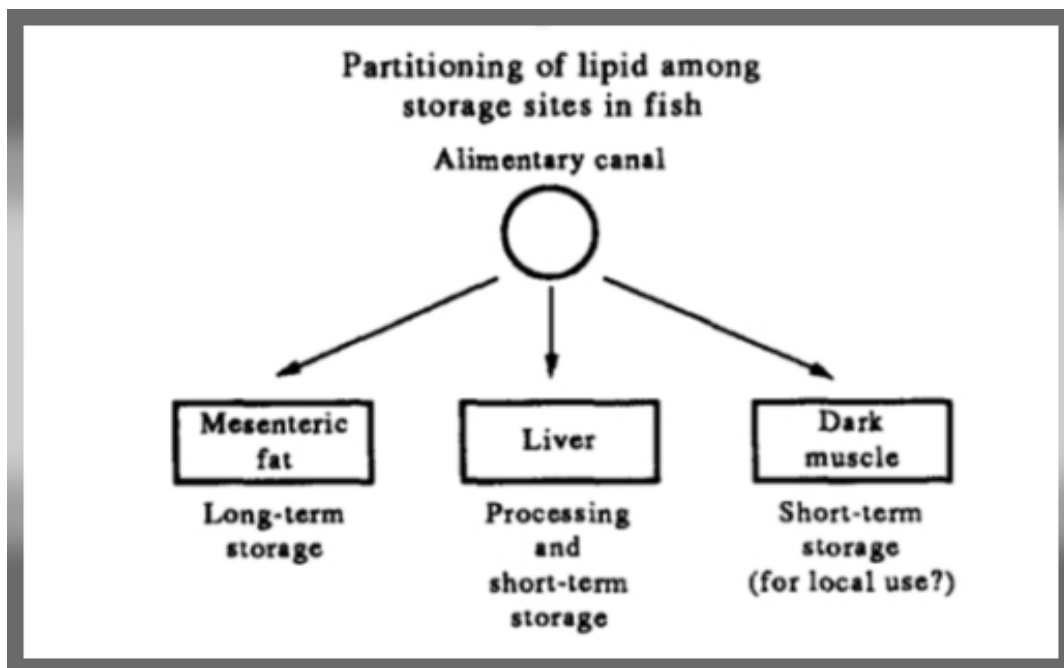


Fig.6 Suddivisione dei lipidi nei pesci (Sheridan, 1994)

La capacità di immagazzinamento dei lipidi può variare a seconda della specie, può dipendere da fattori ambientali e sviluppo dell'organismo (Henderson & Tocher, 1987; Sheridan, 1988, 1989). In quest'ultimo caso è importante l'interazione tra riproduzione e accrescimento dovuta ad entrambe le esigenze di alto livello di energia. Infatti i lipidi, in particolare gli acidi grassi, sono la principale risorsa energetica dei pesci, non solo per la crescita ma anche per la riproduzione, soprattutto nelle femmine (Tocher et al., 1984a, b). Nelle femmine di trota iridea in maturazione è stato osservato che i livelli di acidi grassi liberi e triacilgliceroli nel plasma e nel fegato erano più alti che nelle femmine immature, suggerendo la mobilizzazione dei lipidi, sotto forma di lipoproteine, dal fegato all'ovaio attraverso il sangue (Takashima et al., 1971, 1972).

Un'altra importante molecola prodotta dal fegato per la riproduzione è la vitellogenina. La vitellogenina è una glicolipofosfoproteina e il suo processo di formazione è chiamato "vitellogenesi". Durante questo processo, i follicoli ovarici rilasciano grandi quantità di estrogeni, che si legano ai recettori nel fegato, determinando la trascrizione e la successiva traduzione e maturazione della vitellogenina (Hara et al., 2016) (Fig.7).

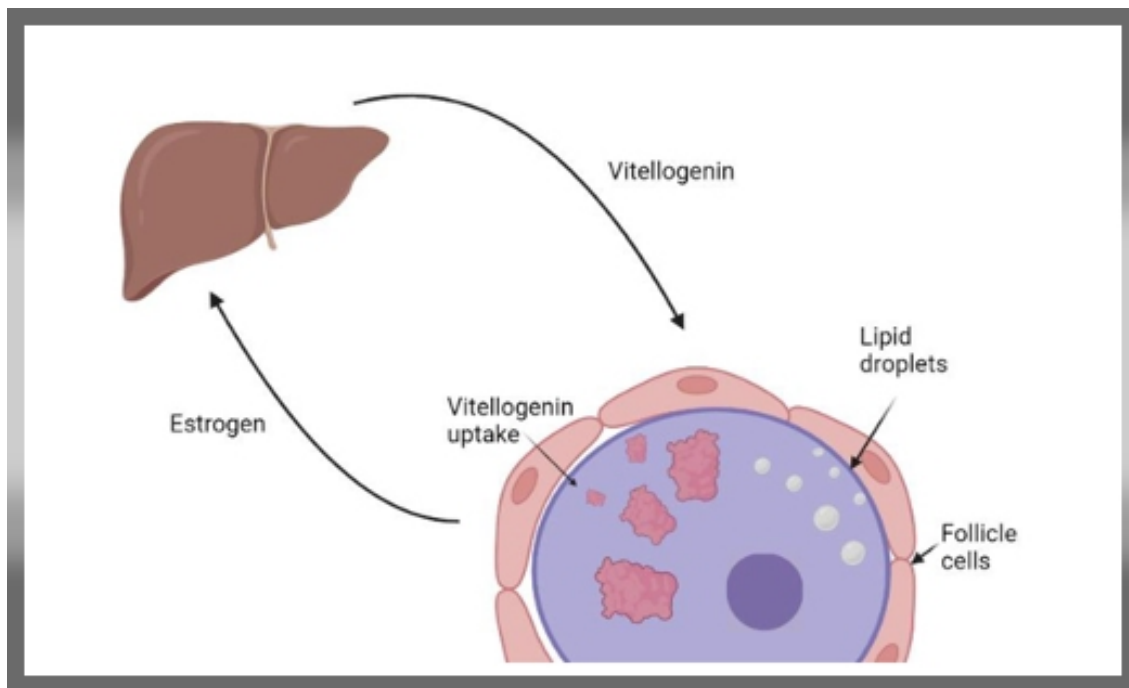


Fig.7 Schema della vitellogenesi (Tavolazzi, 2021)

1.3.1 IL RUOLO DEL FEGATO NELLA DIFESA IMMUNITARIA

L'ultima funzione che il fegato può svolgere è la disintossicazione, determinando la rimozione di eventuali sostanze tossiche, che possono essere sia endogene (fagocitosi delle cellule esauste, cioè eritrociti) che esogene (cioè metalli pesanti). Per svolgere questa azione utilizza i melanomacrofagi (MM). Poiché non esistono reagenti specie-specifici per organismi non modello, i melanomacrofagi possono essere interessanti da studiare perché possono essere utilizzati come biomarcatori per la risposta immunitaria (Steinel & Bolnick, 2017). Oltre ad avere un'azione immunitaria, i melanomacrofagi hanno anche un'azione fisiologica, come la fagocitosi delle cellule esauste (Wolke, 1992). I melanomacrofagi sono comuni nei pesci (Agius, 1980) come in altri poichilotermi (Steinel & Bolnick, 2017). Possono essere presenti sia in forma singola (MM) che in forma aggregata (Centri Melanomacrofagi, MMC) (Agius 1980) (Fig. 8); gli organi in cui si trovano maggiormente sono fegato, milza e reni, occasionalmente si trovano anche in altri organi (Agius & Roberts, 2003).

I melanomacrofagi possono avere forme, dimensioni e pigmentazioni variabili in base a vari fattori quali: specie, condizioni ambientali, stress, età, condizioni dell'individuo (Fishelson 2006; Thorsen, Høyheim & Koppang 2006; Valavanidis et al. 2006; Weisman & Miller 2006). Prima di tutto i MM viaggiano liberamente nel sangue e, a causa della diapedesi e dei fenomeni di migrazione, si spostano all'interno del tessuto (Passantino et al., 2014). Queste, poi, possono formare degli aggregati, chiamati centri melanomacrofagi (MMC), per svolgere la loro azione di fagocitosi. Al loro interno i pigmenti

possono essere melanina, lipofuscina o emosiderina (Agius & Roberts, 2003). È stato dimostrato come, in base all'azione svolta dai melanomacrofagi, cambiano i vari contenuti. Ad esempio, è stato riscontrato che nei melanomacrofagi che si occupano della degradazione degli eritrociti e che, quindi, accumulano ferro, hanno emosiderina (Agius & Roberts, 2003). La beta-ossidazione degli acidi grassi è stata invece riscontrata nei melanomacrofagi che accumulano lipofuscina, che è un metabolita secondario della beta-ossidazione (Agius, 1985).

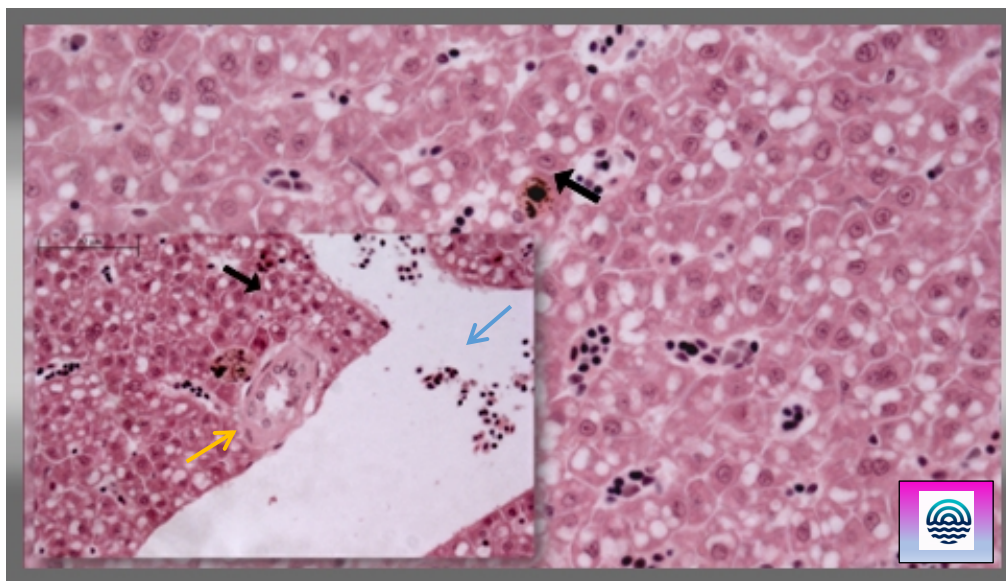


Fig.8 Caratterizzazione di tessuto epatico con evidenza del dotto biliare (freccia gialla) in prossimità di un vaso portale (freccia blu) e un centro melanomacrofico (freccia nera in alto centrale): notare l'elevato contenuto lipidico degli epatociti, (freccia nera in basso a sinistra).

1.4.MORFOLOGIA DEL FEGATO DI ACCIUGA

È stato dimostrato che il fegato di acciuga europea ha la classica architettura epatica con disposizione del parenchima corrispondente alle forme cordonali e tubolari descritte da Akiyoshi e Inoue (2004), cioè epatociti disposti in uno strato singolo (forma cordiforme) o doppio (forma tubolare) tra sinusoidi. Questa scoperta è in accordo con la struttura del fegato descritta in altri Clupeiformi come *Etrumeus teres*, *Sardinella zunasi*, *Konosirus punctatus* e *Engraulis japonicus* (Akiyoshi e Inoue, 2004). Tuttavia, è stato osservato un terzo tipo di disposizione del parenchima epatico: un rivestimento multistrato di epatociti costituito da strutture simili a lobuli arrotondati con una vena centrale (epatica) circondata da un ramo della vena porta (Fig. 9).

Inoltre, questa disposizione del parenchima epatico, che è stata occasionalmente osservata nelle sezioni istologiche, ricorda l'organizzazione lobulare dei mammiferi che non è mai stata descritta nei pesci teleostei (Basilone et al. 2018).

Durante lo sviluppo dello studio di fegato d'acciuga è stato descritto, tramite analisi istochimiche, l'identificazione di tipici macrofagi liberi e raggruppati, che si trovano spesso vicino ai vasi sanguigni (Basilone et al. 2018). In aggiunta, si è dimostrata la presenza di: a) lipofuscina/pigmenti ceroidi, che sono prodotti consecutivi della stessa polimerizzazione ossidativa degli acidi grassi polinsaturi e possono accumularsi nei pesci che presentano un'ampia varietà di condizioni patologiche, tra cui carenze nutrizionali, malattie batteriche e virali, disturbi causati da tossine (Agius, 1979); b) emosiderina, che è un complesso di immagazzinamento del ferro il cui accumulo può essere indicativo di emolisi tossica (Pacheco e Santos, 2002); c) ferro ferrico che, insieme all'emosiderina, è considerato un residuo del catabolismo di diversi composti (Leknes, 2004; Ribeiro et al., 2011). I centri melanomacrofagi sono coinvolti nella distruzione di materiale endogeno ed esogeno (comprese cellule morte e detriti cellulari) e sono associate all'apoptosi (Gogal et al., 1999). Nella trota iridea *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) è stata proposta l'associazione della presenza di MMC all'esposizione a diversi tipi di stress (Passantino et al., 2002a, 2002b, 2004). Un aumento della densità di MMC nel fegato e nell'espressione del CYP1A (Passantino et al., 2014), così come l'apoptosi degli epatociti e l'espressione del fattore di necrosi tumorale (Corriero et al., 2013), sono stati osservati nei giovani esemplari dell'Atlantico, a conferma della stretta correlazione tra fegato e sistema immunitario e la considerazione obiettiva del fegato come biomarcatore indicativo.

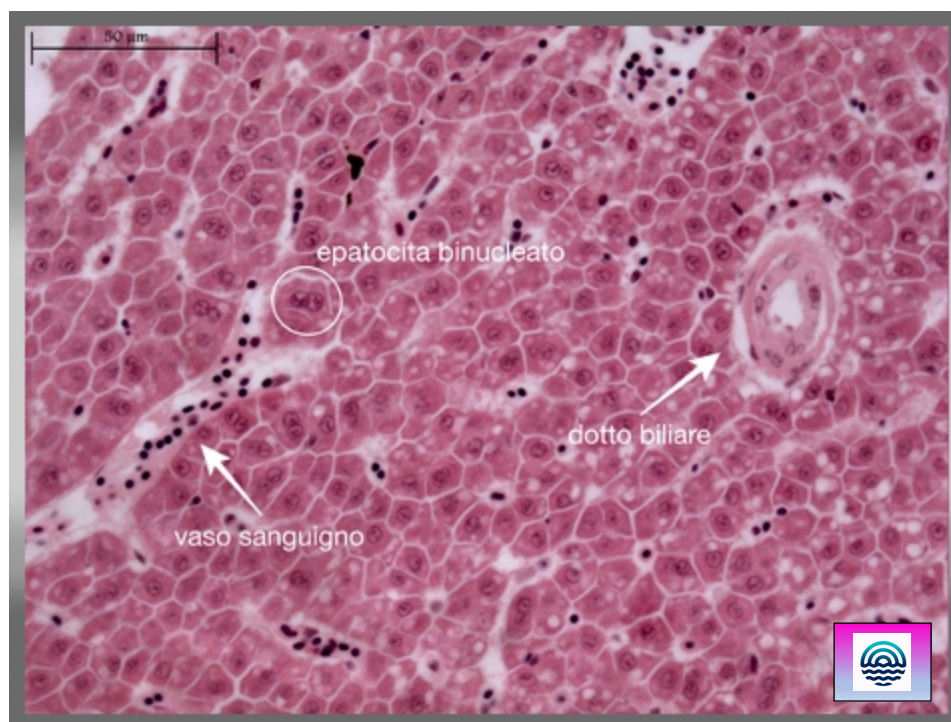


Fig.9 Descrizione del tessuto epatico di *E. encrasicolus*

L'aspetto istologico del fegato dell'acciuga europea (*E. encrasicolus*) si mostra simile alle altre specie dello stesso genere. Il parenchima epatico appare disposto secondo un'architettura eterogenea: la maggior parte degli epatociti si presenta disposta come cordoni circondati da una rete di sinusoidi. I cordoni epatocitari appaiono talvolta costituiti da un singolo strato cellulare e talvolta da due o più strati cellulari (Fig.10).

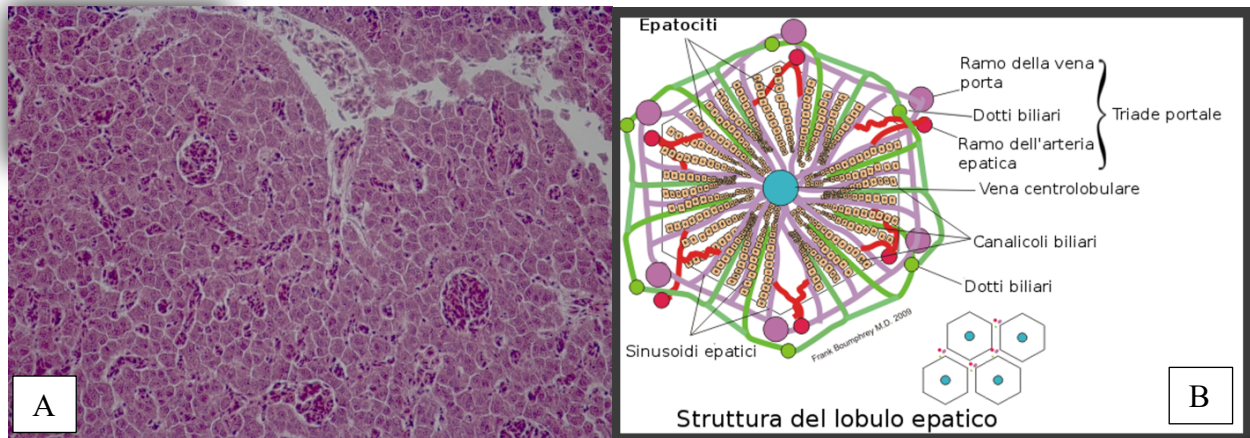


Fig.10: A (immagine a sinistra) Cordoni epatocitari e vasi sanguigni con struttura a lobuli; B (immagine a destra): struttura del lobulo epatico.

Occasionalmente, diversi strati di epatociti sembravano dare origine a lobuli sferici circondati da un ramo della vena porta e contenenti una vena in posizione più o meno centrale (vena centro-lobulare) (Fig.11A). I rami dell'arteria epatica appaiono difficili da distinguere dalle vene a causa delle loro pareti molto sottili. Vi sono dotti biliari, associati a un ramo della vena porta o isolati (Fig.11B). Gli epatociti possono essere di forma poligonale e mostrano uno o due nuclei sferici. Nella maggior parte dei casi, il citoplasma degli epatociti si mostra omogeneo e debolmente basofilo (Basilone et al. 2018). In alcuni casi, gli epatociti possono mostrare un cospicuo contenuto di grassi (Fig. 12).

Il tessuto epatico dell'acciuga europea è caratterizzato anche da aggregati di cellule e pigmenti, ovvero i MMC, visibili già con una colorazione tipica descrittiva di un tessuto istologico, come ematossilina-eosina (H&E). Questi aggregati, generalmente contengono lipofuscina-ceroidi e ferro ferrico, identificabili effettuando ulteriori colorazioni, come la Mallory e Perls-Van Gieson (Fig. 13). (Basilone et al., 2018).

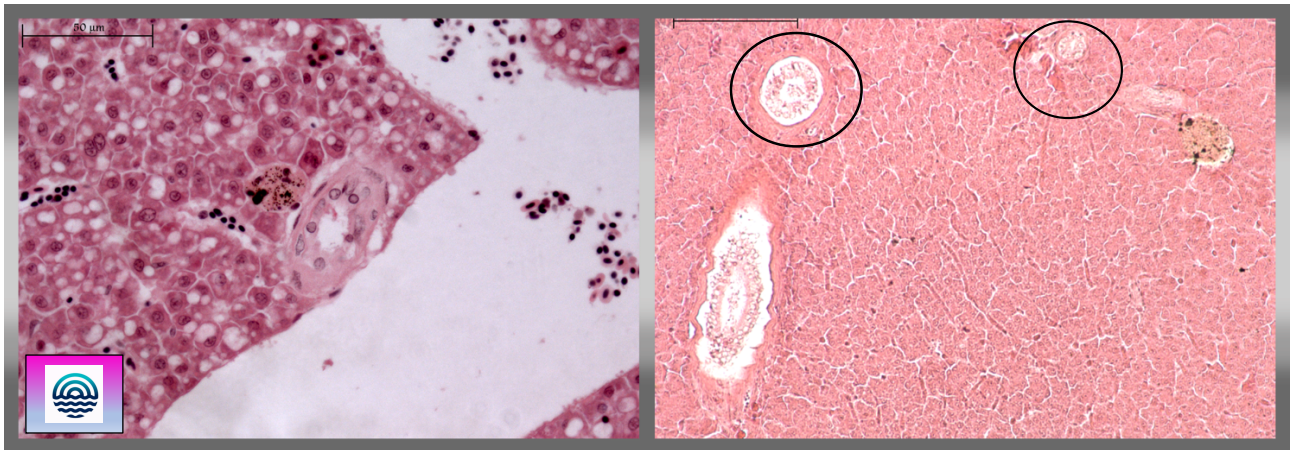


Fig.11: A (immagine a sinistra): vena centro-lobulare; B (immagine a destra): in evidenza i dotti biliari

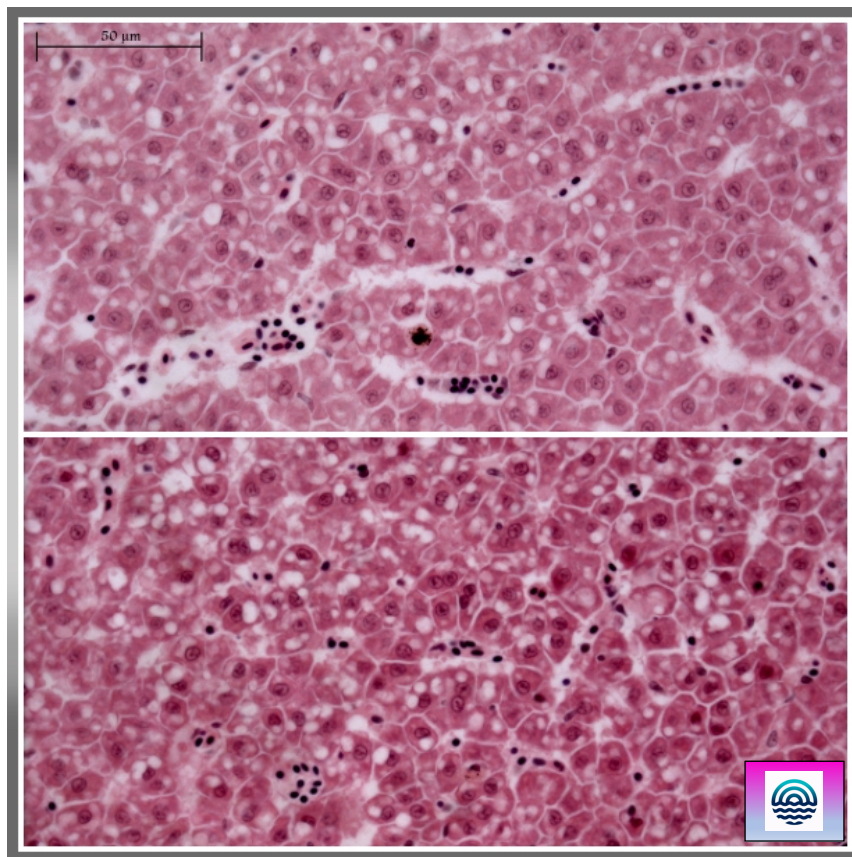


Fig.12 In evidenza gli epatociti, vasi sanguigni e presenza di contenuto di grassi con ingrandimento 40x.

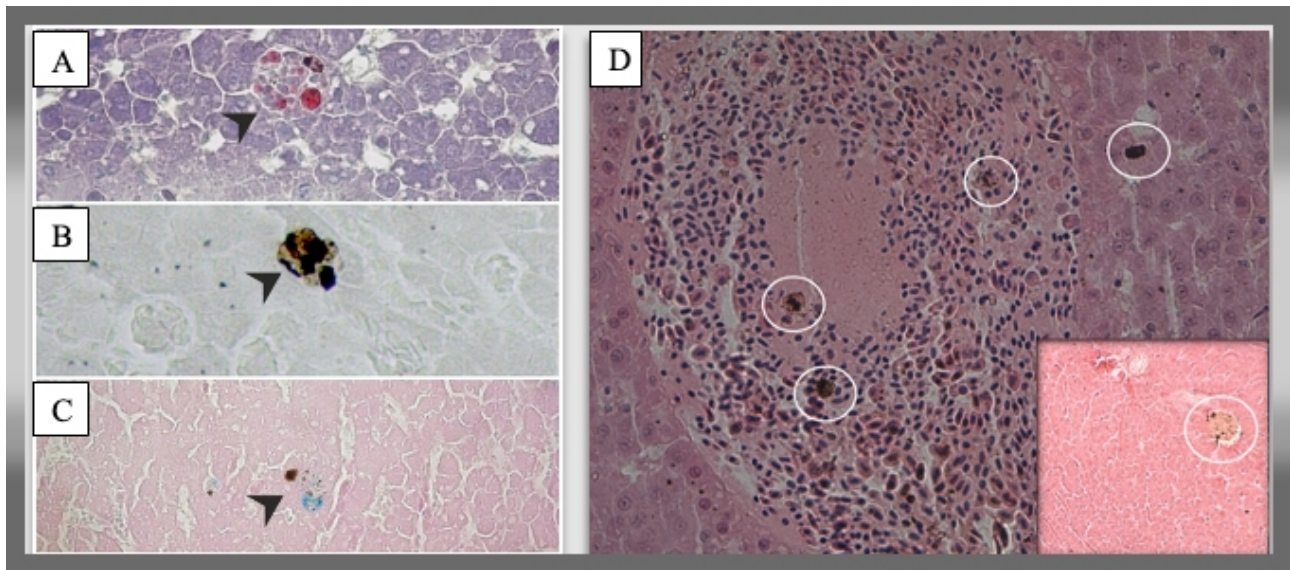


Fig.13. Colorazioni del tessuto epatico che evidenziano la presenza di centri melanomacrofagi (MMc). A. colorazione di Mallory con evidente centro melanomacrofago; B. colorazione Perox, C. Perls-Van Gieson. (foto estrapolata da Basilone et al). D. Colorazione ematossilina-eosina: cerchiati i vari centri melanomacrofagi dentro e fuori i vasi sanguigni.

2. MATERIALE E METODI

2.1. ANALISI ISTOLOGICA DEL TESSUTO EPATICO DI ACCIUGA

Nel corso delle campagne oceanografiche mirate al monitoraggio di specie ittiche nel Canale di Sicilia e nel Mar Tirreno (Fig.15), per ogni cattura sono stati selezionati in maniera random circa 70-90 individui per studiare il tessuto epatico; successivamente sono stati registrati i corrispettivi dati biometrici - lunghezza totale (0,01 mm), peso totale e somatico (0.01 g) - dopodiché si è proceduto alla determinazione del sesso ed asportazione del fegato. Il fegato è stato rimosso integralmente dalla cavità addominale alta, in corrispondenza delle appendici piloriche, sacca stomacale, milza e cuore; tutti organi che lavorano in sinergia con l'apparato digerente (Fig.16).

Sono stati conservati in apposite cassetine da biopsia e fissati subito in formalina al 10% neutralizzata, ponendole dentro una kartell da 1000 ml. In ogni cassetina da biopsia sono state indicate: il numero progressivo del campione, la data di campionamento e il numero della cala per risalire alla posizione o area della cattura (Fig.17). Questi ultimi sono dati indicativi per catalogare al meglio i campioni durante le fasi di processamento in laboratorio.

Dopo circa 3 giorni, il set di cassetine viene trasferito in una seconda kartell contenente un tampone salino (pbs) con un passaggio ultimo in etanolo 70%.



Fig.15. Esempio di pesca sperimentale in campagna oceanografica.



Fig.16. Asportazione di fegato di acciuga europea.



Fig.17. Cassettina da biopsia con fegato.

I tessuti sono stati analizzati e processati presso il laboratorio di istologia dell'Istituto per lo studio degli impatti Antropici e Sostenibilità in ambiente marino S.S. di Capo Granitola. Una volta in laboratorio, è stato necessario un periodo di assestamento in modo tale da far penetrare l'etanolo e fissare il tessuto per bene; dopo qualche mese sono stati processati.

Vista la dimensione piuttosto piccola dei fegati, si è deciso di processare l'intero organo, non effettuando nessuna porzione e nessuna replica.

Lo step successivo è stato rappresentato dalla preparazione delle sezioni sottili (Fig.18).

Questa operazione consta di una fase preliminare durante la quale i tessuti vengono opportunamente predisposti, tramite immersioni per tempi prestabiliti e differenziati in ciascun cestello del processore automatico di tessuti (Leica TP 1020) (Fig.F18B). I cestelli contengono ognuno circa 1,5 l di soluzioni con diverse funzioni nel processo di preparazione del tessuto per le successive fasi di lavorazione. Terminata la fase di processamento i campioni hanno subito i seguenti processi:

- 1) DISIDRATAZIONE: avviene mediante una scala ascendente di alcoli (70%, 96%, e assoluto) per eliminare la componente acquosa che non permetterebbe l'entrata della paraffina nel tessuto;
- 2) DIAFANIZZAZIONE: si utilizza toluene per rendere il campione diafano cioè trasparente e penetrabile da parte della paraffina;
- 3) INFILTRAZIONE: avviene in paraffina fusa a 60° per permettere alla paraffina di sostituirsi gradualmente al toluene all'interno dei campioni.



Fig.18: A Sezioni sottili - 4 μ n. **B** Processore automatico

C Dispensatore di paraffina e blocchetto

In seguito, si è passato all'inclusione finale, formando i blocchetti in paraffina contenente il tessuto epatico (Fig.18 C).

E' stato utilizzato un dispensatore automatico (Leica EG1150H - Fig. 18c) di paraffina liquida con settaggio di 65 - 70°C; i campioni, sono stati inclusi in blocchetti di paraffina tramite supporto specifico; la conclusione della formazione del blocchetto viene rappresentata dal "rabocco": consiste nel versare per la seconda volta la paraffina liquida, prima che si solidifichi definitivamente il blocchetto; serve principalmente per espellere possibili bolle d'aria formatosi durante la fase di raffreddamento della prima paraffina versata. Successivamente la cassetta è posta su una piastra raffreddante che ne accelera la solidificazione (Fig.20).



Fig.20 Piastra raffreddante e blocchetto solidificato.

A questo punto, superate le 48 ore in freezer, possono essere tagliate le sezioni sottili, utilizzando un microtomo.

Il taglio richiede particolare attenzione, poiché definita la parte più meticolosa per produrre una adeguata sezione. Il blocchetto viene posizionato su un supporto in metallo, per poi essere tagliato mediante l'uso del microtomo rotativo semiautomatico (Leica RM2255 - Fig.21A). Inizialmente è stata effettuata un'operazione di "sgrossatura", che serve a rimuovere l'eccesso di paraffina che copre il campione, attraverso tagli ripetuti (con spessore di 14 μm); successivamente, sono state ricavate delle sezioni sottili, di circa 4 – 5 μm di spessore (Fig.21B).

Ogni sezione, subito dopo il taglio, è stata immersa in un bagno termostato (Leica HI1210) con acqua ad una temperatura variabile tra i 36° e 38°C per facilitare la distensione e il posizionamento su un vetrino porta-oggetto (Fig.22).

Solo dopo aver finito un set di 30 vetrini, posizionati su un apposito supporto plastico (Fig.23A), le sezioni vengono poste in stufa ventilata per eliminare l'acqua in eccesso a 48°C per 48 ore (Fig.23B). Infine, le sezioni vengono colorate in ematossilina-eosina utilizzando il metodo di Harris (Luna, 1968) per evidenziare le varie strutture cellulari che caratterizzano il tessuto epatico. Il procedimento

è attuato utilizzando un coloratore di vetrini automatizzato (Leica AutoStainer XL - Fig.24 A), ove è stato memorizzato un protocollo specifico per il tessuto epatico di acciuga europea, che dura circa un'ora. È bene precisare che il protocollo di colorazione dipende dal tessuto che si sta analizzando. Il protocollo usato prevede come primo step la rimozione della paraffina e la reidratazione delle sezioni sottili, altrimenti è impossibile che il colorante si fissi sul tessuto. Successivamente si ha la colorazione effettiva, proprio a seguito di immersioni in ematossilina, che tinge di blu il nucleo e le altre strutture acide (RNA, reticolo endoplasmatico, ecc.), e in una soluzione di eosina, che colora da rosa a rosso le proteine citoplasmatiche.

Dopo la colorazione i vetrini seguono il passaggio finale che è il montaggio in balsamo: consiste nell'interporre uno strato di resina sintetica tra vetrino porta- e copri-oggetto (Fig. 24 B).

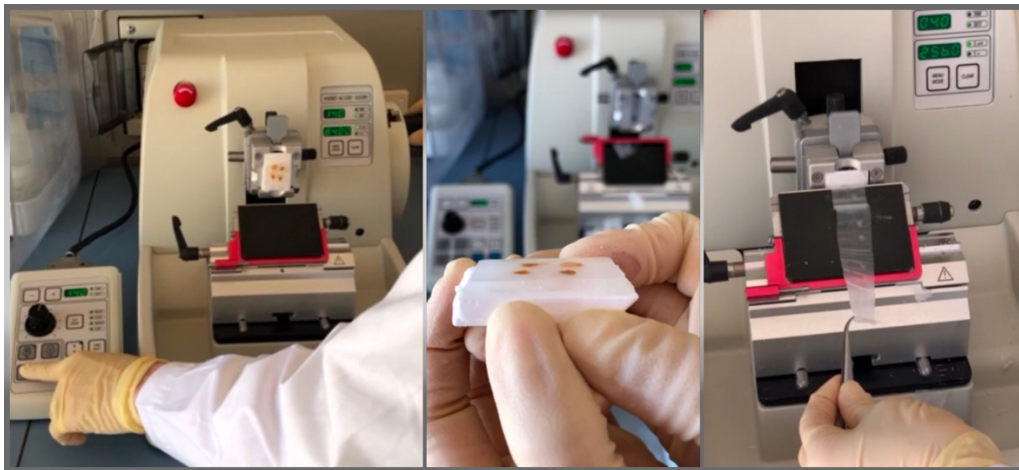


Fig.21: A (immagine a sinistra): Microtomo semi-automatico rotativo, sgrossatura. **B** (immagine a sinistra): Sezioni sottili 4- 5 μ m

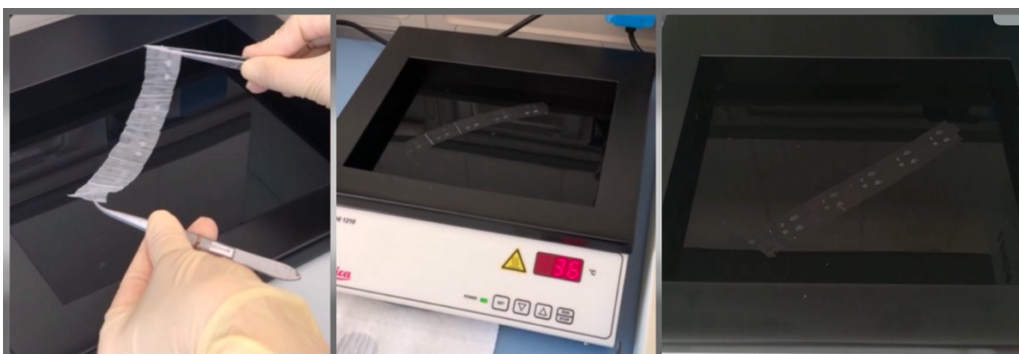


Fig.22 Bagno termostato – distensione della sezione



Fig.23 A (immagine a sinistra): Supporto plastico per i vetrini. **B** (immagine a destra): Stufa ventilata



Fig.24 A (immagine a sinistra): Coloratore automatico Leica AutoStainer XL **B** (immagine a destra) : Montaggio dei vetrini

2.2.OSSERVAZIONE DEI PREPARATI ISTOLOGICI

2.2.1 IL MICROSCOPIO OTTICO

Il progresso tecnologico ha portato nel corso del tempo alla nascita di diversi tipi di microscopio: accanto al tradizionale microscopio ottico, che si basa sull'uso di lenti per focalizzare ed indirizzare la luce visibile, vi sono anche strumenti che sfruttano invece fasci di elettroni quali sorgente di luce. È il caso ad esempio del microscopio elettronico a scansione (SEM) e del microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Nonostante questi ultimi siano tanto potenti da permettere di osservare componenti persino più piccoli di una cellula o dei suoi organelli, avendo una risoluzione che può scendere a livello molecolare, il microscopio ottico resta tutt'ora lo strumento principale tanto nella diagnostica clinica quanto negli studi classici d'individuazione, di tassonomia, di classificazione dei microrganismi e in istologia. L'osservazione al microscopio ottico, o elettronico, dei campioni biologici richiede che i preparati siano sufficientemente sottili da risultare trasparenti al fascio di luce, o di elettroni, e che sia preservata la morfologia delle cellule e degli organelli in esse contenuti. Generalmente quando si osserva un preparato istologico e quindi un tessuto, si fa uso del microscopio ottico. Esso utilizza un sistema di lenti capaci di raccogliere, indirizzare e focalizzare i raggi di luce emessi da una sorgente così da produrre un'immagine ingrandita di oggetti molto piccoli. La luce utilizzata è dello spettro del visibile e comprende pertanto le lunghezze d'onda percepibili all'occhio umano (dai 390 ai 700 nm circa).

Su oculari e obiettivi sono riportati degli indici che informano sulle caratteristiche delle lenti e il loro potere di ingrandimento. Esistono oculari con diverso potere d'ingrandimento; di solito si utilizza il 10x (che significa che l'immagine è ingrandita 10 volte), ma possono essere impiegati anche oculari diversi. Anche gli obiettivi possono avere diverso potere di ingrandimento, per esempio: 4x, 10x, 40x, 100x. La capacità di ingrandimento di un microscopio dipende dai sistemi di lenti impiegati e si ottiene moltiplicando il potere di ingrandimento dell'obiettivo per quello dell'oculare. Es.: oculare 10x e obiettivo 40x = potere di ingrandimento 400x (questo significa che le dimensioni reali dell'oggetto appariranno ingrandite di 400 volte). Nel nostro caso la lettura delle sezioni è avvenuta con l'ausilio di un microscopio ottico, ad ingrandimenti 5x 10x 20x e 40x, utilizzando il Laica DM 2500 (Fig.25).

Ogni vetrino è stato catalogato e osservato, assegnando la fase di contaminazione, in base allo studio del tessuto e acquisendo l'eventuale presenza di strutture morfo-citologiche specifiche (es.: MMC). L'ingrandimento utilizzato per l'osservazione dei centri melanomacrofagi spesso è variato tra il 20x e il 40x. La lettura è stata effettuata usando un file format (Fig.26), segnalando le diverse strutture cellulari che caratterizzano e definiscono lo stato di bioaccumulo. Inoltre, con l'aiuto di una fotocamera specifica da microscopio ottico, è stato possibile effettuare l'acquisizione d'immagine per immortalare le strutture cellulari d'interesse ed eseguire successivamente analisi d'immagine tramite software specifici. Di seguito un collage di alcune acquisizioni effettuate, che caratterizzano il tessuto e le strutture cellulari (Fig.27).

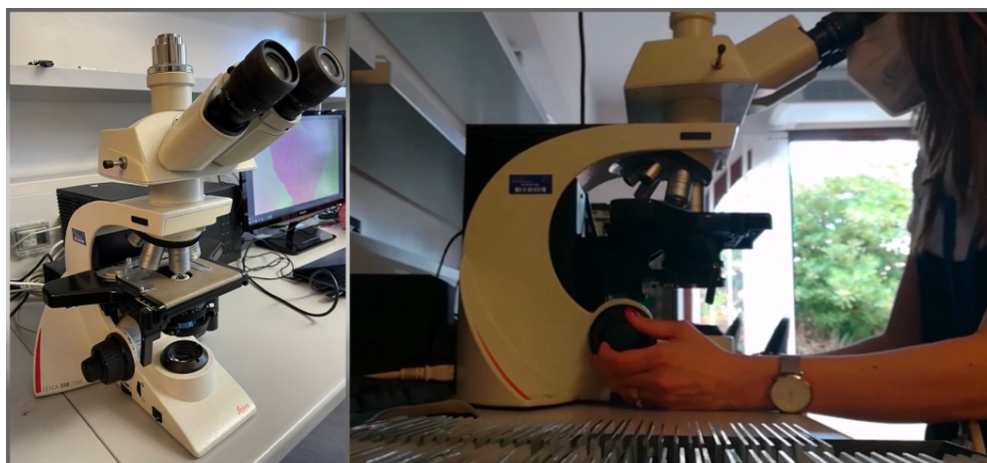


Fig. 25 - Laica DM 2500

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
|----|----------|------|----|-----|-------|--------------|----------------------|---------------|----------------------|------|
| 1 | Campagna | Cala | ID | MMc | N/MMc | MMc/ Sup tot | ALTA GOCCE LIPIDICHE | INTERMEDIA GL | BASSA/ ASSENZA GOCCE | Note |
| 2 | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | |
| 11 | | | | | | | | | | |
| 12 | | | | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | | | | |
| 16 | | | | | | | | | | |
| 17 | | | | | | | | | | |
| 18 | | | | | | | | | | |
| 19 | | | | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | | | | |
| 21 | | | | | | | | | | |
| 22 | | | | | | | | | | |
| 23 | | | | | | | | | | |
| 24 | | | | | | | | | | |
| 25 | | | | | | | | | | |
| 26 | | | | | | | | | | |
| 27 | | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | | |

Fig. 26 File format

| Campione | Area mm2 | Length |
|------------|-----------|----------|
| 20_21 | | |
| SUP TOT | 14,71467 | 25,34659 |
| VS 1 | 0,2440022 | 3,432232 |
| VS 2 | 0,059418 | 2,326634 |
| VS 3 | 0,0199145 | 1,357807 |
| VS 4 | 0,0606944 | 1,958785 |
| VS 5 | 0,0166063 | 0,529138 |
| VS 6 | 0,0448045 | 1,718226 |
| VS 7 | 0,0120347 | 0,58604 |
| VS 8 | 0,0078538 | 0,480993 |
| VS 9 | 0,0293443 | 1,058988 |
| VS 10 | 0,0070202 | 0,525413 |
| VS 11 | 0,0566177 | 1,034099 |
| VS 12 | 0,2267316 | 3,510869 |
| VS 13 | 0,0213342 | 0,648887 |
| VS 14 | 0,0727161 | 1,290441 |
| VS 15 | 0,110305 | 2,021336 |
| VS 16 | 0,0253848 | 1,326645 |
| SOMMA VS | 1,0147823 | |
| SOMMA FINA | 13,699888 | |

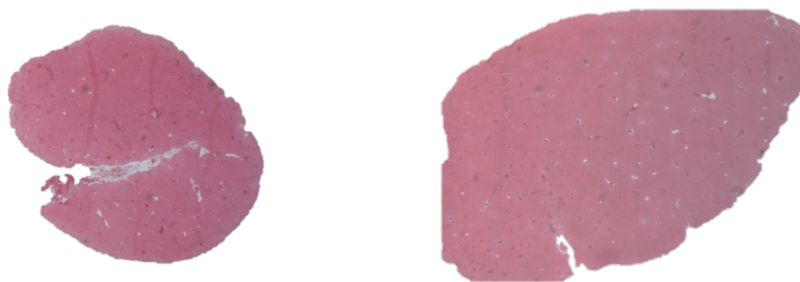


Fig.27 - Collage di acquisizioni e analisi d'immagine

2.3 ANALISI D'IMMAGINE

L'analisi d'immagine viene effettuata per verificare la significatività di bioaccumulo tramite lo studio dell'area superficiale relativa occupata dai centri melanomacrofagi rispetto alla superficie totale della porzione di fegato esaminata ($\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ parenchima epatico), considerando: il loro numero/ mm^2 nel parenchima epatico e la loro area media (μm^2). Successivamente è stato creato un dataset, utile alla statistica e all'elaborazione di dati (Fig.28). È possibile effettuare lo stesso tipo di elaborazione utilizzando diversi software open source; nel nostro caso, sono stati misurati utilizzando il software di analisi delle immagini Leica Application Suite (LAS). Di seguito alcuni esempi di elaborazione di analisi d'immagine (Fig.29).

| Cala | Progr | Età | Sesso | Liver Sup | MMC/liv sup | Somma MMC | N° MMC | N°/liv.sup | MMC/N° |
|---------|-------|-----|-------|-----------|-------------|-----------|--------|------------|--------|
| AREA 14 | 2 | 1 | F | 2,49 | 42,54 | 105,88 | 4 | 1,61 | 26,47 |
| AREA 14 | 3 | 1 | F | 10,99 | 16,35 | 179,60 | 7 | 0,64 | 25,66 |
| AREA 14 | 16 | 1 | F | 2,86 | 34,84 | 99,51 | 5 | 1,75 | 19,90 |
| AREA 14 | 17 | 1 | M | 10,84 | 6,50 | 70,49 | 5 | 0,46 | 14,10 |
| AREA 14 | 18 | 1 | F | 2,25 | 10,48 | 23,56 | 2 | 0,89 | 11,78 |
| AREA 14 | 22 | 1 | F | 4,15 | 34,59 | 143,56 | 7 | 1,69 | 20,51 |
| AREA 14 | 23 | 1 | F | 12,31 | 3,46 | 42,58 | 1 | 0,08 | 42,58 |
| AREA 14 | 28 | 1 | M | 3,88 | 43,39 | 168,57 | 6 | 1,55 | 28,10 |
| AREA 14 | 30 | 1 | M | 4,45 | 33,00 | 146,77 | 5 | 1,12 | 29,35 |
| AREA 14 | 31 | 1 | M | 4,94 | 16,78 | 83,00 | 5 | 0,81 | 16,60 |
| media | | | | | 24,19 | | | 1,06 | 23,51 |
| err.st. | | | | | 4,77 | | | 0,18 | 2,84 |

| M | N | O | P | Q | R | S | T | U |
|---------------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Liver Sup. tot/ Mm2 | Quant. MMC | MMC 1/ micron | MMC 2/ micron | MMC 3/ micron | MMC 4/ micron | MMC 5/ micron | MMC 6/ micron | MMC 7/ micron |
| 3,2442733 | 2 | 15,28908 | 22,78279 | | | | | |
| 5,855994 | 1 | 20,51782 | | | | | | |
| 14,8400219 | 7 | 21,88144 | 9,867596 | 13,21603 | 28,23723 | 13,4218 | 76,64924 | 14,1324 |
| 4,241811 | 3 | 21,75548 | 32,25909 | 51,05897 | | | | |
| 20,262138 | 5 | 31,81014 | 20,67051 | 26,88102 | 49,44754 | 20,40504 | | |
| 19,263105 | 4 | 26,86231 | 13,84069 | 17,3775 | 21,49712 | 33,20421 | 9,33466 | |
| 38,233732 | 13 | 15,01184 | 15,3392 | 10,3072 | 19,43231 | 15,93783 | 16,64865 | 17,33143 |
| 5,8923223 | 8 | 11,62599 | 14,40388 | 17,81779 | 9,06324 | 20,47628 | 37,4501 | 115,1843 |
| 15,3105862 | 7 | 11,6447 | 13,79435 | 8,427208 | 8,530093 | 57,60619 | 42,14539 | 18,39769 |
| 5,2768719 | 4 | 10,03995 | 48,54062 | | | | | |
| 27,8570212 | 4 | 11,58858 | 35,78524 | 59,18687 | | | | |
| 21,3821697 | 5 | 35,08375 | 25,54093 | 48,64455 | 46,21402 | 37,17886 | | |
| 6,0489564 | 10 | 22,10355 | 13,71175 | 19,87349 | 41,1446 | 34,25132 | 33,80236 | 17,60247 |
| 7,8140203 | 5 | 6,27847 | 21,89765 | 16,50322 | 18,67152 | 47,86154 | | |
| 4,111187 | 12 | 62,58207 | 70,27973 | 22,42891 | 28,58329 | 25,03844 | 47,60765 | 16,30258 |
| 10,917133 | 6 | 33,02605 | 13,88946 | 5,696082 | 11,88788 | 8,623625 | 9,84889 | |
| 23,7128824 | 5 | 53,25096 | 78,49182 | 11,38925 | 30,87482 | 30,11771 | | |
| 4,4059396 | 5 | 20,23991 | 11,41087 | 14,42338 | 9,091283 | 7,588657 | | |
| 15,2132778 | 1 | 10,3072 | | | | | | |
| 9,0524837 | 1 | 21,24105 | | | | | | |
| 5,6009517 | 5 | 28,38548 | 57,77654 | 20,71728 | | | 27,29256 | |
| 11,5306255 | 2 | 51,41439 | 13,13115 | | | 13,4031 | | |
| 5,5693351 | 3 | 9,652474 | 16,60188 | 41,13296 | | | | |
| 2,48883 | 4 | 19,00565 | 72,76768 | 6,491101 | 7,613482 | | | |
| 10,9177798 | 7 | 9,811477 | 33,52177 | 62,29213 | 48,01919 | 9,194168 | 7,332887 | 9,427997 |
| 12,47498 | 3 | 30,42622 | 8,546422 | 66,25787 | | | | |
| 15,2676229 | 7 | 21,13817 | 13,45661 | 6,472395 | 14,8809 | 11,25187 | 20,80145 | 29,07901 |
| 3,5838787 | 2 | 346,2825 | 11,92529 | | | | | |
| 3,4583908 | 2 | 12,35554 | 14,7406 | | | | | |
| 4,40829 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 6,9207548 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 11,280008 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 2,8562272 | 5 | 10,29784 | 29,52796 | 21,85836 | 24,06571 | 13,75852 | | |

Fig.28 Export dati

La procedura utilizzata per l'analisi d'immagine segue diversi passaggi; per prima cosa, si osserva il vetrino e si quantificano le strutture cellulari che identificano il bioaccumulo, ovvero i centri melanomacrofagi; annotandolo nel format. Per ogni centro melanomacrofagico individuato, viene effettuata una acquisizione, (generalmente nelle sezioni di fegato di acciuga è stato utilizzato un ingrandimento 40x) avente la propria barra di riferimento. Dopo aver finito di osservare il vetrino e di acquisire tutti i MMC; lo step successivo è rappresentato dalla calibrazione, ovvero ogni acquisizione deve essere integrata e calibrata con il proprio software di analisi d'immagine.

Per un imaging di alta qualità e per realizzare facilmente annotazioni e misurazioni base, durante l'analisi d'immagine viene fatto un lavoro preliminare di "cleaning image"; consiste nella rimozione di artefatti ed eliminare eventuali difetti causati da sovrapposizione del tessuto stesso; in modo tale da rendere l'immagine più nitida e calcolare dati reali senza grossi margini di errori.

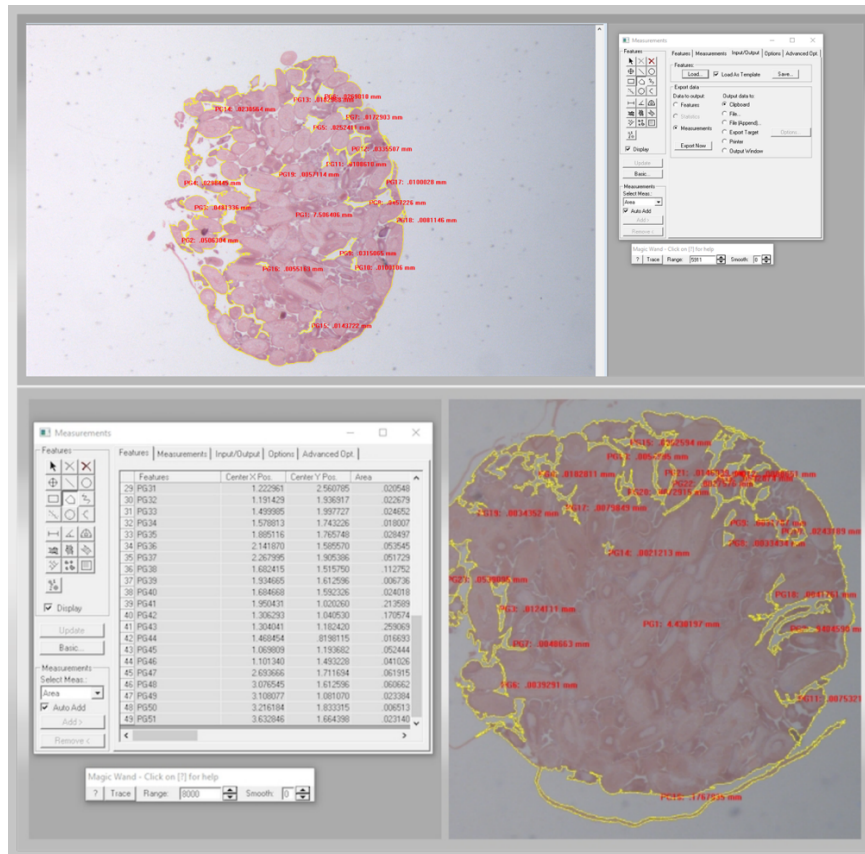


Fig.29 Esempio di analisi d'immagine effettuata su tessuto ovarico di acciuga europea.

Infine, dopo le varie elaborazioni che il software registra, si ha la possibilità di effettuare la funzione di "rinomina" di ogni singola misurazione effettuata, dando anche una certa numerazione (es.: artefact_1, artefact_2 , ecc..).

Lo step ultimo è rappresentato dall'export dati, trasponendo i dati in un file Excel e applicare ulteriori funzioni di base, come: somma, media standard, ecc..; quest'ultimi, saranno i primi dati preliminari utili all'analisi dei dati.

3. RISULTATI E OSSERVAZIONI

3.1.1 CENTRI MELANOMACROFAGI: MORFOLOGIA E FUNZIONE

I centri melano-macrofagici sono generalmente nodulari con una delicata capsula argirofila e generalmente strettamente adesi ai canali vascolari (Agius 1979a). I macrofagi sono normalmente

ravvicinati per formare grandi aggregati e vengono ingranditi dopo la fagocitosi attiva di materiali eterogenei, come detriti cellulari, pigmenti di melanina, granuli di emosiderina e residui di lipofuscina (Agius & Agbede 1984; Agius 1985), nonché goccioline lipidiche, aggregati proteici basici e mucopolisaccaridi neutri (Herraez & Zapata 1986).

L'aspetto morfologico dei centri melano-macrofagici può variare in diverse specie (Roberts 1975; Agius 1980, 1985), organi (Agius 1979b; Kranz & Peters 1984), e anche in diverse condizioni fisiologiche all'interno della stessa specie, come età, condizioni nutrizionali, decomposizione dei tessuti (Agius 1979a, 1981b, 1983; Agius & Roberts 1981; Kranz 1989), metabolismo del ferro e dell'emoglobina (Fulop & McMillan 1984), condizioni patologiche e infiammatorie (Roberts 1975; Ellis 1980; Vogelbein, Fournie & Overstreet 1987) e processi immunologici, incluso l'intrappolamento dell'antigene (Ellis 1980; Agius 1981b, 1985; Fulop e McMillan 1984). Sono stati inoltre dimostrati cambiamenti nel numero e nella capacità dei macrofagi causati da cambiamenti ambientali (Kranz & Gercken 1987; Fournie et al. 2001). Inoltre, Peters & Schwarzen (1985) hanno suggerito che lo stress stesso può indurre cambiamenti cellulari nei tessuti dei pesci, i cui effetti principali includono un aumento delle cellule simili ai macrofagi e una maggiore degradazione dei globuli rossi (AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases*, 2003, 26.9: 499-509.)

Sebbene l'aspetto microscopico dei centri melanomacrofagi dei pesci sia stato ripetutamente descritto in letteratura (Agius 1980, 1985; Herraez & Zapata 1986), si sa meno sulla loro struttura fine (Agius & Agbede 1984; Fulop & McMillan 1984; Wolke 1992). Dal punto di vista ultrastrutturale, i melanomacrofagi sono molto complessi (Roberts 1975). Hanno nuclei dentellati e un gran numero di vacuoli legati alla membrana contenenti una varietà di materiali. I granuli di pigmento spesso sembrano essere contenuti in gruppi in tali vacuoli, suggerendo la fagocitosi.

Ferguson (1976a) nei suoi studi ultrastrutturali della milza del rombo chiodato, *Scophthalmus maximus* (L.), descrisse la relazione dei centri con gli ellissoidi splenici. Si tratta di arteriole o capillari specializzati e comprendono un endotelio appiattito circondato da una guaina di macrofagi legati da una membrana fibrosa. Ferguson (1976b) ha anche dimostrato che nelle milze di rombo, i centri melano-macrofagici hanno una capsula definita, composta sia da elementi cellulari che acellulari, che li separano dagli elementi linfoidi circostanti. Secondo Ferguson i centri stessi sono composti da cellule con vari gradi di degenerazione, piene di densi detriti osmiofili. Il tessuto linfoide associato comprende cellule linfocitiche e tipiche plasmacellule, che occasionalmente mostrano interdigitazioni citoplasmatiche con fibre dendritiche strettamente accostate.

Le funzioni attribuite ai centri melano-macrofagici sono molte, incluso il ruolo di deposito del ferro che nei pesci splenectomizzati è assunto dai centri melano-macrofagici renali (Agius 1980).

Molti studi suggeriscono che la funzione generale dei centri è focalizzazione sulla distruzione, disintossicazione o riciclaggio di materiali endogeni ed esogeni (Ferguson 1976a; Ellis 1980; Herraez & Zapata 1986). Pertanto, una delle funzioni chiave dei centri melano-macrofagici è considerata essere il loro ruolo di discariche metaboliche per la ricollocazione dei detriti delle cellule indebolite o danneggiate, compresi i globuli rossi (Roberts 1975; Agius 1980; Fulop & McMillan 1984). Come ci si potrebbe aspettare in una struttura con tale funzione, è stato anche osservato che questi centri aumentano di dimensioni e numero man mano che i pesci invecchiano e i tessuti degenerano (Agius 1981a; Brown & George 1985).

I centri melano-macrofagici svolgono un ruolo importante nella risposta a materiali estranei, compresi gli agenti infettivi, in varie specie ittiche, inclusa l'acciuga europea (Fig.34).

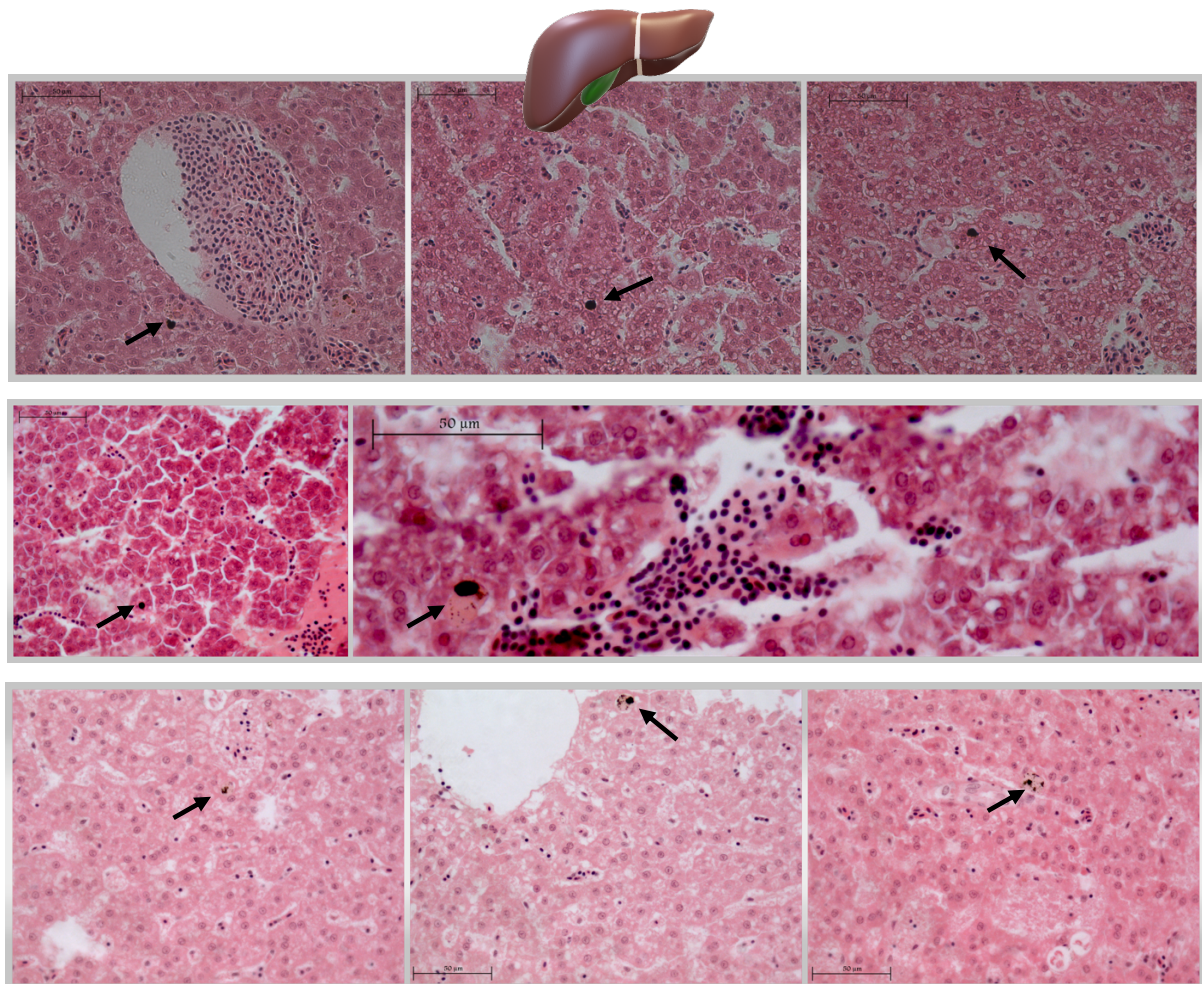


Fig.34 Centri melanomacrofagici - MMC in tessuto epatico di acciuga *E. encrasicolus*.

I MMC sono considerati anche indicatori di stress ambientale. Come nei vertebrati superiori, lo stress aumenta la suscettibilità dei pesci alle malattie. Questo effetto è accompagnato da cambiamenti nei globuli bianchi circolanti; il numero dei linfociti diminuisce mentre aumenta il numero dei granulociti. Gli effetti più importanti sono un aumento dell'abbondanza di cellule macrofagiche, una riduzione del numero di cellule emoblasti e linfociti e una maggiore degradazione dei globuli rossi (Peters & Schwarzen 1985). I pesci che vivono in un ambiente inquinato possono riflettere condizioni ambientali degradate attraverso un'attività alterata del sistema immunitario o delle difese non specifiche (Kelly-Reay & Weeks-Perkins 1994). Cambiamenti di dimensione dei centri melano-macrofagici possono verificarsi fisiologicamente, in associazione con l'invecchiamento, ma poiché esistono anche numerose evidenze di loro aumento di dimensione o, in alcuni casi, di riduzione di frequenza o dimensione nella milza o nel rene in relazione agli inquinanti, Wolke et al. (1995) hanno sostenuto in modo convincente il loro utilizzo come biomarcatori per la misurazione degli effetti di esposizione ambientale a sostanze chimiche inquinanti. Negli ultimi dieci anni, sono state condotte numerose indagini alla ricerca di indicatori istologici della qualità ambientale mediante la valutazione dello stress fisiologico nei pesci. Sebbene gli inquinanti ambientali possano causare direttamente la mortalità dei pesci, gli effetti subletali sono più comuni. È stata segnalata una maggiore prevalenza di varie malattie e parassiti in diverse popolazioni di pesci marini provenienti da acque contaminate (Bucke, Watermann & Feist 1984; Bucke, Vethaak & Lang 1992; Ahti Haaparanta, Valtonen, Hoffmann & Holmes 1996). Esistono anche prove che vari enzimi epatici che metabolizzano gli xenobiotici sono indotti nei pesci provenienti da sistemi acquatici inquinati (Stegeman 1978). Diversi autori hanno suggerito che il coinvolgimento dei centri melano-macrofagi in vari processi patologici e risultando indicatori sensibili di condizioni di stress nell'ambiente acquatico (Passantino et al 2014). Sono onnipresenti, ampiamente accessibili, facilmente misurabili e possono essere confrontati statisticamente utilizzando tecniche di analisi di immagine. Fournie et al. (2001) hanno intrapreso ampie e dettagliate valutazioni sull'utilità dei centri melano-macrofagici come indicatori generali dell'esposizione dei pesci ad ambienti degradati. Ciò si è rivelato uno strumento molto valido e ha permesso di stabilire una base di informazioni in relazione a diversi livelli di degrado ambientale all'interno di un'area geografica. In particolare, utilizzando apposite tecniche di analisi di immagine, è stato dimostrato che densità di MMC superiori a 40/mm² erano correlate all'esposizione a condizioni ipossiche o alla contaminazione chimica dei sedimenti (Fournie et al. 2001).

3.2. I CENTRI MELANOMACROFAGI: BIOMARCATORI DA XENOBIOTICI

Con il termine “biomarcatore” si intende qualsiasi parametro biochimico, strutturale, funzionale, comportamentale, o quant’altro sia misurabile all’interno di un organismo, che, in rapporto all’entità della grandezza misurata, possa essere riconosciuto come associato ad una potenziale o evidente modificazione dello stato di salute dell’organismo monitorato e, indirettamente, dell’ecosistema oggetto di biomonitoraggio. Normalmente si prendono in considerazione tre tipologie di biomarcatori: biomarcatori di esposizione, biomarcatori di effetto e biomarcatori di suscettibilità.

La specificità dei biomarcatori varia al variare del parametro indagato e del grado di integrazione, tendendo a diminuire all’aumentare dello stesso, cioè passando dal livello molecolare al livello di organo/apparato. È bene precisare che la mancanza di specificità non deve essere sempre considerata un difetto. In molte circostanze, infatti, è bene poter disporre di biomarcatori che siano sensibili ma aspecifici affinché possano rendere conto di un generico malessere ambientale, meritevole o meno di essere indagato con metodiche più specifiche e mirate alla luce dei dati fino a quel momento acquisiti (Manera et al, 2004).

I centri melanomacrofagi, per esempio, fanno parte dei biomarcatori da esposizione. In particolare, i MMC sono aggregati di macrofagi contenenti pigmenti rinvenibili fisiologicamente, para-fisiologicamente e patologicamente in diversi organi o tessuti dei pesci, con una distribuzione, una morfologia ed un contenuto in pigmenti variabili da specie a specie. Nei pesci ossei si rinvencono di norma a livello splenico, renale ed epatico. I macrofagi, di cui si compongono i MMC, possono contenere melanina, cromolipoidi (lipofuscina e ceroidi) ed emosiderina. Non è ancora chiaro il significato funzionale di tali strutture. Alcuni prospettano possano rappresentare l’equivalente ittico dei centri germinativi dei mammiferi, altri le considerano implicate nel metabolismo del ferro, altri come forme alternative alla classica reazione granulomatosa.

Indipendentemente dalla funzione svolta, è stato osservato, sia in condizioni sperimentali, sia in condizioni reali, una specifica risposta di tali aggregati all’esposizione dell’organismo ad agenti tossici, sia organici che inorganici. In particolare, è stato segnalato un aumento del numero e dell’area totale da loro occupata in sezioni di tessuto, rispetto a pesci di controllo, in pesci esposti agli effluenti di cartiera e ad inquinanti organici (PCB, benzopirene, ecc.). Nell’utilizzazione di tali biomarcatori è da tenere presente il fatto che il numero, la forma ed il contenuto in pigmenti può essere influenzato dalla stagione, dallo stato nutrizionale, dallo stato di salute, dalla temperatura, dal sesso e dallo stato riproduttivo. (Manera 2004).

Recentemente, è stato pubblicato uno studio che aveva come obiettivo di verificare l’idoneità dell’utilizzo dei centri melanomacrofagi (MMC) come biomarcatori di risposta all’inquinamento marino nell’acciuga europea. Questa idoneità è stata verificata analizzando la densità delle MMC e

l'espressione del citocromo P450 monoossigenasi 1A (CYP1A) nei fegati di acciughe provenienti da quattro aree dell'Italia meridionale. Le acciughe di età 2 campionate da tre aree esposte a inquinanti di origine industriale e/o agricola (Golfo di Gela (CL), Mazara del Vallo (TP) e Golfo di Napoli) hanno mostrato diverse aree del fegato occupate da MMC e numeri di MMC significativamente più alti rispetto a quelli delle acciughe di Pozzallo (RG), che è un'area marina non sottoposta ad alcuna fonte di inquinamento. L'immunoreattività anti-CYP1A è stata osservata negli epatociti di tutti i campioni prelevati dal Golfo di Gela. Questi risultati suggeriscono l'utilità delle MMC epatiche come biomarcatori di esposizione agli inquinanti in questo piccolo pesce pelagico. (Basilone, et al., 2018).

4. BIBLIOGRAFIA

AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases*, 2003, 26.9: 499-509.

AKIYOSHI, H., & Inoue, A. (2004). Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. *Zoological science*, 21(8), 841-850.

ANGELINI, Silvia. Valutazione degli stock di alici (*Engraulis encrasicolus*) e sardine (*Sardina pilchardus*) con metodi di dinamica di popolazione. PhD Thesis.

BASILONE, G., Gargano, A., Corriero, A., Zupa, R., Santamaria, N., Mangano, S., ... & Passantino, L. (2018). Liver melanomacrophage centres and CYP1A expression as response biomarkers to environmental pollution in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) from the western Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 131, 197-204.

GARGANO, A., et al. Tecniche di preparazione istologica di tessuti gonadici e analisi microscopica per la determinazione dello stato di maturità di *Engraulis encrasicolus*. 2023.

MANERA, M., & Borreca, C. (2004). Il biomonitoraggio degli ecosistemi acquatici. *IL PROGRESSO VETERINARIO*, 59(2), 64-67.

TAVOLAZZI, V. Belli fuori, brutti dentro? Caratterizzazione dello stato di salute della *Sardina pilchardus* in relazione allo stato di fegato, crescita e sforzo di pesca. 2021.

PASSANTINO, L., et al. "Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being." *Journal of Fish Diseases* 37.3 (2014): 241-250