



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Biologia Ambientale e Biodiversità

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche

SSD BIO/05

Introduzione di nuove metodologie per lo studio del benessere in acquacoltura.
Valutazione degli effetti dello stress e della somministrazione di integratori alimentari
in
Dicentrarchus labrax e *Sparus aurata*.



LA DOTTORESSA:

Maria Dioguardi

IL COORDINATORE:

Prof. Marco Arculeo

IL TUTOR:

Prof. Matteo Cammarata

CICLO XXVI

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2016

Indice

Indice

1. Introduzione.....	4
1.1. Il benessere animale	5
1.2. Lo Stress	7
1.3. Stress e acquacoltura	24
1.4. Il sistema immunitario dei Teleostei	33
1.5. Specie oggetto di studio.....	43
Obiettivi.....	45
2. Materiali e metodi.....	47
2.1. La valutazione della gerarchia sociale in <i>Sparus aurata</i>	48
2.2. La valutazione della gerarchia sociale in <i>Dicentrarchus labrax</i>	54
2.3. Effetti dell'esposizione ai metalli pesanti sul muco di <i>Sparus aurata</i>	57
2.4. Effetti della somministrazione nella dieta di vitamina D3 sul sistema immunitario di <i>Dicentrarchus labrax</i>	64
2.5. Analisi statistica.....	71
3. Risultati.....	72
3.1. Instaurarsi di una gerarchia di dominanza in <i>Sparus aurata</i>	73
3.2. Instaurarsi di una gerarchia sociale in <i>Dicentrarchus labrax</i>	85
3.3. Effetti dell'esposizione ai metalli pesanti sul muco di <i>Sparus aurata</i>	89
3.4. Effetti della somministrazione di vitamina D3 in <i>Dicentrarchus labrax</i>	100
4. Discussione.....	108
Considerazioni conclusive	123
Ringraziamenti	124
Appendice.....	125
Bibliografia.....	127

Introduzione

1. Introduzione

1.1. Il benessere animale

Negli ultimi anni l'interesse per la tutela del benessere animale, inclusi i pesci, ha coinvolto una larga parte dell'opinione pubblica, creando notevoli pressioni non solo nei confronti di produttori e della comunità scientifica, ma anche nei confronti delle istituzioni per la creazione di una legislazione in grado di garantire standard adeguati di "welfare". La creazione di regole condivisibili pone, come primo obiettivo, la nascita di una definizione comune del significato di "welfare", sebbene definire un tale concetto risulti per molti aspetti complesso (Dawkins, 1998). I tentativi sono stati molteplici e spesso hanno espresso posizioni determinate dai diversi approcci e dai punti di vista seguiti (Huntingford et al. 2006).

La percezione soggettiva, o mentale, dell'individuo è un requisito fondamentale per mantenere una condizione di benessere. In quest'ottica, quindi, le strategie per garantire il "welfare" non possono prescindere dalle caratteristiche individuali della specie e, nondimeno, dalla capacità dell'uomo di percepire e interpretare lo stato mentale dell'animale. A differenza di altre tipologie di allevamento, vi è una scarsità di informazioni scientifiche sul benessere dei pesci allevati in condizioni di acquacoltura intensiva.

Nel settore dell'acquacoltura, la sfida del mercato passa oggi, inevitabilmente, attraverso un aumento della qualità dei prodotti. Quest'aspetto riveste una notevole importanza per la tutela delle produzioni nazionali in un contesto, come quello mediterraneo ed europeo, fortemente competitivo. Fra i diversi aspetti con cui si caratterizza la qualità in acquacoltura, il benessere dei pesci in allevamento è di grande interesse generale e all'attenzione dell'opinione pubblica, non solo per questioni etiche, ma anche per ragioni economiche e di mercato. Infatti, mantenere animali in buona salute, oltre ad ottemperare alle questioni etiche e legislative, hanno una maggiore efficienza di conversione del cibo, minor tasso di mortalità, tassi di crescita ottimali e, infine, una migliore qualità delle carni. Effetti di eventi stressanti, più o meno prolungati, si riflettono anche sulle qualità fisiche delle carni, poiché l'aumento dell'attività muscolare (generalmente associata a tali condizioni), provoca l'utilizzazione delle energie di riserva ed induce uno stato di compromissione delle condizioni generali del benessere animale. Il **benessere degli animali** è un concetto apparentemente semplice, tuttavia, darne una definizione univoca in acquacoltura e, soprattutto, individuare i parametri in grado di misurarlo è un obiettivo piuttosto complesso ed è sempre aperto il dibattito sia sulla sua definizione che sulle misure più idonee per poterlo misurare.

Vi sono tantissime definizioni di benessere tra cui ricordiamo le seguenti:

- “welfare è un termine dal significato vasto, che comprende il benessere sia fisico che mentale dell'animale. I tentativi di valutarlo devono considerare l'evidenza scientifica disponibile relativamente alle sensazioni degli animali, evidenza che può derivare dalla loro struttura e funzioni, come pure dal loro comportamento” (Brambell Report, 1965);
- “è una situazione di salute completa, sia fisica che mentale, in cui l'animale è in armonia con il suo ambiente” (Hughes, 1976);
- “il welfare di un organismo è determinato dallo stato in cui si trova in relazione ai tentativi di adattarsi all'ambiente” (Broom, 1986);
- “il welfare di un animale fa riferimento alla qualità della sua vita e coinvolge molti elementi diversi, come la salute, la felicità e la longevità, a cui diverse persone attribuiscono differenti gradi di importanza” (Tannenbaum, 1991; Fraser, 1995);
- “è lo stato dell'animale nel tentativo di affrontare il suo ambiente naturale” (Fraser and Broom, 1990).

Il Farm Animal Welfare Council (FAWC) propone cinque principi per garantire un contesto di buone pratiche per il benessere degli animali non solo nell'allevamento ma anche durante il trasporto e la macellazione. Secondo le sue raccomandazioni, un animale deve godere dei seguenti diritti:

1. non deve patire la fame né la sete, grazie all'immediato accesso ad acqua potabile e a una dieta corretta che garantisca salute e vigore;
2. non deve patire disagi e malesseri, grazie a un ambiente di vita adeguato che comprenda un riparo e una comoda area riservata al riposo;
3. non deve patire dolore, ferite o malattie, grazie a un'attività di prevenzione, rapida diagnosi e trattamento;
4. deve essere libero di esprimere un comportamento normale, avendo a disposizione spazio sufficiente, strutture adeguate e la compagnia di animali della sua stessa razza;
5. non deve avere paura né subire stress, grazie a condizioni di vita e a un trattamento che ne impediscano la sofferenza psicologica.

Se le condizioni sopra descritte verranno rispettate, l'animale godrà di un benessere ottimale.

Le difficoltà nel valutare condizioni di benessere negli organismi acquatici allevati sono, inoltre, complicate dal fatto che l'acquacoltura intensiva è un'attività relativamente recente, se paragonata alle altre attività di zootecnia terrestre. Lo stato fisiologico, la salute e/o il comportamento dei singoli pesci sono stati spesso usati come indicatori di benessere, anche se le connessioni tra la risposta di un pesce a condizioni avverse (stress) ed il benessere non sono

semplici. Lo stress fisiologico non è, infatti, sempre sinonimo di sofferenza o di compromissione del benessere, e le risposte fisiologiche ad esso associate devono essere considerate prima di tutto una funzione di adattamento che, nel breve termine, ha il compito molto importante di preservare l'individuo così come l'intera popolazione. Tuttavia, differenti fonti di stress chimico e/o fisico, associate alla tipologia dell'ambiente naturale e/o di allevamento, possono agire su specifici percorsi biochimici, fisiologici e comportamentali, importanti per la salvaguardia dello stato di salute della specie selvatica e/o allevata, e per la sua sicurezza/qualità, quale prodotto alimentare. Diversi indicatori biologici, in grado di monitorare l'entità dell'impatto dello stress a differenti livelli di complessità strutturale, dalla molecola all'intero organismo, sono attualmente disponibili, sebbene la loro integrazione in uno schema diagnostico unitario è ancora piuttosto difficile.

1.2. Lo Stress

Lo stress è una modificazione abnorme o estrema nella fisiologia di un animale, che consente di fronteggiare stimoli avversi presenti nell'ambiente o nel management (Fraser and Broom, 1990). Cannon, agli inizi del secolo scorso, evidenziò che non solo le gravi alterazioni dell'omeostasi, ma anche le situazioni avvertite come potenzialmente dannose e che richiedono la mobilitazione di tutte le energie e le difese dell'organismo, determinano la liberazione di adrenalina e l'attivazione del sistema simpatico. Seyle nel 1936 propose la Sindrome da Adattamento (GAS) come modello descrittivo della reazione allo stress.

Sono distinti diversi tipi di stress. Lo stress è definito acuto quando è determinato da stimoli anche di elevata intensità ma di breve durata. Al contrario, l'applicazione ripetuta e durevole di stimoli, anche di lieve entità, provoca lo stress cronico. I pesci e gli altri animali acquatici sono soggetti a una grande varietà di agenti stressanti associati alle variazioni dei parametri ambientali quali la temperatura dell'acqua, la quantità di ossigeno disciolto, la salinità, la presenza di contaminanti oppure associati alla cattura, al trasporto, alla manipolazione, alla malnutrizione. In letteratura troviamo diversi studi che prendono in esame gli effetti di questi agenti stressanti sui parametri sierologici e sulla risposta immunitaria innata (Cammarata et al. 2012). In particolare, troviamo molti lavori che valutano gli effetti di sostanze inquinanti sui pesci e gli organi presi in considerazione generalmente sono il fegato, e l'intestino (Smith et al. 2007). Negli ultimi anni alcuni ricercatori hanno cominciato a studiare gli effetti di fattori stressanti sulle proprietà biologiche del muco in quanto rappresenta nei pesci, insieme alla cute, la prima barriera di difesa (Guardiola et al. 2014).

Inoltre, molto spesso è stata sottovalutata l'importanza che potrebbero avere le interazioni sociali

che si instaurano tra gli animali. Lo stato sociale potrebbe essere un potente fattore di stress e in quanto tale potrebbe portare a gravi alterazioni del comportamento e della fisiologia dei pesci. Il pesce risponde ai diversi stimoli stressanti mediante la secrezione degli “ormoni dello stress”, cortisolo e catecolamine, questi inducono dei cambiamenti metabolici a breve termine con azioni a livello tissutale ed ematico che possono portare ad una risposta secondaria e terziaria a lungo termine con alterazioni del comportamento, dell’immunità, della crescita e della riproduzione (stress cronico). Non è però semplice legare i concetti di benessere e di stress. E’ possibile che le risposte di adattamento allo stress (risposta primaria e secondaria) possano causare sofferenza. E’ invece certo che le risposte allo stress cronico (risposta terziaria) indicano un benessere alterato. I pesci hanno un’ampia serie di strategie adattative, comportamentali e fisiologiche, che permettono loro di superare situazioni potenzialmente dannose. In risposta ad un fattore stressante, il pesce manifesta cambiamenti a livello biochimico e fisiologico che hanno lo scopo di aumentare la disponibilità ed il consumo di energia. Tali cambiamenti possono generare effetti immediati (ad esempio sul sistema cardio-respiratorio e sull’osmoregolazione), oppure effetti a lungo termine che coinvolgono l’organismo e la popolazione intera (Gratzek, 1984). Le situazioni stressanti determinano una cascata di eventi quali aumento di cortisolo ematico (Sapolski et al. 2000), secrezione di adrenalina e noradrenalina (Randall et al. 1992) e immunosoppressione (Vazzana et al. 2010). Il concetto di benessere è strettamente legato a quello di profilassi, soprattutto a quello di profilassi diretta; questo concetto sottintende una serie di procedure che mantengono il livello di benessere in impianto il più elevato possibile. In allevamenti intensivi, gli animali sono sottoposti a condizioni di stress che indeboliscono il sistema immunitario, aumentando la suscettibilità ai patogeni e favorendo l’insorgenza di malattie. Tradizionalmente, le strategie per il controllo e la prevenzione delle malattie in acquacoltura si basano sull’impiego di vaccini, antibiotici e chemioterapici. La somministrazione di antibiotici può favorire lo sviluppo di ceppi batterici resistenti e anche influenzare negativamente la salute dei pesci, così come possono avere delle conseguenze ambientali (Austin and Austin, 2007). Inoltre, l’aggiunta agli alimenti di dosi sub-terapeutiche di antibiotici per stimolare la crescita, ha contribuito enormemente allo sviluppo della resistenza (Hernández, 2005). Negli ultimi anni, si è cercato di ridurre in Europa l’uso di agenti chemioterapici (soprattutto antibiotici e fattori di crescita) nella produzione animale. Pertanto, per ottimizzare la nutrizione e prevenire le malattie si sta cercando di produrre diete con prodotti naturali (Kiron, 2012; Oliva-Teles, 2012) convenienti sia per il produttore che per il consumatore senza alterare il valore nutrizionale del pesce e senza provocare effetti indesiderati sulla salute umana. In questo contesto, il rafforzamento dei meccanismi di difesa del pesce attraverso la somministrazione

profilattica di immunostimolanti, probiotici, prebiotici e altre sostanze naturali è uno degli approcci più promettenti per migliorare la redditività dell'acquacoltura (Nayak, 2010). Questi ingredienti, che possono essere di origine molto diversa, possono migliorare la risposta immunitaria dei pesci, conferire una protezione contro vari agenti patogeni e ridurre al minimo il rischio associato all'uso di sostanze chimiche (Magnadottir, 2010).

Stress nei pesci

I pesci sono vertebrati eterotermi acquatici che sono influenzati in maniera particolare dall'ambiente; la loro salute è funzione del loro ambiente. Le situazioni di stress influenzano la capacità dei pesci a reagire alle successive o concomitanti svariate minacce ambientali. In allevamento l'individuo è continuamente sollecitato per cui deve cercare di mantenere un equilibrio omeostatico se non vuole soccombere. Quando una certa soglia di rischio viene superata l'animale diventa stressato da un agente perturbante.

In comune con gli altri vertebrati, i pesci dispongono di un'ampia serie di strategie adattative, comportamentali e fisiologiche, che permettono loro di superare situazioni potenzialmente dannose. Sebbene vi siano numerose differenze tra l'ambiente acquatico e quello terrestre, e altre differenze a livello di sistema endocrino dei pesci rispetto a quello dei vertebrati superiori, nel complesso la risposta allo stress avviene secondo modalità molto simili (Wendelaar Bonga, 1997). Esiste un'abbondante letteratura sui fenomeni e sui fattori in grado di indurre condizioni di stress nei pesci, i cosiddetti agenti stressanti, e ancora più abbondanti sono gli studi inerenti le diverse forme di risposta allo stress. In risposta ad uno stress, il pesce manifesta una serie di cambiamenti a livello biochimico e fisiologico che hanno lo scopo di aumentare la disponibilità ed il consumo di energia. Tali cambiamenti possono generare effetti immediati e di breve durata (ad esempio sul sistema cardio-respiratorio e sull'osmoregolazione), oppure effetti a lungo termine che coinvolgono l'organismo e la popolazione intera.

Queste reazioni allo stress, mediate dal sistema neuro-endocrino, possono essere così schematizzate:

- **risposta primaria:** percezione e riconoscimento dell'agente stressante, attivazione del sistema simpatico-cromaffine e dell'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale con conseguente rilascio in circolo di catecolamine e corticosteroidi;
- **risposta secondaria:** effetti immediati provocati dagli stimoli neuroendocrini, quali aumento della gittata cardiaca, aumento della capacità respiratoria, mobilitazione di substrati energetici e alterazione dell'equilibrio idrominerales;
- **risposta terziaria:** effetti sull'animale quali: cambiamenti del comportamento, inibizione della

crescita, della risposta immunitaria, del successo riproduttivo e della capacità di resistere all'azione di ulteriori agenti stressanti (Gratzek, 1984). Esiste, ad esempio, una risposta comportamentale allo stress, che può essere considerata la più immediata a situazioni di pericolo o disagio di varia natura: fuga da un predatore o conflitti di tipo sociale. Le risposte più comuni implicano cambiamenti nella velocità o nella direzione del nuoto (Juell et al. 2004) o nel "display" (Suter et al. 2002). Esistono anche casi di risposte comportamentali provocati da infestazione di parassiti, come ad esempio nel salmone atlantico (*Salmo salar*) (Furevik et al. 1993). Nella maggior parte dei casi, gli stessi stimoli che innescano una risposta di tipo comportamentale, danno anche inizio alla più complessa risposta fisiologica allo stress.

Le situazioni stressanti determinano una cascata di eventi; condizioni di stress causano aumenti di cortisolo e immunosoppressione (Vazzana et al. 2002). La classica risposta allo stress comporta sia il rilascio di catecolamine che di corticosteroidi (Sapolski et al. 2000) sia cambiamenti nelle attività fisiologiche e immunologiche (Cammarata et al. 2012). Il sistema simpatico-cromaffine corrisponde al sistema simpatico-surrenomidollare dei mammiferi ed è composto dal sistema autonomo simpatico e dalle cellule cromaffini situate a livello del rene anteriore. Dopo stimolazione simpatica i neuroni adrenergici e le cellule cromaffini, rispettivamente a livello sinaptico e nel sangue, rilasciano adrenalina e noradrenalina (Randall et al. 1992). Questi neurotrasmettitori agiscono generando un aumento della glicemia (glicogenolisi) e della pressione sanguigna, della velocità di perfusione branchiale, cerebrale e muscolare, nonché un aumento degli scambi gassosi a livello branchiale. Questa maggior ossigenazione del sangue va a scapito della capacità osmoregolatoria del pesce, poiché in questa situazione viene favorita l'irrorazione delle lamelle, ma limitata quella dei filamenti branchiali, sede delle cellule a cloruro, ad attività osmoregolatoria. Questo tipo di risposta, seppur immediata è di notevole intensità (picco ematico in 30 sec), è di breve durata in quanto la *clearance* di questi ormoni nel sangue è molto rapida (< 30 min.). L'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale è l'equivalente del sistema ipotalamo-ipofisi-corticossurrenale presente nei mammiferi e può essere considerato come uno degli elementi più altamente conservati della risposta allo stress nei vertebrati (Lankford et al. 2003). Esso si basa sull'interazione regolatoria delle cellule secretorie dell'ipotalamo sull'adenoipofisi e sulle cellule interrenali del rene cefalico. Le cellule dell'ipotalamo, a seguito di uno stimolo stressante, rilasciano la corticotropina o CRH, un neuropeptide che va a stimolare le cellule dell'adenoipofisi a produrre ACTH (ormone adrenocorticotropo), che a sua volta attiva la sintesi e il rilascio di corticosteroidi da parte delle cellule interrenali del rene anteriore (Fig. 1).

Il corticosteroide principalmente prodotto nei teleostei è il **cortisolo** il quale determina

cambiamenti fisiologici e metabolici negli organi bersaglio tali da completare e rinforzare l'azione svolta dalle catecolamine. Questi cambiamenti sono meno immediati ma di durata maggiore rispetto alle catecolamine. Ciò suggerisce che il cortisolo giochi un ruolo di fondamentale importanza nel prolungare la risposta allo stress nel tempo, anche dopo la fine dell'azione diretta dell'agente stressante sull'organismo (Vijayan et al. 1994). Si suppone che il sistema simpatico-cromaffine e l'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale siano in stretto rapporto tra di loro, così da suggerire la possibile esistenza nei pesci di un controllo paracrino tra i due sistemi (Reid et al. 1996).

Inoltre, condizioni di stress determinano nei pesci significative modificazioni del metabolismo energetico, infatti lo stress provoca un adattamento ed una redistribuzione dell'energia a favore di attività quali il ripristino dell'omeostasi, la respirazione, il movimento; contemporaneamente si assiste spesso ad una diminuzione della crescita del pesce dovuta ad una diminuzione nell'assunzione del cibo e ad una minore capacità di assimilazione degli alimenti a causa delle lesioni intestinali causate dalle condizioni stressanti (Gregory et al. 1999).

Il cortisolo plasmatico è il principale corticosteroide presente nei pesci teleostei ed è usato come indicatore della condizione di stress. Il cortisolo viene secreto dalle cellule interrenali distribuite nella regione superiore del rene a seguito di stimoli stressanti quali la manipolazione, il confinamento ed altre forme di disturbo. Il cortisolo gioca un ruolo significativo nella crescita e nella riproduzione. Esso è iperglicemizzante e stimola la glicolisi e la gluconeogenesi.

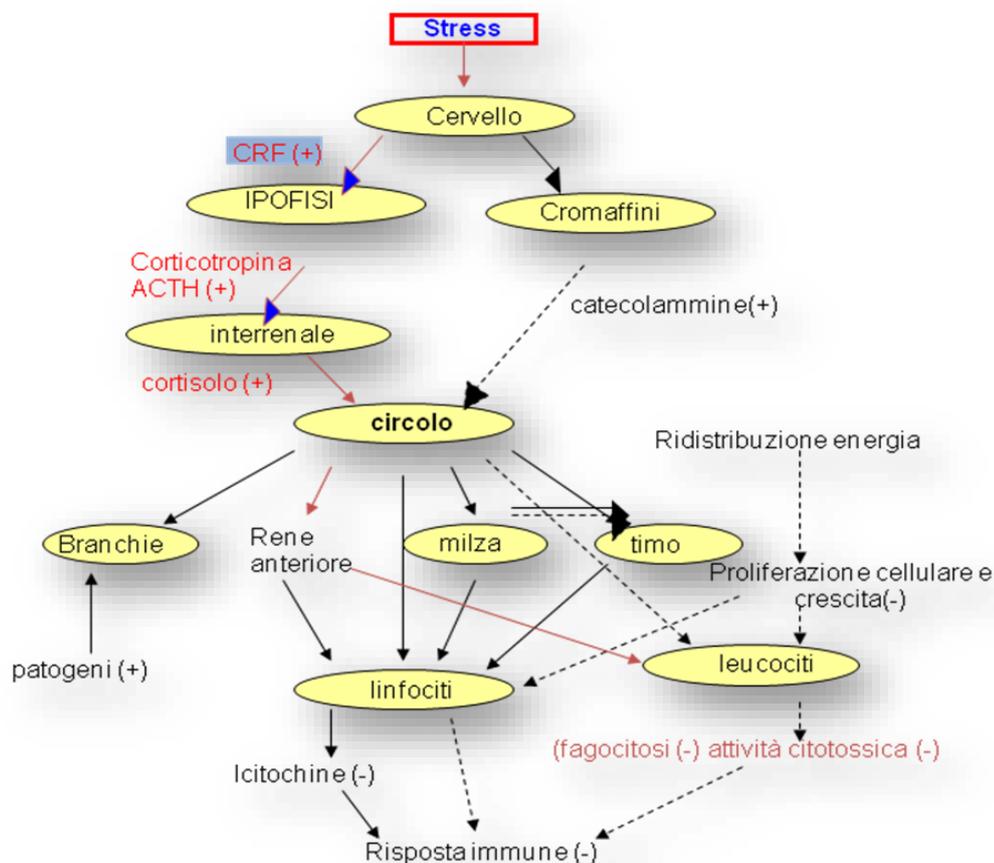


Fig.1: Interconnessione tra il sistema nervoso, il sistema endocrino e il sistema immunitario nei pesci.

Stress sociale

Quando parliamo di fattori stressanti molto spesso facciamo riferimento a fattori di natura fisica come la manipolazione o di natura chimica come la presenza di agenti inquinanti nell'ambiente in cui il soggetto che stiamo studiando vive, tralasciando uno dei fattori di stress molto importante ovvero le interazioni sociali che si instaurano all'interno di una popolazione.

Lo stress sociale è comune in molte specie animali e tipicamente è determinato dalla competizione per le risorse quali il cibo, l'acqua, lo spazio o l'accesso ai partners riproduttivi.

Lo stress sociale può essere causato o dalla presenza di un intruso o dall'isolamento sociale. Le risposte allo stress sociale dipendono dalle caratteristiche della specie, dal sesso, dall'età. In generale lo stress sociale riduce l'aggressività e rafforza la difesa. Comportamenti sociali e sessuali possono essere ridotti. Moltissimi modelli animali sono stati sviluppati per valutare la naturale tendenza di differenti specie animali a formare gerarchie sociali quando vivono in gruppo. In letteratura troviamo molti studi condotti su topi, ratti, e sui primati non umani in quanto questi animali, evolutivamente vicini alla specie umana, presentano delle caratteristiche comuni agli umani per cui questi modelli possono essere applicati per studiare i disordini

collegati allo stress sociale negli uomini. Nei topi è stato visto che condizioni di stress sociale aumentano la produzione di specie reattive dell'ossigeno e aumentano nel siero la concentrazione di corticosterone e nell'urina l'escrezione di biopirrine (Miyashita et al. 2006). Inoltre, un altro lavoro ha dimostrato che topi sottoposti a condizioni di stress sociale erano colpiti da ischemia cerebrale (Nobuo Sugo et al. 2001). Nei maiali condizioni di stress sociale avevano ripercussioni sul sistema immune ovvero determinavano un decremento nella produzione di anticorpi e un aumento della produzione di neutrofili (Julie et al. 1994). In un lavoro del 2002 è stato dimostrato che la coesistenza di due maschi di *Tupaia* per un certo periodo di tempo determinava la formazione di un dominante e di un subordinato, il quale mostrava cambiamenti nel sistema nervoso centrale e nell'attività neuroendocrina (Fuchs, 2002). Nelle scimmie in condizioni di stress viene ridotta l'espressione dei geni che codificano per i recettori mineralcorticoidi e glucocorticoidi (Arabadzisz et al. 2009). Nei topi la presenza di conspecifici nella gabbia causava dei comportamenti di ansietà e di depressione simili a quelli che si verificano negli uomini (Kinsey et al. 2006). In un altro lavoro è stato osservato che maschi di topi sottoposti a condizioni di stress presentavano un comportamento sessuale alterato (D'Amato et al. 2001). I modelli animali di stress sociale possono essere suddivisi in due grandi gruppi: il "resident-intruder" e la "social hierarchy" oppure il "model colony". Per quanto riguarda i pesci in letteratura troviamo che la maggioranza degli esperimenti che sono stati fatti hanno valutato lo stress sociale sui ciclidi africani i quali presentano una struttura sociale abbastanza complessa e molto stabilizzata (Clement et al. 2005; Early et al. 2006) e nei salmonidi. Nei salmonidi e in particolare nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) le interazioni sociali determinano la formazione di una gerarchia di dominanza in cui il pesce dominante mostra una maggiore aggressività e ha la priorità nell'accesso al cibo rispetto al pesce subordinato (Gilmour, 2005). Inoltre in esperimenti di confinamento in coppie di individui di *Salmo trutta* e di *Oncorhynchus mykiss* si stabilivano delle gerarchie sociali in cui il pesce subordinato presentava concentrazioni maggiori di cortisolo rispetto all'individuo dominante (Sloman et al. 2000). Nelle coppie di trota iridea, la posizione di pesci all'interno di una vasca, l'attività locomotoria, il comportamento agonistico, l'alimentazione, e i livelli plasmatici di cortisolo sono stati utilizzati come criteri per stabilire la dominanza sociale (Pottinger et al. 2001). Nei pesci lo stress sociale può determinare drastici cambiamenti nella fisiologia e nel comportamento (Sloman et al. 2002; Martins et al. 2006; Fernandens de Castilho et al. 2008; Edeline et al. 2010). Per gli individui socialmente dominanti, l'"effetto vincitore" è alla base di una maggiore probabilità di vincere i successivi incontri (Rutte et al. 2006). Al contrario, la mancanza di controllo dei pesci socialmente subordinati potrebbe comportare un aumento dei livelli di cortisolo e gli effetti dello stress terziario (Galhardo et al.

2009). Inoltre, interazioni sociali determinano gerarchie in cui il pesce dominante occupa le posizioni più proficue (Sloman et al. 2002). La formazione di gerarchie sociali determinano nei soggetti subordinati l'inibizione dell'appetito (Kramer et al. 1999; Meerlo et al. 1997; Øverli et al. 1998.), una ridotta aggressività (Blanchard et al. 1995; Höglund et al. 2001), la diminuzione del comportamento riproduttivo (D'Amato, 1988; Perret, 1992), e migliorati comportamenti di sottomissione e di difesa verso i conspecifici (Blanchard et al. 1993; Siegfried et al. 1984). Il contatto tra i pesci conspecifici non promuove assuefazione (Fernandes de Castilho et al. 2008). Cambiamenti nei livelli di aggressività e sono utilizzati come indicatori del benessere. In acquacoltura, lo stress indotto dal confinamento e da un'alta densità di popolazione aumenta i livelli plasmatici di cortisolo nel sangue della popolazione, di glucosio, e aumenta l'osmolarità. Fattori di stress diminuiscono il burst respiratorio e l'attività citotossica dei leucociti della parte anteriore del rene e della cavità peritoneale dei pesci (Vazzana et al. 2002). Inoltre, esperimenti *in vitro* e *in vivo* hanno mostrato che i livelli di cortisolo aumentati influenzano la fagocitosi attraverso il D1GR1 recettore citosolico nel branzino (Vizzini et al. 2007). Questo recettore è stato localizzato nei tessuti della parte anteriore del rene, nella milza, branchie, intestino, cuore e fegato (Vazzana et al. 2008). Cammarata et al. (2012) ha dimostrato che lo stress sociale influenza le cellule della cavità peritoneale, in particolare l'attività fagocitica e il burst respiratorio diminuiscono in maniera significativa negli individui subordinati rispetto agli individui dominanti.

dedotto che solo dosi farmacologiche di cortisolo, per tempi molto prolungati, causano un'evidente azione depressiva sui leucociti (Esteban et al. 2004). Studi condotti utilizzando topi da laboratorio sottoposti a scontri sociali, si è visto che l'individuo subordinato presentava livelli ridotti di cellule T e di cellule *natural killer* (NK) rispetto ai soggetti controlli; inoltre è stato visto che i maschi subordinati erano 10 volte più esposti all'insorgenza dei tumori a causa di una ridotta funzionalità delle cellule NK di prevenire lo sviluppo di metastasi (Stefanski, 2001). Lo stress sociale nei topi aggrava l'infiammazione allergica delle vie aeree alterando la funzionalità delle risposte immunitarie innate (Bailey, 2009). Criceti siberiani (*Phodopus sungorus*) sottoposti a stress sociale presentavano un decremento dei livelli delle immunoglobuline G (IgG) (Avitsus et al. 2002). Studi condotti sugli esseri umani hanno rivelato che lo stress può influenzare fortemente sia l'immunità innata (Redwine et al. 2003), sia l'immunità adattativa (Sommerhoff et al. 2010). Condizioni di stress possono determinare un aumento del numero di neutrofili e piastrine, e una diminuzione del numero di eosinofili, monociti e basofili (Qureshi et al. 2002). L'attivazione della risposta a questo tipo di stress è stata associata con una riduzione del numero di cellule natural killer (NK) (Isowa et al. 2004). Lo stress sociale cronico è stato associato ad un aumento dei neutrofili ed un riduzione del numero di cellule B, cellule T citotossiche e cellule NK (McKinnon et al. 1989), così come ad un calo nella capacità citotossica di cellule NK (Irwin et al. 1988a). È stato anche trovato che stress sociali possono indurre un fenotipo immaturo delle cellule dendritiche attraverso la secrezione di potenti mediatori neuroimmuni come i glucocorticoidi, le catecolamine e le citochine (Piemonti et al. 1999). Inoltre, è stato dimostrato in vitro che glucocorticoidi impediscono la maturazione e il corretto funzionamento delle cellule dendritiche (Rozkova et al. 2006). Tuttavia, altri studi hanno trovato che alcuni tipi di stress possono innescare l'immunostimolazione della risposta immunitaria, indurre l'attivazione di cellule dendritiche e determinare un aumento della loro efficacia come cellule che presenta l'antigene (Saint-Mézard et al. 2003). È stato osservato anche che lo stress può influenzare le citochine proinfiammatorie (Segerstrom et al. 2004). Lo stress indotto dalla cura in pazienti affetti da demenza può aumentare i livelli d'interleuchina-6 (IL-6) fino a quattro volte (Kiecolt Glaser et al. 2003). In un campione di persone senza fissa dimora, Arranz et al. (2009) ha riscontrato una riduzione in la capacità migratoria e fagocitaria dei neutrofili, una capacità inferiore di proliferazione dei linfociti, bassi livelli d'interleuchina-2 e una ridotta attività di cellule NK (Arranz et al. 2009). In uno studio comparativo condotto su pazienti affetti da dolore cronico, è stato trovato che i pazienti più stressati presentavano una minore risposta delle cellule Th1 (Kaufmann et al. 2007). In situazioni di stress è stato osservato un aumento del numero di citochine rilasciate da cellule di tipo T helper 2 (Th2) (Marshall et al. 1998). Più di

cinquant'anni fa, Rudolph Moos ha proposto che lo sviluppo di artrite reumatoide (una malattia autoimmune) è stata correlata ad alcuni tratti della personalità, quali il perfezionismo, il sacrificio e la negazione dei conflitti (Moos, 1964). Come affermato in precedenza, esistono notevoli differenze nel modo in cui gli individui percepiscono e rispondono agli stimoli ambientali. Le differenze individuali nella cognizione, emozione e comportamento sembrano anche svolgere un ruolo potenzialmente importante nella modulazione della risposta immunitaria. È stato osservato che differenze individuali nel livello di ansia innescate da una situazione di stress sono correlate con una significativa riduzione della capacità citotossica di cellule NK, o con un calo nel numero dei monociti (Ironson et al. 1990; Jamner et al. 1988). La necessità di comprendere la relazione tra lo stress e il sistema immunitario negli esseri umani ha determinato lo sviluppo di modelli animali per studiare le cause e meccanismi coinvolti nello sviluppo delle patologie legate allo stress. E' stato osservato che lo stress acuto sociale può causare un aumento della capacità d'infiltrazione di leucociti nella zona di attivazione immunitaria e un aumento del numero di macrofagi e neutrofili (Bailey et al. 2007; Viswanathan et al. 2005), mentre lo stress sociale cronico diminuisce il numero, il traffico e l'infiltrazione dei leucociti (Sutherland, 2006). È stato anche osservato che il prolungamento di condizioni di tensione sociali porta a un aumento dei livelli di interleuchina 1b (IL-1 β) nell'ipotalamo (Barnum et al. 2008). Questo effetto sulle interleuchine proinfiammatorie è specifico per il tipo di struttura cerebrale studiato e il tipo di stress applicato (Plata-Salaman et al. 2000). Per quanto riguarda la risposta immunitaria, è stato dimostrato, ad esempio, che lo stress cronico altera l'equilibrio dei linfociti Th1 e Th2 (Frick et al. 2009). Stress sociale può anche innescare una diminuzione della capacità proliferativa di linfociti T e della capacità proliferativa delle cellule NK (Beitia et al. 2005; Stefanski et al. 1996). Diversi studi affermano che i mediatori principali degli effetti dello stress sull'immunità, indipendentemente dal fatto che tali effetti siano positivi o negativi, sono gli ormoni glucocorticoidi e le catecolamine (Besedovsky et al. 1996).

Stress e performance di nuoto

Tra le varie risposte allo stress che i pesci possono manifestare, i cambiamenti a livello dell'attività di nuoto hanno suscitato notevole interesse da parte della comunità scientifica (Nelson et al. 1996; Wood et al. 1996; Alsop e Wood, 1997; Koumoundouros et al. 2002). Infatti, il nuoto è, insieme ad altre funzioni di base, fondamentale per tutte le attività vitali del pesce, dalla ricerca del cibo e del partner, alla fuga dai predatori e dalle situazioni di pericolo.

Le modalità e le attività di nuoto sono dipendenti dai caratteri specie-specifici ed individuali, quali ad esempio la forma del corpo e delle pinne (Webb, 1984; Wardle et al. 1995), lo stato ontogenetico e la taglia (Hale, 1999; Georgalas et al. 2006), lo stadio di maturità sessuale dell'individuo (Quintella et al. 2004).

I differenti tipi di nuoto nei pesci sono stati classificati da Beamish (1978) come: nuoto prolungato, nuoto sostenuto e nuoto esplosivo. Nello specifico, il nuoto prolungato è caratterizzato dal mantenimento di una velocità costante per periodi di tempo prolungati (>200 minuti). Questa tipologia di nuoto è quasi esclusivamente sostenuta dall'attività del muscolo rosso e non prevede il raggiungimento della condizione di affaticamento. Gli animali, infatti, sono in grado di rimetabolizzare i sottoprodotti dell'attività muscolare (lattato) e, quindi, di recuperare anche l'acidosi muscolare. Normalmente, la cessazione di tale attività è legata alla mancanza di riserve energetiche. Il nuoto sostenuto riguarda, generalmente, tutte le attività routinarie di nuoto di quasi tutte le specie e può essere mantenuto per un intervallo di tempo più breve, non superiore ai 200 minuti. Questa tipologia di nuoto termina con l'affaticamento, che viene raggiunto perché il pesce non è più in grado di recuperare l'energia dispersa durante il nuoto. La spinta propulsiva è assicurata dal contemporaneo coinvolgimento della muscolatura rossa e di quella bianca. Diversamente da queste due tipologie, il nuoto esplosivo può essere sostenuto per tempi molto brevi (<20 secondi). È, infatti, supportato maggiormente dal metabolismo anaerobico e, di conseguenza, principalmente dall'attività del muscolo bianco. Questa classificazione generica permette, attraverso particolari test di laboratorio, di stimare la spesa energetica e di valutare le risposte biochimiche associate al nuoto (metabolismo aerobico e anaerobico). Si distinguono quattro tipologie di test di nuoto: esercizi di *endurance*, di *fast start*, esaustivi e di recupero. In particolare gli esercizi esaustivi sono stati per lo più utilizzati per valutare i cambiamenti biochimici che si instaurano al raggiungimento della condizione di affaticamento. Nella maggior parte dei casi i test esaustivi si conducono imponendo incrementi discreti di velocità dell'acqua fino all'affaticamento del pesce, si parla quindi di test di "velocità critica di nuoto" (Ucrit). L'Ucrit consente di studiare l'intero spettro delle variazioni metaboliche che si susseguono (anche temporalmente) durante il nuoto del pesce (fase aerobica e anaerobica).

Questo genere di prova è quasi esclusivamente limitato a condizioni di laboratorio perché è necessario l'utilizzo di una camera di nuoto che rende facilmente e oggettivamente riproducibile il test di Ucrit (Hammer, 1995; Kolok, 1999). L'Ucrit costituisce una buona misura eco-fisiologica per predire i possibili impatti dei cambiamenti ambientali sull'organismo (Plaut, 2001). Le prestazioni di nuoto, inoltre, sono state utilizzate come potenziale parametro di benessere e per valutare le risposte dei pesci a stress di varia natura (FSBI, 2002). La valutazione quantitativa dell'attività di nuoto, per specie marine e d'acqua dolce, è stata possibile grazie alla messa a punto di protocolli sperimentali. Poiché le variazioni di velocità utilizzate in letteratura variano ampiamente si preferisce utilizzare valori di velocità critica relativa quando si opera con un ampio *range* di taglie (Kolok, 1999). In termini ecologici è ormai opinione diffusa che l'Ucrit sia un buon indicatore fisiologico dell'impatto dei cambiamenti ambientali sull'organismo ma non sempre si rivela particolarmente sensibile ai disturbi metabolici. Un indice di maggiore importanza ecologica è il *recovery test* che parte dal presupposto che un pesce in buona salute e non stressato possa ripetere, dopo un periodo di riposo per recuperare energia, una prova di nuoto mantenendo invariato il proprio livello di prestazione (Jain et al. 1998). Si utilizzano, quindi, due prove consecutive di Ucrit intervallate da un breve lasso di tempo (*recovery time*) necessario e sufficiente per ripristinare le riserve di glicogeno utilizzate durante lo sforzo speso nella prima prova (Milligan, 2003). In particolare, il rapporto tra il primo e il secondo Ucrit (*recovery ratio*, RR) viene utilizzato come indice del recupero metabolico; per cui un pesce che ha raggiunto un completo recupero dovrebbe mostrare un *recovery ratio* pari a uno (Jain et al. 1998). Lo sforzo fisico in un pesce, anche se non sottoposto a fonti di stress, comporta delle variazioni a livello ematologico (valori dell'ematocrito, concentrazione di cortisolo, glucosio, lattato) dalle quali può dipendere la durata del periodo di tempo necessario al recupero, durata che si è rivelata specie-specifica.

È stato dimostrato, infatti, che in *Oncorhynchus mykiss* alti livelli plasmatici di cortisolo sono coinvolti nel ritardo dell'attivazione della glicogeno-sintesi a livello muscolare al termine di una prova di nuoto, il che comporta il conseguente ritardo nel recupero delle riserve energetiche (glicogeno) durante l'eventuale tempo di recupero (Milligan, 2003). Il *recovery test* è stato utilizzato anche in *Salmo salar* per valutare l'effetto di diete con diverso contenuto in acidi grassi sulle prestazioni di nuoto (Wagner et al. 2004). Lo stato di sazietà e la composizione nutrizionale del cibo possono infatti influire sul comportamento dei pesci e, allo stesso tempo, sulle prestazioni di nuoto (Gregory e Wood, 1998; McFarlane et al. 2004; Wagner et al. 2004). Nel muscolo rosso di *O. mykiss*, infatti, l'ossidazione dei lipidi sostiene il nuoto a livello energetico fino al 70-80% dell'Ucrit, mentre riveste un ruolo secondario, rispetto al metabolismo dei

carboidrati, tra il 70% e il 100% dell'Ucrit (Wagner et al. 2004). Inoltre, anche la proporzione relativa di acidi grassi saturi e insaturi può alterare la condizione cardiorespiratoria (McKenzie, 2001) e, di conseguenza, influire sulle prestazioni di nuoto (McKenzie et al. 1998). In *Salmo salar* una dieta con una più alta concentrazione di acido oleico e linoleico incrementa significativamente le prestazioni di nuoto (McKenzie et al. 1998). Maggiori conoscenze sulle capacità di nuoto della spigola (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) (Koumoundouros et al. 2002; Chatelier et al. 2005), sono emerse grazie agli esperimenti realizzati da Carbonara et al. (2006; 2010a; 2010b). Il primo di questi lavori ha tracciato una *base-line* relativa alla stima della velocità critica di nuoto in spigole allevate e non sottoposte a fonti di stress per un ampio spettro di taglie (23-38 cm; 90-600 g). In particolare, questi studi hanno evidenziato una correlazione positiva tra lunghezza totale degli individui e Ucrit assoluto (intervallo 97-127 cms-1) e una correlazione negativa tra lunghezza totale e Ucrit relativo (intervallo 3,6-4,1 BLs-1), in accordo con Brett (1964), dimostrando anche per la spigola, che pesci più grandi, sebbene siano in grado di raggiungere velocità critiche più elevate, hanno capacità di nuoto ridotta. Nello stesso lavoro i *recovery test* riportavano, per tutto il *range* di taglie esaminate, un *recovery ratio* pari a uno, indicando come pesci non sottoposti a condizioni di stress fossero in grado di ripetere con successo due prove consecutive di Ucrit, separate da un adeguato periodo di recupero metabolico (60 minuti). Invece la simulazione di una condizione di stress acuto, indotta dalla somministrazione intraperitoneale di idrocortisolo in soluzione salina, evidenziava invece una alterazione della capacità di nuoto e del recupero metabolico in prove di *recovery test* (Carbonara et al. 2010a).

Stress ed elettromiogrammi (EMG)

Diversi test sono stati storicamente utilizzati per valutare quantitativamente l'attività natatoria nei pesci (Beamish 1978). Le tecniche maggiormente applicate per valutare la condizione fisiologica dei pesci sono: la velocità critica di nuoto, Ucrit, (Wolter e Arlinghaus 2004), le prove di recupero (Farrell et al 1998; Jain et al 1998; Wagner et al 2004) e l'attività muscolare misurata attraverso gli elettromiogrammi (EMG) (Cooke et al 2000; McFarlane et al 2004; Chandroo et al 2005; Lembo et al 2008). Gli EMG stimano quantitativamente sia la velocità di nuoto che i costi metabolici dell'attività durante il nuoto (soprattutto a causa del consumo di ossigeno). Pertanto, gli EMG sono indicatori sensibili e quindi possono essere utilizzati come indicatori di benessere.

La misura degli elettromiogrammi (EMG), ossia del segnale elettrico derivante dalla differenza di potenziale legata alla contrazione muscolare, si è rivelata utile per stimare la quantità di

ossigeno consumata da un pesce in movimento (*metabolic scope for activity*), in contrapposizione con il consumo di ossigeno a livelli basali (*standard metabolic rate*). Un contributo significativo, in questo campo, è stato fornito dalla telemetria fisiologica che, attraverso l'impianto (interno o esterno) di un trasmettitore *wireless*, consente di monitorare l'attività muscolare in pesci liberi di nuotare nel proprio ambiente (Cooke et al. 2000; Thorstad et al. 2003; McFarlane et al. 2004; Lembo et al. 2008). Nonostante sia sempre aperto il dibattito circa gli effetti dell'impianto stesso sulla salute e sul normale comportamento del pesce (Jepsen et al. 2002; Bridger e Booth, 2003), è proprio l'utilizzo dei trasmettitori di segnale elettromiografico che ha reso possibile diagnosticare disturbi a livello fisiologico, anche in assenza di sintomi di sofferenza dell'animale, sia di tipo clinico che biochimico.

Il monitoraggio dell'attività elettrica muscolare è stato quindi considerato uno strumento efficace per valutare il benessere animale in acquacoltura (Cooke et al. 2000; McFarlane et al. 2004; Chandroo et al. 2005). Nella spigola, il monitoraggio degli elettromiogrammi è stato essenziale per descrivere, da un punto di vista quantitativo, la diversa attività del muscolo rosso e del muscolo bianco a differenti velocità di nuoto (Lembo et al. 2007), dimostrando il coinvolgimento dei due tipi di fibre muscolari nel sostenere il nuoto al di sotto dell'Ucrit ed evidenziando che il *metabolic scope for activity* non è sostenuto esclusivamente dal metabolismo aerobico. È proprio il differente utilizzo della muscolatura rossa e di quella bianca, ai diversi livelli di attività del pesce, a tradursi in un diverso utilizzo delle energie metaboliche e, quindi, in una diversa capacità di rispondere allo stress. Una stima accurata del *metabolic scope for activity* deve tenere conto, pertanto, anche dell'energia utilizzata dal muscolo bianco onde evitare la possibilità di sottostimare il *budget* di energia utilizzato (Burgetz et al. 1998). I trasmettitori *wireless* del segnale elettromiografico oggi disponibili consentono di monitorare esclusivamente l'attività del muscolo rosso, e quindi l'attività aerobica, fornendo una stima grezza del *metabolic scope for activity*. Per una stima della capacità globale del pesce di compensare eventi di stress, che ne esauriscono le scorte energetiche, è necessario che il *metabolic scope for activity* sia corretto per la componente anaerobica (Lembo et al. 2007). La calibrazione dei trasmettitori EMG con gli elettromiogrammi *wired* riveste notevole importanza ai fini di un uso appropriato della tecnologia *wireless* (EMG-tag) per monitorare in *remote control* l'attività elettrica della muscolatura rossa e associare l'attività allo stato fisiologico del pesce e ai diversi livelli di risposta allo stress (Jain e Farrell, 2003; Chandroo et al. 2005). Inoltre, la calibrazione della velocità critica di nuoto e dei segnali EMG, attraverso prove di Ucrit in camere di nuoto (Fig. 3), è considerata una base di riferimento essenziale per una corretta interpretazione dei segnali EMG in relazione alla spesa energetica (Cooke et al. 2000; Thorstad et al. 2000; McFarlane et al. 2004).

Il monitoraggio degli EMG dopo calibrazione con l'Ucrit (Carbonara et al. 2010b), in esperimenti condotti per verificare gli effetti di diverse densità di allevamento (10 e 50 kg/m³) sulle condizioni di benessere della spigola, ha messo in evidenza che i pesci allevati alla maggiore densità utilizzavano, in media, il 25% di energia in più rispetto a quelli tenuti a più bassa densità. La concentrazione plasmatica di cortisolo era più elevata alla maggiore densità e il contenuto di emoglobina, di eritrociti e l'ematocrito seguivano lo stesso pattern, mentre la concentrazione di lisozima diminuiva.

I risultati dei profili di EMG ed ematologici convergevano, dunque, nell'indicare che la densità uno dei parametri chiave nel determinare le condizioni di benessere in allevamento contribuiva a generare, al livello più elevato, condizioni di stress cronico. In definitiva, l'uso complementare dell'EMG e dei profili ematologici e biochimici esplicava un maggiore potere nella formulazione di una diagnosi di stress causato dal protocollo di allevamento. È noto che, insieme alla densità di allevamento, l'alimentazione (qualità, quantità, modalità e tempi di somministrazione del cibo) è un altro dei fattori che può influenzare lo stato di benessere degli organismi allevati. La somministrazione di diete rispondenti a requisiti specie-specifici favorisce una maggiore resistenza allo stress e alle malattie (Poli, 2009), portando a una migliore condizione del benessere dei pesci e, di conseguenza, della qualità del prodotto finito. La possibilità di misurare gli effetti della risposta fisiologica integrata dell'organismo da un punto di vista funzionale può contribuire a delineare, anche per gli organismi allevati, i confini tra allostasi e ormesi (Schreck, 2010).

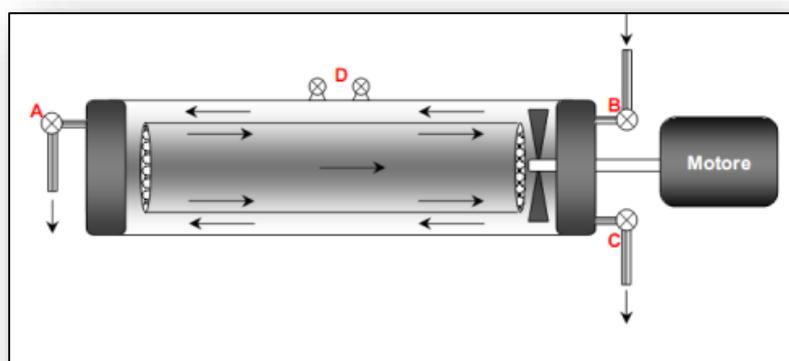


Fig. 3: Camera di nuoto.

Stress e inquinamento

L'immunotossicologia, disciplina che fonde le branche dell'immunologia e della tossicologia, è la scienza biomedica che studia le disfunzioni del sistema immunitario provocate dall'esposizione dell'organismo ad agenti tossici xenobiotici. Negli ultimi anni, l'immunotossicologia ha guadagnato crescente interesse in seguito all'importanza della risposta immunitaria nel mantenimento dell'integrità degli organismi (Zelikoff et al. 2000).

Effetti di inquinanti ambientali sul sistema immunitario dei pesci possono portare alla morte o provocare l'insorgenza di malattie (Zelikoff, 1994). Inoltre, l'esposizione a sostanze chimiche può interferire con la risposta immunitaria dei pesci, bloccando l'attività fagocitaria, inducendo o inibendo la proliferazione cellulare. Sebbene la relazione tra l'inquinamento ambientale e malattie negli organismi acquatici sia ancora incerta, è noto che l'inquinamento ambientale può determinare immunosoppressione aumentando l'insorgenza delle malattie nei pesci (Zelikoff, 1994; Zelikoff, 1993). Per meglio comprendere gli effetti delle sostanze chimiche inquinanti sul sistema immunitario dei pesci, sono stati effettuati differenti esperimenti utilizzando vari modelli animali, come *Oreochromis niloticus* (Holladay et al. 1998), *Oncorhynchus mykiss* (Cleland et al. 1988), *Oncorhynchus tshawytscha* (Arkoosh et al. 1998), *Fundulus heteroclitus* (Faisal et al. 1991), *Scophthalmus maximus* e *Oryzias latipes* (Beaman et al. 1999). I saggi immunologici maggiormente utilizzati comprendono lo studio delle funzioni dei macrofagi tra cui la fagocitosi, e la produzione di ROI, l'attività citotossica, il numero di leucociti circolanti, la struttura degli organi linfoidei, le risposte proliferative dei linfociti T, i livelli di anticorpi circolanti (Anderson et al. 1996; Luebke et al. 1997). Nonostante si sappia che il sistema immunitario dei pesci possa essere influenzato dagli inquinanti, si sa poco sugli effetti delle sostanze chimiche sulla risposta immunitaria dei pesci.

Inoltre, i pesci rappresentano un gruppo estremamente eterogeneo di organismi (> 25.000 specie), e poiché occupano una posizione filogenetica strategica rappresentano un ottimo modello per indagare l'immunotossicità nei mammiferi (Carlon et al. 2008). La contaminazione degli habitat acquatici da metalli pesanti provenienti da vari complessi industriali è ancora un problema da risolvere. Gli interessi economici presenti nel settore minerario, porteranno senza dubbio a un'ulteriore inquinamento degli ambienti acquatici da metalli pesanti come arsenico (As), cadmio (Cd), piombo (Pb), mercurio (Hg), rame (Cu), cromo (Cr) e zinco (Zn). Gli impatti sull'ecosistema acquatico comprendono la contaminazione dei sedimenti e della colonna d'acqua, l'accumulo di inquinanti nel biota, e lo sviluppo di anomalie nelle specie residenti (Carlon et al. 2008). I metalli pesanti possono determinare mortalità, alterazioni dei parametri

ematologici, del metabolismo e dello sviluppo, così come l'alterazione della maturazione sessuale o immunodeficienza (Cuesta et al. 2011). Studi di laboratorio e sul campo hanno dimostrato che l'esposizione ad alcuni metalli altera le funzioni immunitarie innate e adattative, così come la resistenza dell'ospite contro gli agenti patogeni infettivi. Alcuni pesanti metalli possono trasformarsi in composti metallici persistenti, che possono essere bioaccumulati negli organismi, rappresentando un pericolo anche per la salute umana (Zhou et al. 2009).

1.3. Stress e acquacoltura

In acquacoltura, i pesci sono spesso esposti a condizioni di stress, a causa di pratiche di allevamento come la manipolazione, la selezione, l'alta densità di allevamento, il trasporto, le condizioni di pre-macellazione e i metodi di macellazione.

Con il termine acquacoltura si definisce, oggi, quell'insieme di attività umane, distinte dalla pesca, finalizzate alla produzione controllata di organismi acquatici. Si distinguono tre diverse tipologie di allevamento: estensivo, semi-estensivo ed intensivo.

L'allevamento estensivo non richiede elevati apporti di energia supplementare per ottenere l'accrescimento del prodotto e le produzioni sono dell'ordine di chilogrammi per ettaro. L'energia trofica è a carico dell'ambiente ed è un'attività che si svolge su grandi estensioni e in ambienti naturali o semi-naturali. L'acquacoltura estensiva può essere praticata in ambienti costieri protetti, confinati e in ambienti lagunari, mentre nel caso di acque dolci, in laghi o dighe. Le aree possono estendersi da alcune migliaia di mq a migliaia di ettari con investimenti economici che sono finalizzati alle sole opere idrauliche (argini, canalizzazioni, dragaggi). L'acquacoltura estensiva, oltre a costituire un modello di sviluppo valido dal punto di vista economico, ha consentito la conservazione delle caratteristiche ambientali anche in aree molto estese. Il limite dell'allevamento estensivo è costituito dalle rese piuttosto basse.

L'allevamento semi-intensivo richiede somministrazione di alimenti a più elevati apporti di energia supplementare. L'accrescimento degli organismi dipende sia dalla disponibilità dell'alimento naturale che da quello somministrato dall'uomo con la funzione di dieta integrativa. Questa pratica produttiva può prevedere la concimazione delle acque, che permette fioriture di fitoplancton e di conseguenza favorisce la produzione di zooplancton e di organismi bentonici, aumentando la disponibilità di alimento naturale per gli organismi allevati.

Nell'allevamento intensivo è di fondamentale importanza l'apporto umano per la somministrazione di alimentazione di tipo artificiale, con formulazioni adatte alle specie allevate. Si attua per lo più sulla terra ferma in vasche di cemento o in terra. Negli ultimi anni sta sempre più diffondendosi quello praticato in mare utilizzando gabbie e recinti. Nell'allevamento

intensivo è invece di fondamentale importanza l'intervento umano per la somministrazione di alimenti con formulazioni complete e bilanciate adatte alle specie allevate, introdotte dall'esterno. Per una migliore crescita e qualità dell'organismo allevato, le materie prime usate per la produzione di mangimi vengono scelte con particolare attenzione in funzione della loro digeribilità e dell'eco-sostenibilità. I mangimi utilizzati per l'alimentazione di pesce sono composti principalmente di farina e olio di pesce, in percentuali che variano dal 50% fino all'80%. L'impiego di tali materie è determinante per l'ottenimento di mangimi di elevata qualità perché non si tratta di sottoprodotti ma di derivati da pesce fresco di basso pregio commerciale. Vengono poi utilizzate materie prime di origine vegetale, costituite in gran parte da farine di soia. Inoltre, come leganti, vengono utilizzati amidi derivati dal frumento. In Italia, l'allevamento ittico intensivo si è praticato in impianti a terra con vasche o bacini artificiali di dimensioni ridotte dai 100 ai 10.000 (ma più frequentemente da 300 a 1.000) metri quadrati, caratterizzati da un battente d'acqua di circa 100 cm e da una pianta a canale (raceway) oppure assimilazioni ad un quadrato o ad un rettangolo poco allungato (pond). Negli ultimi anni, tuttavia, è notevolmente aumentato l'allevamento intensivo in mare, chiamato maricoltura, che si effettua in gabbie e/o recinti collocati sia in prossimità della costa "*in shore*" sia in mare aperto "*off shore*"; tale attività consente il superamento di numerosi vincoli cui sono soggette le strutture a terra (disponibilità e captazione delle acque, instabilità dei parametri fisici, restituzione delle acque reflue). L'investimento di capitali è minore, come minori sono i costi di produzione; l'utilizzo diretto del mare e, quindi, la migliore qualità delle acque rispetto ad un allevamento fatto a terra riduce anche l'incidenza di malattie che possono colpire i pesci. L'allevamento *off shore*, con l'impiego di gabbie galleggianti al largo, ha permesso, tra l'altro, di ridurre i conflitti emersi per l'uso di spazi e risorse nelle aree costiere dove insistono altre attività antropiche.

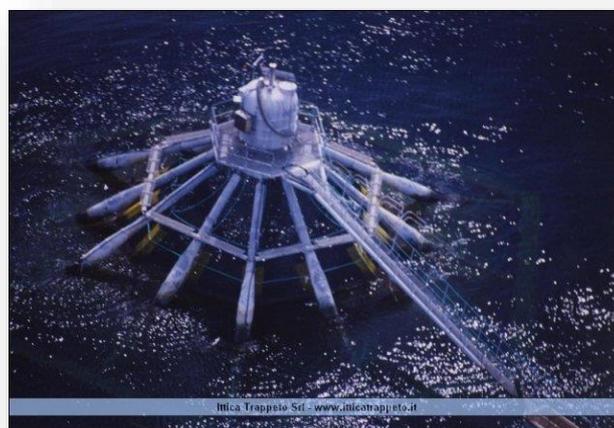


Fig. 4: impianto di acquacoltura di Trappeto, Sicilia.

L'uso di chemioterapici, vaccini, immunostimolanti in acquacoltura

Con l'intensificarsi della produzione di proteine animali per il consumo umano, in ragione dei crescenti fabbisogni mondiali, l'uso di sostanze per il controllo delle malattie animali ha acquistato sempre maggior importanza; basti pensare che il 70-80% di tutte le specie allevate per fini alimentari subiscono trattamenti farmacologici. Anche in acquacoltura un uso intensivo di farmaci non è esente da rischi per la salute umana e per l'ambiente. Per limitare l'insorgenza di patologie negli impianti di acquacoltura vengono applicati trattamenti chemioterapici, di vaccinazione o di immunostimolazione. I chemioterapici sono molto costosi e un eccesso nell'uso causa un'overdose con effetti letali per l'animale (Chong e Chao, 1969); inoltre nonostante il vasto numero di farmaci idonei per combattere patologie in ambiente di allevamento è estremamente ristretto il numero di molecole consentite (Harikishnan et al. 2009). Un eccessivo uso di chemioterapici ha causato lo sviluppo di meccanismi di resistenza in alcune specie di patogeni con potenziali rischi per l'uomo (Cabello, 2006). Per tali ragioni, negli ultimi anni si sta cercando di indirizzare la ricerca verso lo sviluppo di nuovi vaccini e di sostanze immunostimolanti con l'obiettivo di potenziare i meccanismi di difesa dell'animale ed essere alternativi all'uso di antibiotici. La vaccinazione rappresenta senza dubbio l'approccio più efficace per il controllo delle malattie (Sakai, 1999) anche se vi sono molte limitazioni come ad esempio la risposta anticorpale indotta dal vaccino è influenzata da diversi fattori quali l'età dell'animale, la tecnica di somministrazione, il tempo di contatto tra il pesce e la soluzione vaccinale, la temperatura dell'acqua e il tipo di antigene. Pertanto, la ricerca si sta orientando verso l'uso di sostanze immunostimolanti in quanto somministrare immunostimolanti ai pesci è un metodo molto efficace nel controllare le malattie, inoltre presentano un ampio spettro di attività e possono essere utilizzate come trattamento preventivo (Harikishnan et al. 2011). Esistono molte sostanze ad effetto immunostimolante ma la loro azione dipende dalla dose dal tempo di somministrazione (Cerezuela et al. 2009). Queste sostanze utilizzate come additivi nei mangimi sembrano incrementare il sistema immunitario innato come: lisozima, complemento, antiproteasi, perossidasi e fagocitosi (Harikishnan et al. 2011). L'attivazione di queste funzioni immunologiche si associa ad una maggiore resistenza a batteri patogeni come *Listonella anguillarum*, *Aeromonas salmocida* e *Yersinia ruckeri* (Sakai, 1999). Gli immunostimolanti possono essere di origine batterica, glucani, vitamine, citochine, farmaci, lecitine, estratti vegetali. Gli immunostimolanti possono essere somministrati ai pesci attraverso iniezione intraperitoneale oppure attraverso la dieta. Il metodo dell'iniezione intraperitoneale è il metodo che viene maggiormente utilizzato in acquacoltura sebbene risulti stressante per gli animali (Duncan and Klesius 1996a, 1996b), inoltre è impraticabile fino a quando il peso dei pesci non

è almeno di 15 grammi. E' per questo che la somministrazione di immunostimolanti attraverso la dieta rappresenta un'utile alternativa all'iniezione nella somministrazione di massa ai pesci di qualsiasi taglia (Selvaraj et al. 2005). Infatti l'aggiunta nella dieta di immunostimolanti non richiede molto tempo, non prevede stress per l'animale, e permette di trattare un gran numero di animali, senza limitazione di taglia, in maniera semplice e con bassi costi (Esteban et al. 2001).

Gli immunostimolanti nei pesci

Gli immunostimolanti costituiscono una buona alternativa all'uso di agenti chemioterapici, antibiotici e vaccini. Gli antibiotici sono stati ampiamente utilizzati in acquacoltura, perché sono strumenti potenti per combattere le malattie, sia come metodi di trattamento o la prevenzione dello stress. Tuttavia, l'uso indiscriminato di antibiotici in acquacoltura può avere notevoli inconvenienti, come la comparsa di ceppi resistenti, inquinamento delle acque, tossicità, effetti negativi sulla salute umana. Inoltre, anche se il vaccino è un metodo di profilassi che ha avuto successo contro alcune malattie, sembra essere un metodo meno efficace del previsto, a causa dello scarso sviluppo del sistema immunitario adattativo di pesce (Sakai, 1999). L'uso di immunostimolanti ha un valore prevalentemente profilattico, con il vantaggio di avere una più ampia gamma di azione, in quanto il loro uso può essere utile contro tutti i tipi di infezioni. Tuttavia, il suo principale svantaggio è la breve durata di azione, in quanto queste sostanze spesso agiscono sul sistema immunitario innato, che manca di memoria (Sakai, 1999). Un immunostimolante è un composto naturale che rinforza il sistema immunitario aumentando la resistenza alle malattie causate da agenti patogeni (Brickell e Dalmo, 2005). Questo termine copre una vasta gamma di sostanze e agenti in grado di attivare il sistema immunitario attraverso diversi tipi di recettori, e aumentare la resistenza a diverse malattie. Esistono differenti sostanze sia naturali che sintetiche in grado di stimolare il sistema immunitario dei vertebrati, potenziando i meccanismi di risposta innata, attenuando gli effetti negativi di immunosoppressori (situazioni stress, inquinamento...) e riducendo l'insorgenza di infezioni batteriche, virali, che provocano significative perdite economiche se si verificano in ambienti di acquacoltura. Gli immunostimolanti possono derivare da piante, batteri, virus o parassiti, così come alcuni composti sintetici, vitamine e ormoni (Sakai, 1999; Ringo et al, 2011). Tra queste sostanze sono i beta-glucani, un gruppo di polimeri di glucosio che costituiscono il principale componente strutturale delle pareti cellulari dei funghi, piante e alcuni batteri (Brown e Gordon, 2003). Gli effetti biologici degli immunostimolanti dipendono dai recettori delle cellule bersaglio. Nei pesci, sono stati individuati diversi recettori di tipo TLR (recettore Toll-like) che sembrano essere correlati alla risposta immunitaria (Brickell e Dalmo, 2005). Inoltre, è stato dimostrato che gli immunostimolanti possono agire sull'attività fagocitica dei leucociti renali del pronefro,

sull'attivazione dei macrofagi, sull'attività lisozimatica, sull'attività emolitica del complemento, sull'attività fenoloossidasi e sull'attività di fosfatasi alcalina (Ringo et al. 2011).

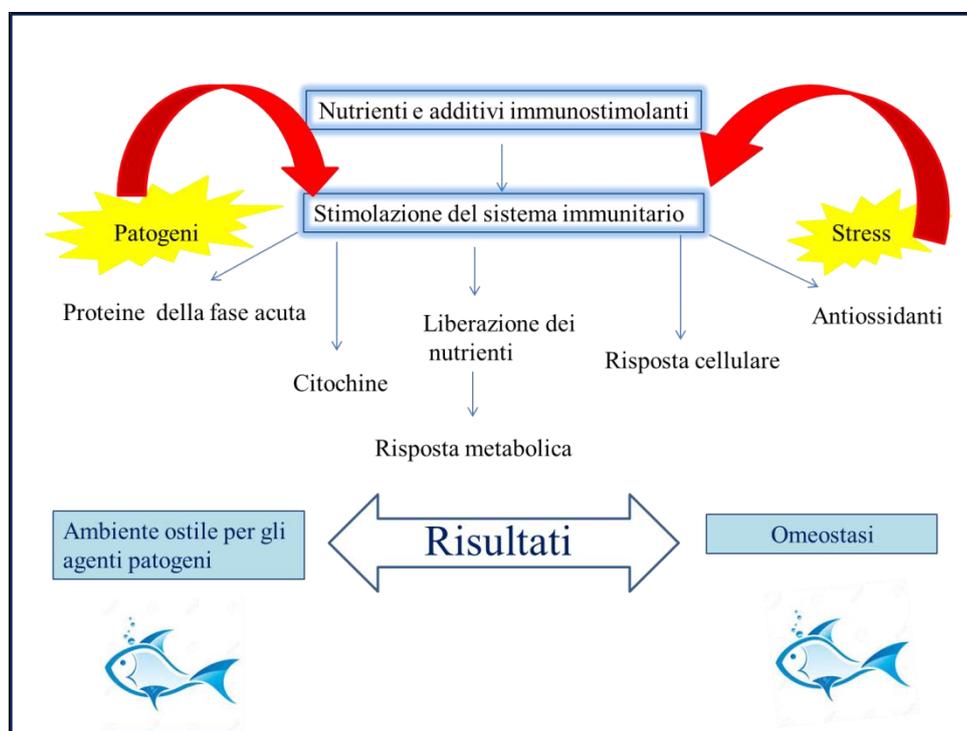


Fig.5: modalità di azione degli immunostimolanti (Kiron, 2012).

In acquacoltura, gli immunostimolanti solitamente vengono aggiunti ai mangimi commerciali in momenti specifici di ingrasso, come l'aumento dello stress (per esempio, la gestione, la separazione per dimensione o la vaccinazione) o durante i periodi critici dello sviluppo, al fine di rafforzare il sistema immunitario degli animali contro gli agenti patogeni (Kiron, 2012) (Fig. 5).

Attualmente, in commercio vi sono vari tipi di immunostimolanti. Una delle prime applicazioni di immunostimolanti in acquacoltura è stata aggiunta di glucani nella dieta di salmone, che ha dimostrato la sua efficacia contro i focolai di malattia dopo situazioni di stress (Brattgjerd et al. 1994). Le proprietà dei beta-glucani come immunostimolanti nei pesci sono stati ampiamente studiate, sia introdotti nella dieta sia inoculati per via intraperitoneale o come adiuvante nei vaccini (Dalmo e Bøgwald 2008; Das et al. 2009; Kudrenko et al. 2009). Questi zuccheri sembrano avere un effetto immunostimolante sia sulla risposta immunitaria innata che su quella acquisita. In *Umbrina xanti* hanno dimostrato una maggiore attività lisozimatica, fagocitica e un incremento del burst respiratorio dopo somministrazione nella dieta di beta-glucani provenienti dalla parete di *Saccharomyces cerevisiae*, e una maggiore resistenza all'infezione da *Vibrio*

harveyi (Ai et al. 2007). In tilapia, è stato osservato che i β -glucani possono essere utilizzati come immunostimolanti in condizioni di stress immunosoppressivi, aumentando la resistenza degli animali alle infezioni da *Aeromonas hydrophila* (El-Boshy et al. 2010). Differenti immunostimolanti sono stati studiati nei pesci tra cui vitamine e levamisole (Amar et al. 2004;. Rairakhwada et al. 2007; Gupta et al. 2008; Cerezuela et al. 2009;. Immanuel et al. 2009; Yin et al, 2009; Ibrahim et al. 2010), RNA a doppio filamento (Fernandez-Trujillo et al. 2008; Das et al, 2009) e oligonucleotidi (ODN, molecole sintetiche di DNA non metilato a singolo filamento) tra le quali vi sono le CPGs (contenente una citosina seguita da un guanina) (Tassakka e Sakai, 2005; Cheng et al. 2011) (Tab.1).

Tabella 1. Studi recenti sugli immunostimolanti nei pesci.

Immunostimolante	Specie	Effetti osservati	Bibliografia
Estratti di erbe	<i>Carassius auratus</i>	↑ burst respiratorio ↑ fagocitosi ↑ lisozima	Harikrishnan et al. 2010a
Lipopolisaccaridi	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	→ crescita ↓ mortalità verso <i>A. hydrophila</i> ↑ fagocitosi ↑ lisozima Attività battericida e antiproteasica	Nya and Austin, 2010
Alginati	<i>Epinephelus bruneus</i>	↓ % macrofagi ↑ % neutrofili e linfociti ↑ complemento, ↑ emoagglutinazione ↑ fagocitosi ↑ lisozima e SOD ↑ burst respiratorio	Harikrishnan et al. 2011
Vitamina C e E Nucleotidi Glucani	<i>Thunnus maccoyii</i>	↑ lisozima (vitamine) ↑ sopravvivenza ↓ % di presenza di parassiti ↑ complemento ↑ cortisolo	Kirchhoff et al. 2011
β-1,3glucano, chitosan e rafinosa	<i>Cyprinus carpio koi</i>	↑ crescita(glucano) → complemento ↑ leucocitinel sangue ↑ burst respiratorio ↑ capacità fagocitica ↑ lisozima e SOD ↓ mortalità verso <i>A. veronii</i>	Lin et al. 2011
Alginato (Ergosan®)	<i>Oreochromis niloticus</i>	→ microflora intestinale → morfologia dell'intestino	Merrifield et al. 2011
β-glucano (MacroGard®)	<i>Cyprinus carpio</i>	↓citochine proinfiammatorie di fronte a <i>A. salmonicida</i>	Falco et al. 2012
β-glucano	<i>Cyprinus carpio</i>	↑ espressione di Muc5B nella pelle ↑espressione dellaβ-defensina nella pelle e nelle branchie	Marel et al. 2012

La vitamina D: un nuovo immunostimolante

La vitamina D è classificata come un seco-steroido, che nei vertebrati terrestri viene sintetizzata nella pelle sotto l'influenza dei raggi ultravioletti oppure è ottenuta dall'alimentazione. La vitamina D costituisce un pro-ormone e rappresenta un precursore per vari metaboliti fisiologicamente attivi (ne sono stati identificati 33)(De Luca, 2004); essa è inizialmente idrossilata a livello epatico da parte del citocromo P450 25 idrossilasi 25-idrossivitamina D (25[OH]D). La 25 [OH] D è il principale metabolita circolante della vitamina D, si lega nel plasma ad una proteina specifica di trasporto (alfa-globulina), "proteina legante la vitamina D", e le sue concentrazioni sieriche rappresentano l'indice biochimico più attendibile dello stato di replezione vitaminica (Reichel et al. 1989), la sua emivita è di 12-18 giorni. Successivamente, la 25[OH]D viene metabolizzata, a livello dei tubuli renali, in 1,25-diidrossivitamina D (calcitriolo o 1,25[OH]₂D) per opera della 1-alfaidrossilasi (CYP27B1) o in 24,25-diidrossivitamina D dall'enzima 24-idrossilasi (CYP24A1) (Fig. 6).

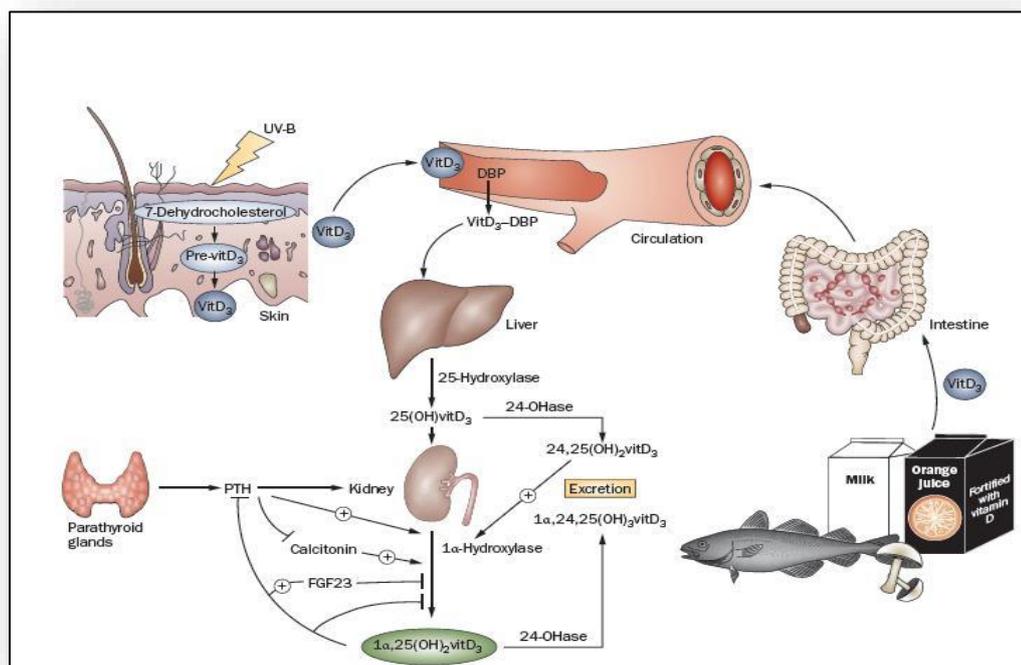


Fig. 6: meccanismo d'azione della vitamina D.

Le sue azioni possono essere così sintetizzate:

- a livello osseo promuove la mobilizzazione del calcio dallo scheletro stimolando gli osteoclasti e gli osteociti;
- a livello renale diminuisce il riassorbimento del fosforo (tubulo contorto prossimale) ed aumenta il riassorbimento del calcio (tubulo contorto distale); stimola l'idrossilazione della 25(OH)D₃ a 1,25(OH)₂D₃ che risulta essere il metabolita più attivo

- a livello intestinale aumenta il riassorbimento di calcio e fosforo.

Risulta necessario sottolineare che oltre ad essere trasformata nel fegato e nel rene, la vitamina D può essere metabolizzata da molte altre cellule, in particolare da quelle del sistema immunitario e dei cheratinociti (Holick, 2006; Tavera-Mendoza et al. 2007; Miller et al. 2010), ma anche da enterociti, cellule prostatiche, mammarie, endometriali, dell'epitelio cervicale e polmonare. Tutte le funzioni della vitamina D sembrerebbero essere svolte attraverso il legame con il suo unico recettore, VDR (Fig.7). Sono stati identificati due tipi di recettori, il primo, localizzato nel nucleo, appartiene alla famiglia dei recettori degli ormoni steroidei di classe 2, strettamente legato al recettore dell'acido retinoico ed a quello dell'ormone tiroideo. Esso è un fattore di trascrizione nucleare, ha un dominio legante il DNA (dominio C), un dominio legante il ligando (dominio E) e un dominio attivante (dominio F). Il VDR umano è un peptide di 427 aminoacidi (De Luca, 2004). Il VDR nucleare si eterodimerizza con RXR (recettore X retinoide) e insieme si legano ai VDREs (Vitamin Response Elements) nei promotori dei geni, stimolando direttamente la trascrizione di geni e la sintesi ex-novo di proteine (meccanismo genomico). L'altro recettore è localizzato sulla membrana cellulare ed agisce inducendo la formazione di secondi messaggeri cellulari (cAMP, diacilglicerolo, inositolo trifosfato, acido arachidonico) o fosforilando alcune proteine cellulari. Tale meccanismo d'azione non è genomico e questa forma di VDR e il suo ligando recettoriale giustifica gli effetti rapidi che si inducono usando 1,25-diidrossivitamina D e suoi derivati. La vitamina D svolge importanti funzioni anche al di fuori del tessuto muscolo-scheletrico. È stata, infatti, osservata la presenza di recettori per la vitamina D in vari tipi cellulari, infatti è stato visto che il recettore per la vitamina D è praticamente ubiquitario, questo fa supporre che oltre ad avere un ruolo fisiologico nel metabolismo minerale, svolge altre funzioni nell'organismo.

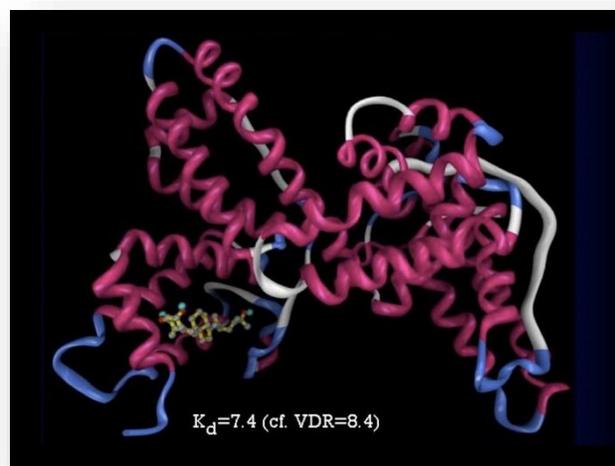


Fig. 7: struttura del recettore VDR.

La consapevolezza di un ruolo della vitamina D nella regolazione delle risposte immunitarie è stata raggiunta con la scoperta che il VDR è presente in quasi tutte le cellule del sistema immunitario tra cui i linfociti T attivati CD4 e CD8, i linfociti B, i neutrofilii, le APCs (cellule presentanti l'antigene), i macrofagi (Baeke et al. 2010; Miller et al. 2010) (Fig. 8).

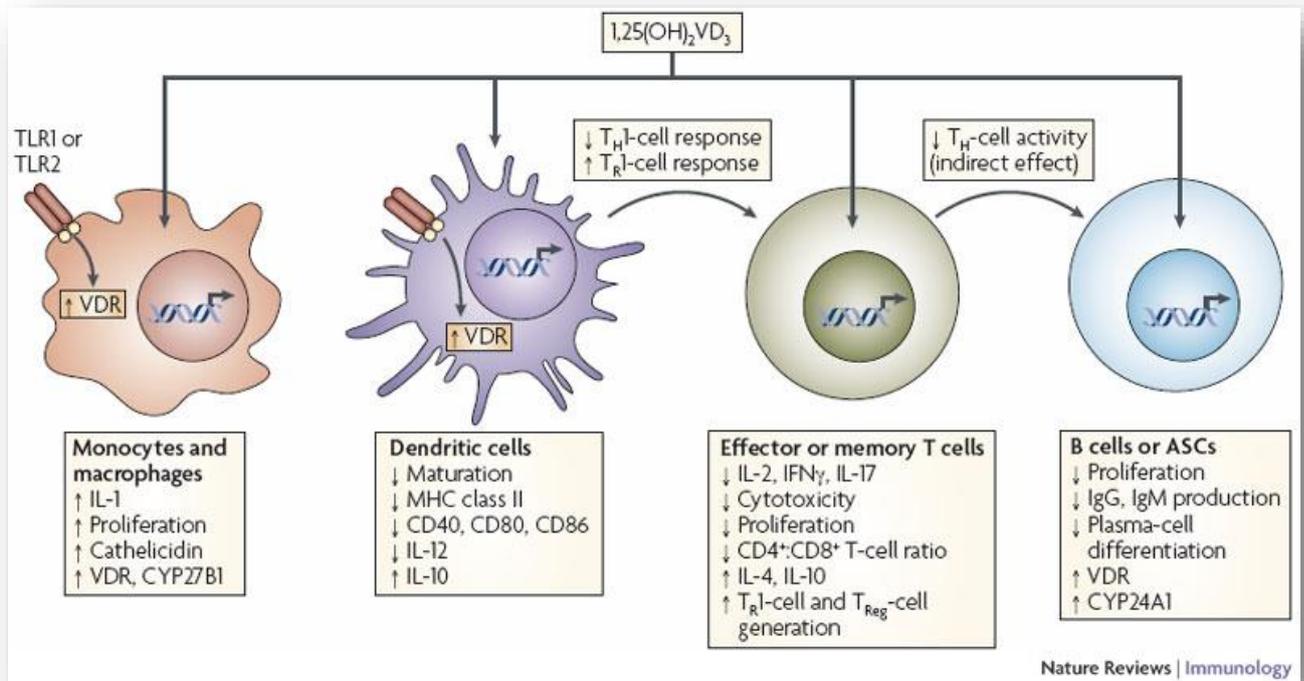


Fig. 8: effetti della vitamina D sul sistema immunitario.

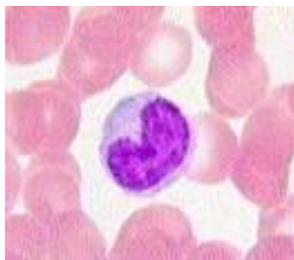
1.4. Il sistema immunitario dei Teleostei

Negli ultimi decenni, la crescente espansione del settore dell'acquacoltura ha incrementato l'interesse verso lo studio del sistema immunitario di specie ittiche di importanza commerciale con due obiettivi principali: garantire ottime condizioni di salute del pesce allevato e sviluppare e migliorare misure profilattiche o terapeutiche, come la vaccinazione o l'uso di immunomodulatori (Vadstein, 1997; Ellis, 2001; Alvarez-Pellitero, 2008; Van Muiswinkel, 2008). Il termine immunità viene utilizzato per indicare una reazione contro agenti estranei, tra cui microrganismi (virus, batteri, funghi, protozoi e parassiti pluricellulari) e macromolecole (proteine e polisaccaridi), senza che ciò determini una reazione patologica (Abbas et al. 2002). Il sistema immunitario è costituito da cellule e molecole che sono responsabili di tale immunità, mentre la risposta collettiva e coordinata dei componenti del sistema immunitario nei confronti di sostanze estranee costituisce la risposta immunitaria. La risposta immunitaria inizia sempre con il riconoscimento del materiale estraneo e ha lo scopo di sviluppare un meccanismo per

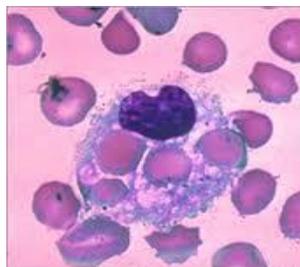
rimuoverlo (Male e Roitt, 2001, Abbas et al. 2002). Il sistema immunitario dei pesci è, in termini generale, molto simile a quello dei vertebrati superiori. In tutti i vertebrati, compresi i pesci, la risposta immunitaria può essere di due tipi: innata (nota anche come naturale o non specifica) e adattiva (nota anche come acquisita o specifica). Tuttavia, questa distinzione è artificiale poiché ogni volta che un agente estraneo interagisce con l'ospite, si attivano elementi che costituiscono il sistema immunitario, che appartengano sia alla risposta immunitaria innata sia a quella adattiva. Nei pesci la risposta immunitaria innata è molto sviluppata mentre è meno sviluppata quella adattiva, contrariamente a quanto avviene nei vertebrati superiori, dove è maggiormente sviluppata la risposta immunitaria adattativa (Tort et al. 2003). Tale divisione tra i due sistemi immunitari non è così netta in quanto il sistema immunitario innato, oltre ad essere di primaria importanza nel combattere le infezioni nei pesci, è anche importante nell'attivazione della risposta immunitaria acquisita. L'immunità innata media un'iniziale protezione nei confronti di agenti patogeni mentre l'immunità acquisita si sviluppa più lentamente ed è coinvolta in una fase più tardiva. Nei pesci, le componenti innate sono di grande importanza, e oggi si conoscono molti aspetti di come questi meccanismi di difesa sono inibiti o depressi a seguito di stress. Il termine innata o naturale si riferisce al fatto che questo sistema di difesa è sempre operativo nel soggetto sano, e pronto a bloccare l'ingresso dei patogeni nell'organismo senza nessuna esperienza precedente verso il patogeno. L'immunità acquisita o adattativa è invece quel sistema di difesa che è stimolato dai patogeni che invadono i tessuti: essa viene quindi "acquisita" solo in seguito ad un primo contatto con i patogeni estranei. Le caratteristiche principali dell'immunità acquisita sono rappresentate dall'elevata specificità per antigeni differenti e dalla capacità di memorizzare una precedente esposizione all'antigene. Nei pesci la prima barriera è rappresentata dalla cute e dalle mucose dove le cellule caliciformi producono continuamente muco che contiene sostanze antimicrobiche. Il tratto gastrointestinale si oppone agli agenti estranei creando un microambiente acido. Quando, invece, gli agenti patogeni penetrano a livello tissutale si attiva la risposta infiammatoria attraverso l'aumento della permeabilità vascolare, la secrezione di citochine, fattori del complemento, l'afflusso di cellule ematiche, la fagocitosi. La fagocitosi è uno dei meccanismi di difesa antimicrobica e si attua attraverso l'azione di granulociti neutrofili e dei macrofagi. Le difese dell'immunità acquisita si attuano attraverso la produzione di anticorpi. Le immunoglobuline (Ig) che si ritrovano nei pesci possono essere considerate analoghe, sulla base del peso molecolare delle catene pesanti e leggere, alle IgM dei mammiferi (Bourmaud et al. 1995). Prove di reazioni immunitarie hanno suggerito la presenza di cellule T e B anche nei pesci (Scapigliati et al. 1999). I pesci, a differenza degli altri vertebrati superiori non presentano midollo osseo, né cellule di Kupffer, né linfonodi per cui le attività

emopoietiche sono svolte da altri organi quali il rene anteriore, la milza e il timo. Inoltre in tutti i teleostei ci sono accumuli di tessuto linfoide lungo l'intestino contenente linfociti di varia taglia.

Le cellule del sistema immunitario innato dei pesci



Monociti



Macrofagi



Granulociti

Nei pesci le cellule fagociti che costituiscono un importante arma di difesa sia diretta per la capacità di distruggere materiale estraneo (Do Vale et al. 2002) che indiretta attraverso la cooperazione con i linfociti responsabili della produzione di anticorpi.

I macrofagi sono tipicamente mononucleati, positivi all'esterasi non specifiche, negativi alla perossidasi e sono presenti nel sangue (monociti), negli organi linfoidi (soprattutto nel pronefro) e nella cavità peritoneale. Essi sono avidi fagociti, possono agire come cellule accessorie per le risposte dei linfociti e possono liberare radicali di ossigeno e di azoto eliminando una varietà di patogeni. È da sottolineare l'importante ruolo che i macrofagi rivestono in molti aspetti dell'attività immunitaria dei pesci (Secombes, 1990): sono importanti nella fase iniziale della risposta immunitaria specifica, sono anche potenti cellule effettrici capaci di uccidere una larga gamma di patogeni. I macrofagi costituiscono le più importanti cellule fagocitiche dei pesci. La stimolazione della membrana cellulare durante la fagocitosi porta alla produzione di radicali liberi d'ossigeno, microbicidi, o specie reattive dell'ossigeno (ROS), durante il fenomeno del "burst respiratorio". La più importante funzione dei macrofagi è il processamento dell'antigene e la sua presentazione ai linfociti. I granulociti, così chiamati per la presenza di granuli nel citoplasma, possono essere suddivisi in neutrofili, eosinofili e basofili. I neutrofili e gli eosinofili sono i tipi cellulari più comuni (Cammarata et al. 2001) mentre i basofili sono assenti nella maggior parte delle specie. Così come i macrofagi, i granulociti si trovano nel sangue, nella cavità peritoneale e nel tessuto linfoide. I granulociti, specialmente i neutrofili, sono altamente mobili, fagociti e producono specie reattive di ossigeno (ROS), ma la loro attività antibatterica è relativamente scarsa se paragonata a quella dei macrofagi. È stato dimostrato che i granulociti eosinofili dei teleostei sono capaci di dare reazioni citotossiche spontanee contro una vasta varietà di linee cellulari di pesci e di cellule tumorali di mammiferi (Cammarata et al. 2000), cellule infettate da virus e contro protozoi parassiti (Evans et al. 1992). Queste cellule

citotossiche non specifiche possono essere considerate equivalenti da un punto di vista funzionale alle cellule natural-killer (NK). Diversamente dalle cellule NK dei mammiferi, queste cellule non contengono granuli citoplasmatici e il loro nucleo è molto pleomorfico.

La locomozione dei leucociti è un fattore determinante che permette loro di dirigersi verso i siti di infezione durante un'inflammatione. Nei pesci l'iniezione di agenti flogistici può richiamare macrofagi e neutrofili al sito. Molti fattori ospite-patogeno-derivati sono chemiotrattanti per i leucociti dei pesci; si comportano allo stesso modo anche i fattori derivati dal siero, dopo appropriata stimolazione (con LPS, zymosan, etc.). Non tutte le molecole dell'ospite inducono la locomozione dei leucociti, e ci sono molti esempi di sostanze rilasciate che inibiscono la migrazione dei leucociti dei pesci (Smith et al. 1980; Newton et al. 1994).

L'attività dei fagociti dei pesci può essere condizionata da una vasta gamma di fattori esogeni ed endogeni come: patogeni, stress, xenobiotici, influenze ambientali (Secombes, 1994b). La fagocitosi è un processo attraverso il quale le cellule internalizzano, uccidono e digeriscono le cellule estranee. Essa può essere suddivisa in tre fasi principali:

- Attaccamento della particella alla superficie cellulare
- Ingestione con formazione di un fagosoma
- Distruzione della particella nel fagosoma

L'attacco della particella alla membrana del fagocita è un prerequisito per catturarlo, ed è un processo relativamente passivo (fig. 9). Tuttavia i fagociti dei pesci hanno la capacità di discriminare i target, suggerendo il coinvolgimento di recettori di superficie.

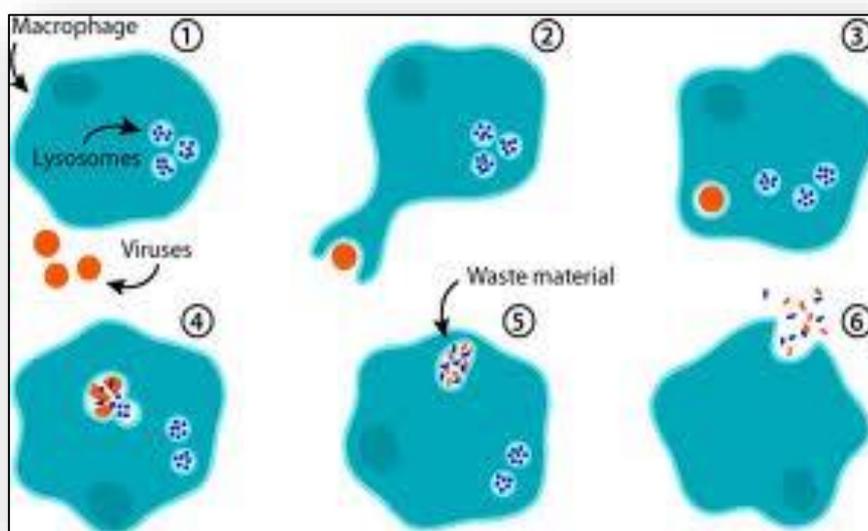
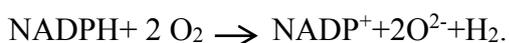


Fig. 9: le differenti tappe della fagocitosi operata dai macrofagi nei confronti di un agente patogeno.

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che i monociti /macrofagi e i granulociti (neutrofili e più raramente eosinofili) sono fagocitici e ingeriscono un vasto range di particelle. Le sostanze esterne in fase fluida possono essere internalizzate tramite processi di pinocitosi e di endocitosi (Week et al. 1988; Lauve et al. 1993).

I fagociti sono in grado di uccidere i patogeni usando differenti meccanismi di killing (Fig. 10) che possono essere distinti in ossigeno-dipendenti e ossigeno-indipendenti (Secombes, 1990). Quando il patogeno è rappresentato da un microrganismo, il killing dei fagociti dei pesci è un evento intracellulare, anche se si può verificare il killing extracellulare come il killing delle larve elminte da parte dei macrofagi della trota arcobaleno (Whyte et al.1989).

Quando i fagociti ingeriscono particelle, si determina un aumento del consumo di ossigeno che è indipendente dalla respirazione mitocondriale (non è impedita in presenza di inibitori metabolici). Questa cosiddetta “*respiratory burst*” (respirazione forzata) è usata nella generazione di un numero di radicali liberi di ossigeno (Secombes et al.1992; Ortuno et al. 2000) e di azoto che sono tossici per batteri e protozoi (Chung et al. 1988; Dannevig et al. 1994). La reazione primaria del burst respiratorio è la riduzione dell’ossigeno molecolare ad O₂⁻(anione superossido), catalizzata dalla NADPH-ossidasi per mezzo della seguente reazione:



La NADPH-ossidasi è un enzima complesso multicomponente trovato nella membrana plasmatica dei fagociti (Segal et al. 1993). Consiste principalmente di un citocromo b a basso potenziale e una flavoproteina che agisce come una catena che trasporta elettroni usando gli equivalenti prodotti dal NADPH. Il NADPH è prodotto tramite la via dello shunt esosomofosfato (ciclo dei pentosio- fosfati), mediante l’ossidazione del glucosio. Studi effettuati su scavenger/inibitori hanno mostrato che l’O₂ prodotto dai macrofagi dei pesci non è particolarmente tossico per i loro batteri patogeni, ma lo sono perossido di idrogeno e/o i suoi derivati (Sharp et al. 1993; Hardie et al. 1996) (Fig.10).

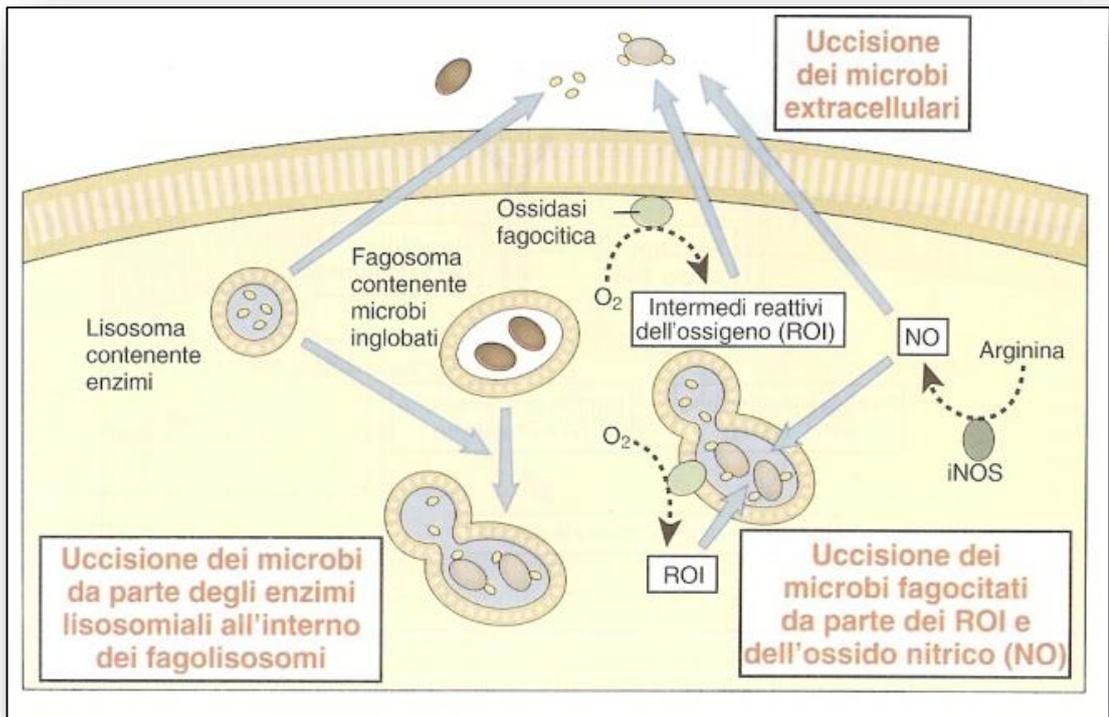


Fig. 10: Differenti meccanismi di killing.

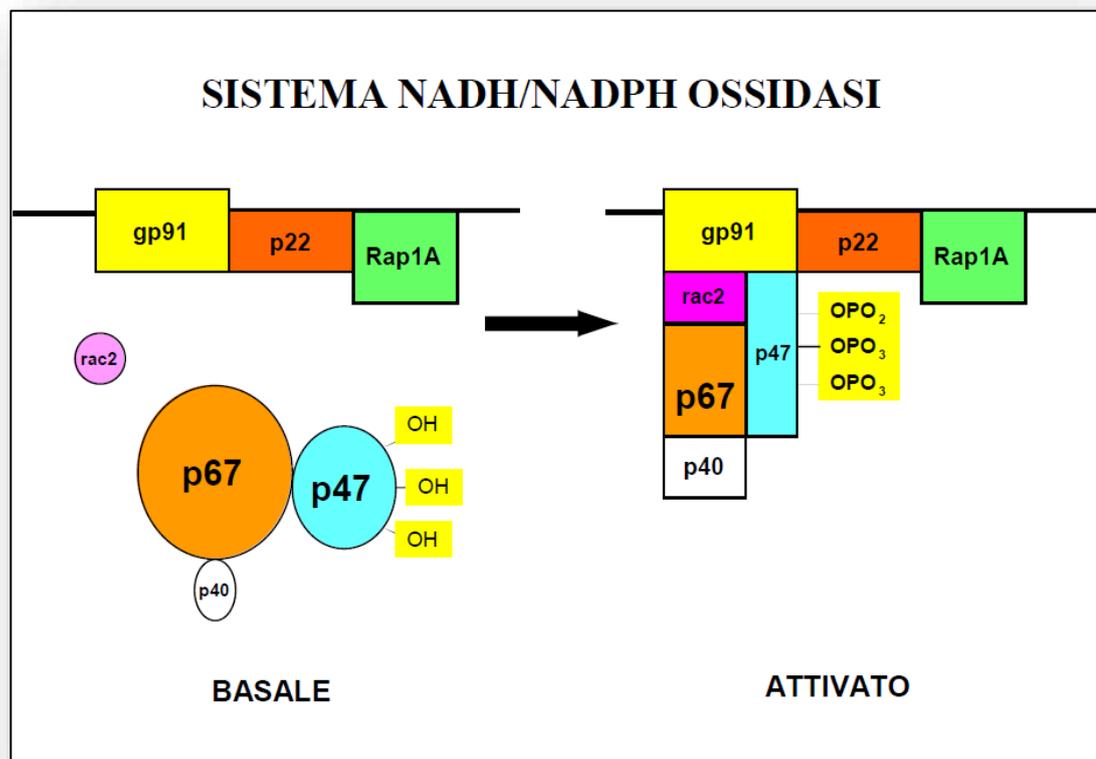


Fig. 11: Attivazione della NADPH-ossidasi leucocitaria (Babior, 1999).

È noto che alcune parti che compongono la NADPH-ossidasi, in fase di quiescenza si trovano a livello della membrana (citocromo b 558 e forse rap-1), mentre le altre parti sono localizzate nel citosol (p47-phox, p67 phox la componente N che si lega al NADPH ed una quarta possibile componente, α). Dopo la fagocitosi indotta da uno stimolo, le componenti che si trovano sul citosol si associano e si muovono verso la membrana, un evento forse mediato dalla fosforilazione di p47-phox; quando le componenti del citosol si associano alle altre componenti presenti sulla membrana, l'ossidasi diventa cataliticamente attiva e p47-phox viene fosforilata (Fig.11). Esistono evidenze della presenza di NADPH-ossidasi nei fagociti di trota (Secombes et al. 1992; Shiibashi et al. 2001) e di spigola (Vazzana et al. 2003).

Praticamente non si conosce nulla riguardo i meccanismi di killing ossigeno-indipendenti dei fagociti. È noto che i fagociti dei pesci possiedono una grande varietà di enzimi (lisozima, proteine cationiche, citochine citotossiche, peptidi antimicrobici etc.) che sarebbe potenzialmente battericida in seguito alla fusione dei lisosomi con i fagosomi.

Gli organi linfoidei dei pesci teleostei

Nei Mammiferi gli organi linfoidei primari, timo e midollo osseo, sono responsabili rispettivamente del differenziamento dei linfociti T, deputati alla risposta specifica cellulare, e dei linfociti B, deputati alla risposta umorale specifica. Gli organi secondari, quali la milza, i linfonodi, e il tessuto associato alle mucose (MALT), rappresentano il microambiente in cui i linfociti interagiscono tra loro e con l'antigene. Quest'ultimi tessuti non sembrano essere organizzati nello stesso modo nei Teleostei, in quanto pur riconoscendo una divisione fisiologica per la produzione di cellule specifiche, gli organi possono essere considerati a funzione mista, in grado cioè di produrre sia le cellule linfocitarie che mielocitarie e per questo sono definiti organi linfo-mieloidi (Fange, 1982; Rombout et al. 1993; Rombout et al. 2011). Il differenziamento primario dei linfociti T sembra risiedere nel timo (Ritter e Crispe, 1992; Romano et al. 1998; Romano et al. 2011; Trede e Zom, 1998) anche se l'intestino potrebbe essere una sede alternativa di differenziamento (Picchietti et al. 1997; Romano et al. 2011), come suggerito per i Mammiferi. Nei Teleostei sono però assenti il midollo osseo, i linfonodi e le placche di Peyer. Il rene cefalico è probabilmente l'analogo del midollo osseo (Zapata, 1979; Lamers, 1985), mentre la milza sembra essere maggiormente coinvolta nell'eritropoiesi nella maggioranza delle specie di pesci sinora studiate (Rowley et al. 1988; Van Muiswinkel et al. 1991). Gli organi linfo-mieloidi più importanti nei Teleostei sono rappresentati in Figura 12.

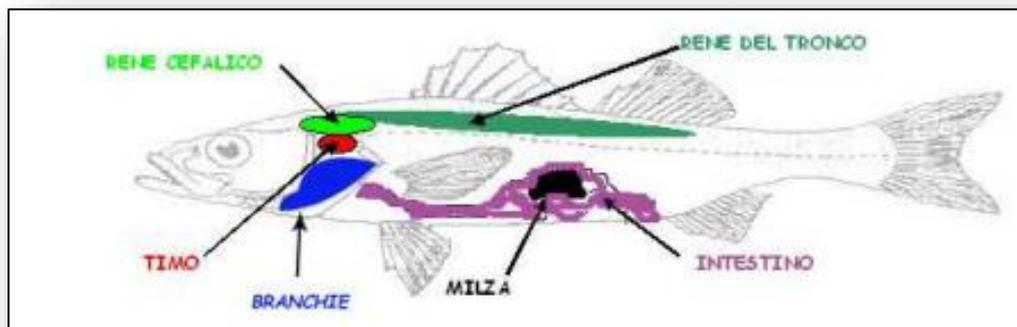


Fig. 12: rappresentazione schematica degli organi linfo-mieloidi nei teleostei.

L'immunità mucosale

Le superfici mucose dei pesci sono importanti siti di esposizione microbica (Esteban, 2012). Oltre ad essere barriere fisiche, le superfici mucose, più concretamente il muco, sono siti immunologicamente attivi muniti di difese cellulari e umorali (Fig. 13). Pertanto, queste superfici contengono linfociti B e le immunoglobuline, che svolgono un fondamentale ruolo nel mantenimento dell'omeostasi della mucosa (rivisto da Brandtzaeg, 2009). Dal momento che queste superfici rappresentano l'interfaccia tra ogni animale e l'ambiente esterno, sono esposte più di ogni altro sito, ad una continua offensiva contro microbi e fattori stressanti.

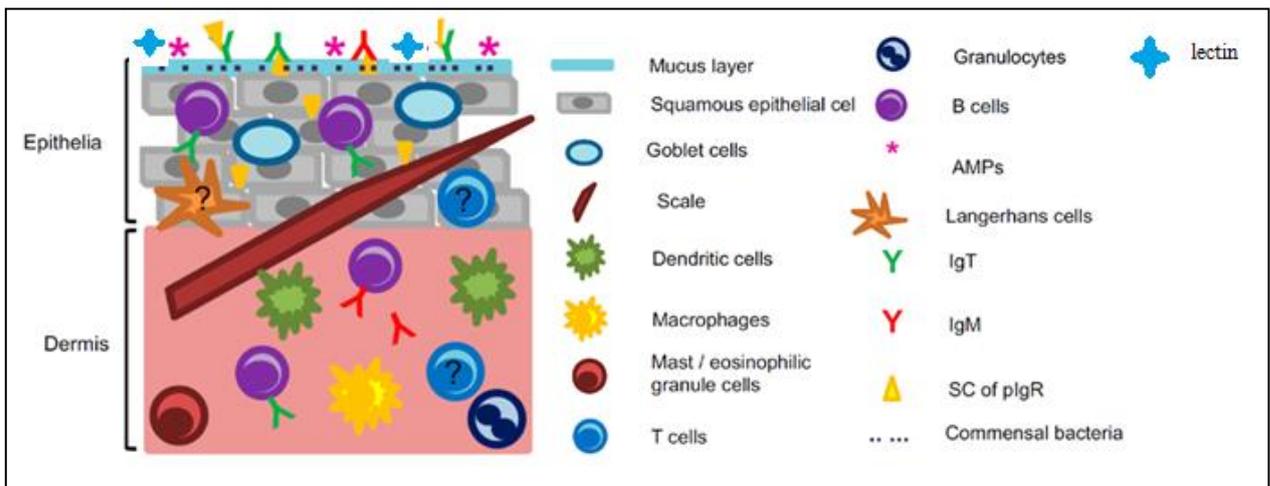


Fig. 13: rappresentazione schematica della pelle dei teleostei.

Pertanto, il muco dei pesci agisce come una barriera semipermeabile naturale, fisica, biochimica, dinamica che consente lo scambio di nutrienti, acqua, gas, odori, ormoni e gameti (Esteban, 2012). Il muco è composto principalmente da acqua e glicoproteine (Fletcher, 1978; Ingram, 1980), coniugati con oligosaccaridi ad alto peso molecolare chiamate mucine (Verdugo, 1990; Perez-Vilar et al. 1999). Insieme alle mucine, nel muco è presente un complesso di proteine, lipidi e ioni che crea un ideale nicchia per l'adesione microbica e la crescita (Gomez et al. 2013). In realtà, queste mucine esercitano una barriera meccanica prevenendo l'adesione del patogeno ai tessuti sottostanti (Nigam et al. 2012). Tra le sue funzioni, il muco è coinvolto nella respirazione, regolazione osmotica e ionica, riproduzione, locomozione, difesa contro le infezioni microbiche, resistenza alle malattie (Shephard, 1994; Khong et al. 2009). Allo stesso tempo, il muco gioca un ruolo fondamentale nei meccanismi di difesa agendo come una barriera biologica (Raj et al. 2011; Subramanian et al. 2008). Ciò si verifica perché in questo strato di muco, particelle, batteri o virus sono intrappolati e rimosso dalla mucosa dalla corrente dell'acqua (Mayer, 2003). Inoltre, lo strato di muco è sostituita continuamente e il suo spessore e

la composizione impedisce al patogeno di penetrare nei tessuti sottostanti (Tort et al. 2003; Nigam et al. 2012). Fino ad oggi, c'è una conoscenza limitata circa i meccanismi di difesa del muco nei pesci. Le molecole immunitarie presenti nel muco di pesce includono le glicoproteine, lisozima, immunoglobuline, le proteine del complemento, lectine, agglutinine, calmodulina, interferone, proteina C-reattiva, flavoenzimi, enzimi proteolitici e peptidi antimicrobici (Alexander et al. 1992; Sherphard, 1994; Nigam et al. 2012; Cole et al. 1997; Ma et al. 2013; Cammarata et al 2014) che esercitano attività inibitoria o litico contro diversi tipi di agenti patogeni (Whyte, 2007; Subramanian et al. 2008). Questa composizione gli conferisce la sua adesività, visco-elasticità, il trasporto e la capacità di protezione (Gomez et al. 2013). Sfortunatamente, l'insieme dei fattori immunitari presenti nel muco e il loro preciso ruolo immunologico è poco conosciuto (Li et al. 2013) ed è limitato soprattutto a un paio di specie di pesci d'acqua dolce.

1.5. Specie oggetto di studio

Le specie oggetto di studio della presente tesi di Dottorato di Ricerca sono state:

- *Sparus aurata*
- *Dicentrarchus labrax*

La specie *Sparus aurata* comunemente detta “Orata” (Fig.14 A) è un pesce subtropicale dal corpo ovale, oblungo e compresso appartenente alla famiglia degli Sparidi. La colorazione del dorso è grigia argentea con strisce brune e giallastre alternate, una larga macchia nera all’origine della linea laterale continua sopra una parte dell’opercolo ed è bordata di rosso. Si distingue dalle altre specie di Sparidi per la presenza di una fascia dorata sul capo, interposta fra gli occhi e bordata da due bande nere, soprattutto negli adulti. Una linea longitudinale nera è presente sulla pinna dorsale; la pinna caudale è grigio-verdastra con il bordo scuro, le altre pinne sono grigio-chiare. L’orata è naturalmente presente nel mar Mediterraneo, nel mar Nero, a est dell’oceano Atlantico dalle isole britanniche, lo stretto di Gibilterra a Capo Verde intorno alle isole Canarie. *Sparus aurata* è un pesce demersale, frequenta le praterie di fanerogame e i fondali sabbiosi. I giovani arrivano sino a 30 m di profondità mentre gli adulti possono arrivare sino a 150 m di profondità. E’ considerato un pesce sedentario, anche se le migrazioni è probabile che si verificano sull’orientale costa atlantica, dalla Spagna alla Gran Bretagna. Si tratta di una specie eurialina che in primavera si muove verso acque costiere protette in cerca di cibo e di temperatura più mite (trofica migrazione). Nel tardo autunno torna al mare per riprodursi essendo molto sensibili alle basse temperature (limite inferiore letale è di 2 °C). L’orata è principalmente carnivora (ad esempio cozze e ostriche), in via accessoria erbivora. Gli esemplari di *Sparus aurata* sono ermafroditi proterandrici; ovvero sviluppano prima gli organi maschili e poi quelli femminili ciò fa sì che gli individui intorno a 20-30 cm siano di norma maschi, mentre quelli di taglia superiore siano femmine. Durante la fase maschile, la gonade bisessuale ha funzione testicolare, con spermatogenesi asincrona e aree non ovariche funzionali. Lo sviluppo ovarico è anch’esso asincrono, e le femmine sono definite “*spawners batch*” ovvero “lotto di riproduttori” poiché possono deporre 20000-80000 uova al giorno per un periodo fino a tre mesi. Nel Mediterraneo, si riproducono tra ottobre e dicembre. Le uova sono sferiche e pelagiche, con un diametro leggermente inferiore a quello di un millimetro. Lo stadio larvale planctonico dura circa cinquanta giorni a 17-18 °C. L’orata, per le sue caratteristiche di eurialità, flessibilità trofica e il suo elevato valore commerciale, è una specie di cruciale importanza nell’economia dell’acquacoltura costiera della regione mediterranea di cui rappresenta buona parte della produzione.

La specie *Dicentrarchus labrax* detta comunemente spigola o branzino (Fig.14 B) appartiene

alla classe degli Osteitti, all' ordine Perciformi e alla famiglia Moronidae. La distribuzione della specie interessa l' Atlantico orientale dalla Norvegia al Marocco, Isole Canarie e Senegal ma anche Mediterraneo e Mar Nero. Gli ambienti in cui è possibile trovare la specie sono quelli demersali, oceanodromi, salmastri marini e di acqua dolce e in cui il clima sia di tipo subtropicale con temperature comprese tra gli 8 °C e i 24 °C. La distribuzione batimetrica va dai dieci ai cento metri. Penetra nelle lagune e talvolta risale anche i fiumi. Il corpo è affusolato e compresso, il capo robusto con muso appuntito e bocca larga. Il pre-opercolo porta lungo il margine inferiore delle grosse spine rivolte in avanti. La prima delle due pinne dorsali ha raggi spinosi robusti e acuminati. I primi tre raggi della pinna anale sono spinosi. La livrea è grigio-argentea sui fianchi, scura sul dorso e bianca sul ventre. Può superare i 100 cm di lunghezza. I maschi raggiungono la maturità sessuale all'età di due anni mentre le femmine a quella di tre. Tra gennaio e marzo, le spigole si radunano in gruppi numerosi per riprodursi dopo essersi portate in acque salmastre. Generalmente più maschi fecondano le uova di una sola femmina. Le spigole sono tipici predatori e preferiscono cacciare nelle ore notturne (Pickett e Pawson, 1995). E' una specie non inclusa nella Lista Rossa IUCN.

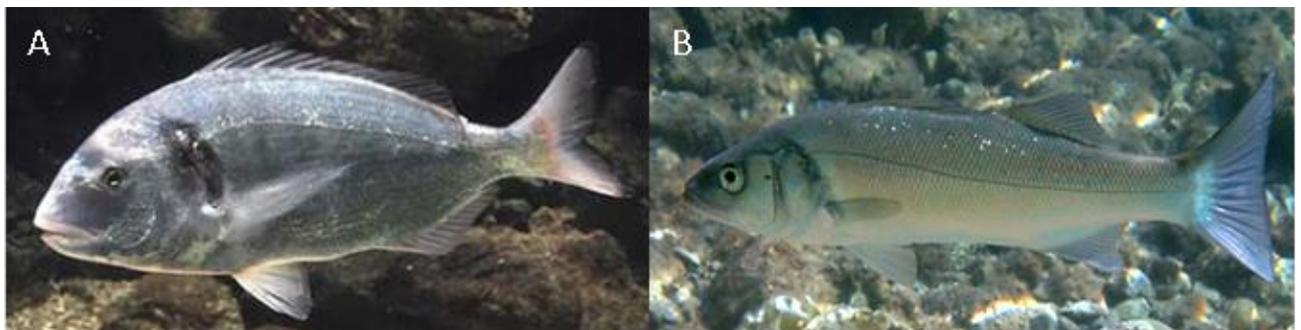


Fig. 14: (A) *Sparus aurata*

(B) *Dicentrarchus labrax*.

Obiettivi

Obiettivi

Negli ultimi anni il benessere dei pesci o “fish welfare” sta ricevendo crescente attenzione e ciò ha contribuito allo sviluppo di politiche relative al benessere dei pesci (Direttiva del Consiglio 98/58/CE e la raccomandazione sul benessere dei pesci di allevamento dal Consiglio d’ Europa nel 2005). Tuttavia, nonostante il crescente interesse per il benessere dei pesci, non è chiaro come il benessere dei pesci dovrebbe essere definito o valutato (Huntingford et al 2006; Ashley, 2007). In acquacoltura, i pesci sono spesso esposti a condizioni di stress, a causa di pratiche di allevamento come la manipolazione, la selezione, l’ alta densità di allevamento, il trasporto, le condizioni di pre-macellazione e la macellazione. Al fine di ridurre questo stress e per aumentare sia il benessere dei pesci sia le esigenze di produzione, si sta cercando di incrementare le conoscenze sulla biologia dei pesci di allevamento. Pertanto gli obiettivi fondamentali di questa tesi di dottorato sono stati:

1. Dimostrare che il comportamento può essere utilizzato per valutare il benessere dei pesci d'allevamento. Lo studio delle interazioni sociali potrebbe fornire innovativi parametri di benessere applicabili anche in acquacoltura.
 - *Mettere a punto tecniche, in condizioni controllate, per studiare le interazioni sociali che si instaurano in Sparus aurata e in Dicentrarchus labrax e l’assetto fisiologico, endocrino e il welfare di queste specie commerciali prese in esame;*
 - *Verificare se le interazioni sociali in Sparus aurata e in Dicentrarchus labrax possano essere considerate dei fattori stressanti capaci di modulare alcuni parametri plasmatici (cortisolo, glucosio, ematocrito, osmolarità) immunologici (fagocitosi) e fisiologici (abilità di nuoto) legati allo stress;*
2. Verificare se le informazioni biologiche che derivano dallo studio del muco di pesci teleostei possono essere utilizzate come nuovi bioindicatori di stress e in particolare di contaminazione da metalli;
3. Valutare gli effetti dell’ utilizzo di immunostimolanti nella dieta dei pesci su alcuni parametri del sistema immunitario e sullo stato fisiologico e ormonale di *Dicentrarchus labrax* per verificare se questo nuovo tipo di alimentazione arricchita con vitamine, può avere degli effetti positivi sullo stato di salute di questa specie.

Materiali e metodi

2. Materiali e Metodi

2.1. La valutazioni della gerarchia sociale in *Sparus aurata*

- **Animali**

Per gli esperimenti sono stati utilizzati individui di *Sparus aurata* del peso di 100-150 gr provenienti dall'impianto intensivo *off-shore* di Trappeto (PA). Dopo la cattura tutti i pesci sono stati trasportati nello stabulario del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) dell'Università degli Studi di Palermo e posti in vasche di stabulazione della capacità di 500 litri sino al momento delle osservazioni.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti nello stabulario del Dipartimento utilizzando vasche sperimentali della capacità di 200 litri; in ogni vasca i parametri chimico-fisici quali temperatura, salinità, percentuale di ossigeno disciolto e concentrazione di nitriti sono stati monitorati costantemente:

- La temperatura, controllata costantemente, è stata mantenuta a un valore medio di 18°C per mezzo di refrigeratori collegati alle vasche;
- L'ossigeno disciolto è stato costantemente mantenuto a concentrazioni maggiori di 6 mg l⁻¹ mediante pompe di aerazione;
- Le concentrazioni di nitriti monitorate ogni quindici giorni utilizzando un test colorimetrico, sono state mantenute a valori inferiori di 0,2 mg l⁻¹;
- La salinità è stata misurata ogni quindici giorni e le variazioni sono state corrette aggiungendo acqua distillata per mantenerla a un valore costante di 38 ‰.

Le vasche sono state oscurate su tre lati per eliminare fenomeni di riflessione e ridurre le influenze esterne sui pesci.

- **Modelli sperimentali**

Per le prime osservazioni comportamentali sono stati utilizzati tre modelli sperimentali che saranno discussi in seguito.

- ✓ Primo modello (random): i tre pesci sono stati inseriti nella vasca contemporaneamente; tempo di osservazione: ventiquattro ore.
- ✓ Secondo modello (sequential): è stato inserito il primo pesce e a distanza di due giorni l'uno dall'altro sono stati inseriti gli altri due. Tempo di osservazione: 15 giorni.
- ✓ Terzo modello: la vasca è stata divisa in due reparti utilizzando un separatore ondulato e sono stati inseriti i pesci uno in ogni reparto. Al quarto giorno è stato tolto il separatore. Tempo di

osservazioni: cinque giorni.

- **Osservazioni etologiche**

Le diverse fasi del comportamento sono state registrate mediante una videocamera (Fig. 15). Dall'osservazione delle interazioni tra i pesci presenti nella vasca, sono stati distinti gli individui costituenti ciascun gruppo, in dominante, subordinato β e subordinato γ . L'assegnazione del relativo rango sociale è stata eseguita con una metodologia in precedenza utilizzata (McCarthy et al. 1999; Cammarata et al. 2012). In letteratura, è stato dimostrato che un elevato rango sociale è spesso correlato con un aumento dell'aggressività e con un accesso preferenziale al cibo (Johnsson 1997, McCarthy et al. 1999), per cui i parametri che hanno permesso di distinguere tre soggetti dominanti e subordinati sono stati l'ordine di alimentazione e l'aggressività di ciascun esemplare. Durante tutto l'esperimento il metodo utilizzato per il campionamento del comportamento di *S. aurata*, è stato il *Focal Sampling* che si basa sull'osservazione di un individuo scelto a caso per un determinato periodo e sulla registrazione di tutte le categorie di comportamento da esso assunte. La tecnica adoperata per l'analisi del comportamento generale è l'*Instantaneous Sampling* che consiste nel registrare il comportamento a intervalli di quindici minuti. Ognuno di questi intervalli di osservazione è stato diviso in successivi brevi periodi di dieci secondi detti intervalli campionari. Nell'istante alla fine di ogni intervallo l'osservatore registra quale categoria comportamentale si sta verificando. Per ogni categoria comportamentale registrata è stata calcolata una frequenza percentuale.

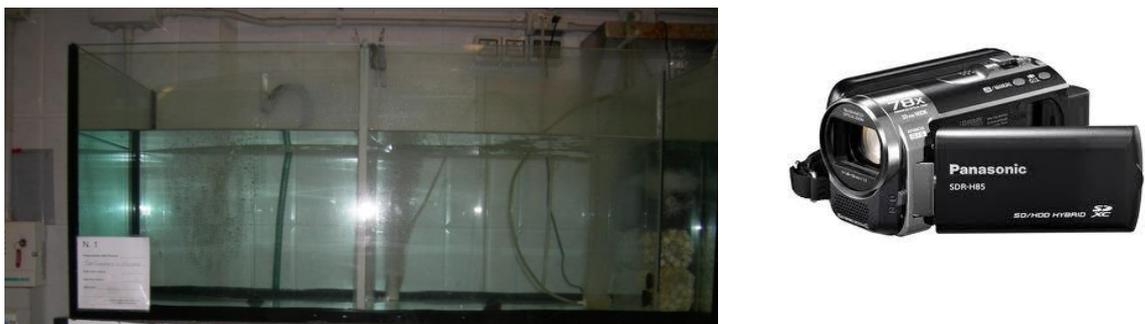


Fig. 15: vasca sperimentale dello stabulario e videocamera.

- **Prelievo del sangue e preparazione del plasma**

Prima di procedere al prelievo del sangue, l'individuo in esame è stato anestetizzato immergendolo per circa due minuti in acqua di mare contenente 0,25gr litro⁻¹ di acido etil-estere amino benzoico. Per ottenere una quantità sufficiente di sangue è stato utilizzato il metodo del prelievo per puntura cardiaca (Fig. 16). Tale procedura non danneggia l'animale. Per lo studio dei parametri plasmatici, il sangue è stato prelevato utilizzando siringhe da 2 ml di capacità e contenenti 0,2 ml di eparina. Una volta ottenuto il campione di sangue, il plasma è stato separato

per centrifugazione a 800 g per dieci minuti a 4 °C, liberato dal residuo corpuscolare, e conservato in aliquote a -20 °C.

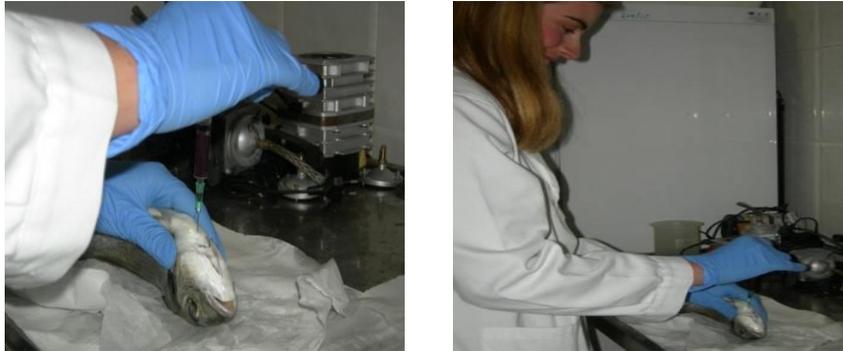


Fig.16: prelievo del sangue per puntura cardiaca.

- **Strisci di sangue**

Con i campioni di sangue ottenuti da ogni individuo, sono stati fatti degli strisci ematologici; dopo i vetrini sono stati colorati utilizzando la colorazione di May-Grunwald-Giemsa. Questa colorazione permette di distinguere la morfologia generale dei vari tipi cellulari. Su un vetrino porta oggetto, trattato con poli L-Lisina diluita 1/10, sono stati depositi 100 µl di sospensione cellulare (5×10^6 cellule/ml) e le cellule sono state lasciate aderire per circa trenta minuti a 18 °C. Poi sono state fissate in metanolo e colorate con May-Grunwald (Sigma) per 3 minuti. I vetrini sono stati sciacquati in acqua distillata per dieci secondi e si colorati con Giemsa (Sigma) per dieci minuti. A questo punto le cellule sono state sottoposte a delle deidratazioni in alcool etilico al 30% per un minuto, al 50%, al 70% e al 100%. In seguito, le cellule sono state deidratate in xilene per 6 minuti. Subito dopo per chiudere permanentemente il vetrino, è stata posta su di esso una goccia di Permaunt (Eukitt della BioOptica Milano) e coperto delicatamente con un vetrino coprioggetto. I vetrini così preparati sono stati lasciati ad asciugare in stufa a 37 °C per circa due giorni, dopo si esegue la conta cellulare al microscopio ottico.

- **Ematocrito**

Dopo aver prelevato il sangue da ogni individuo lo si lascia scorrere in un microcapillare eparinato che viene poi chiuso con della plastilina, si centrifuga il capillare per cinque minuti a 10.000 rpm e si legge quindi l'ematocrito su un'apposita scala.

- **Cortisolo**

Per la determinazione plasmatica del cortisolo è stato utilizzato un kit della Intermedical Diagnostics (Milano).

Principio del metodo:

I campioni sono stati incubati nei pozzetti della micro piastra coattati con un anticorpo anti-Cortisolo contemporaneamente ad un cortisolo marcato con l'enzima perossidasi. Il cortisolo presente nel campione compete con il marcato per il legame con l'anticorpo presente nella piastra. Dopo l'incubazione, la quantità di antigene legato marcato viene rilevata dall'aggiunta del cromogeno-substrato. La quantità di colore sviluppata, rilevata a 450 nm, è inversamente proporzionale alla concentrazione di cortisolo presente nel campione.

- **Osmolarità**

Per la determinazione dell'osmolarità dei campioni di plasma ottenuti, è stato utilizzato un osmolarimetro (Roebing) che valuta l'osmolarità del plasma registrando l'abbassamento del punto di congelamento della soluzione.

- **Test per la determinazione della glicemia**

La glicemia è stata valutata utilizzando l'apparecchio Accutrend Easy con strisce reattive per il glucosio seguendo le istruzioni del produttore.

- **Isolamento delle cellule dell'essudato peritoneale**

Dopo aver anestetizzato il pesce, è stata disinfettata la sua parte ventrale con alcool etilico al 70%, ed è stato iniettato 10 ml di L-15 Medium (Leibovitz) isosmotico sterile all'interno della cavità peritoneale (Fig. 17); dopo aver massaggiato la superficie ventrale del pesce per circa dieci minuti, è stato eseguito il prelievo dell'essudato della cavità peritoneale. La sospensione così ottenuta è stata centrifugata a 400 g per dieci minuti a 4 °C. Dopo la centrifugazione, il supernatante è stato eliminato e il pellet, contenente le cellule della cavità peritoneale è stato risospeso in 1 ml di soluzione salina iso-osmotica (PBS Ca⁺⁺Mg⁺⁺ per saggio di fagocitosi) per effettuare la conta cellulare utilizzando la camera conta globuli di Neubauer.

- ✓ *Preparazione HBSS 10X (Hanks balanced salt solution)*

Per preparare 1L di soluzione sono stati mescolati: NaCl 190mM(80g/l), KCl 5,36mM(4g/l), glucosio 5,54mM (10g/l), KH₂PO₄ 0,44mM (0,6g/l), Na₂HPO₄ 0,56 mM (0,9g/l). Il pH è stato portato a 7,6 con NaOH 0,1N. La soluzione è stata filtrata utilizzando filtri da 0,22µm e diluita 1:10 con acqua distillata.

- ✓ *Preparazione PBS (Phosphate buffered saline) Ca⁺⁺Mg⁺⁺*

Per preparare 1L di soluzione mescolare NaCl 103,6mM(8g/l), KH₂PO₄1,46mM(200mg/l),

Na_2HPO_4 0,8mM (1,15mg/l), KCl 2,6 mM (200mg/l), $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 0,9mM (133mg/l), $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 0,49mM (100mg/l) e portare a volume. L'osmolarità è stata corretta a 370mOsm. La soluzione è stata filtrata utilizzando filtri da 0,22 μm .

✓ *Preparazione del terreno di coltura L-15 Medium*

Per preparare 100 ml di soluzione sono stati mescolati: 1,4 g di L-15 medium, 100 μl di eparina, 13 mg di streptomicina, 6 mg di penicillina. L'osmolarità è stata portata a un valore di 370 mOsm aggiungendo una quantità opportuna di NaCl. Il terreno così preparato è stato filtrato utilizzando filtri da 0,22 μm .



Fig.17: inoculo del medium L-15 nella cavità peritoneale di *Sparus aurata*.

• **Conta cellulare al microscopio**

Prima della conta, se il campione è troppo concentrato, si possono eseguire delle diluizioni delle cellule in terreno. La camera di Neubauer è molto utile ai fini della conta cellulare poiché si propone di ottimizzarne i tempi e la qualità rispetto a metodi alternativi e/o obsoleti. La camera può essere formata da 4 x 4 o 5 x 5 quadrati ognuno dei quali va a formare una griglia: vista al microscopio ottico. La scelta dei quadrati e dei lati contigui per la conta cellulare è del tutto facoltativa. L'area centrale della camera (Fig. 18) è di 1 mm x 1 mm ed è separata, da linee triple, in 16 gruppi di 16 quadratini; si devono contare le cellule di 5 o 10 gruppi di 16 quadratini, includendo le cellule che toccano il margine superiore ed il lato destro dei quadratini e omettendo quelle che non toccano il margine inferiore e il lato inferiore ed il lato sinistro. Una volta effettuata la conta, per il calcolo del numero di cellule per ml si usa la formula: [n. cellule osservate/ 0,02 (volume di ogni camera)] x 1000 (rapportate a 1ml).

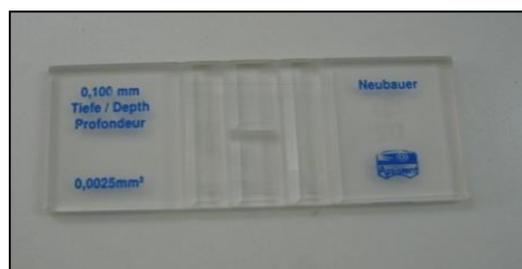


Fig. 18: Camera di Neubauer

- **Test di esclusione**

La valutazione della vitalità delle cellule è stata eseguita tramite il test di esclusione del Trypan-Blu allo 0,1% (10 mg in 10 ml di HBSS 1 x e poi diluito a dieci con la sospensione cellulare). Il trypan blue è un colorante utilizzato per la conta della mortalità cellulare. La funzione di questo colorante è di penetrare selettivamente nelle cellule morte. La causa è da ricercare nella grande selettività della membrana cellulare. Infatti, una cellula non più vitale, non presenta una membrana cellulare intatta e questo permette l'ingresso all'interno del citoplasma del colorante che, altrimenti, non avrebbe alcuna possibilità di entrarvi e, quindi, rendere riconoscibili le cellule da localizzare ai fini della conta di mortalità.

- **Saggio di fagocitosi *in vitro***

Per il saggio di fagocitosi è stato utilizzato il metodo di Cammarata et al. (1994) modificato. I lieviti del tipo *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma) sono stati preparati in acqua distillata allo 0,25% w/v (1×10^6 lieviti/ml), autoclavati per 15 minuti, centrifugati due volte a 2000 g a 4°C per 5 minuti e incubati per un'ora a 20 °C con una soluzione di eosina-Y ad una concentrazione finale di 0,05%. I lieviti sono stati lavati quattro volte e risospesi a una concentrazione finale di 0,0125% w/v in PBS $Ca^{++}Mg^{++}$ e conservati per un massimo di tre settimane. Per gli esperimenti, i lieviti sono stati lavati una volta e risospesi in PBS $Ca^{++} Mg^{++}$. Aliquote di 100 µl di sospensione cellulare ($2,5 \times 10^6$) sono state aggiunte a 100µl di lieviti e incubati in provette da 1 ml con leggera agitazione per trenta minuti a 20°C. In seguito sono stati aggiunti 50µl di una soluzione mascherante (Trypan Blue) 2 mg/ml Crystal Violet in 0,02 di tampone citrato, pH 4,4, contenente 33 mg/ml di NaCl. Una goccia di questa sospensione è stata poi posta su un vetrino ed esaminata al microscopio a ultravioletti (Diaplan, LeikaWetzalar, Germany). Le cellule sono state contate a un ingrandimento 100 x. I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule contenenti lieviti fagocitati su numero totale di cellule. Per la determinazione della percentuale di fagocitosi e per calcolare l'indice fagocitico si osservano dieci campi visivi per vetrino e si calcola la

percentuale di fagocitosi e l'indice fagocitico come la seguenti formule:

Percentuale di fagocitosi = n° di cellule che ha fagocitato / n° di cellule totali $\times 100$.

Indice fagocitico = n° di lieviti fagocitati / n° di cellule che ha fagocitato.

2.2. Valutazione della gerarchia sociale in *Dicentrarchus labrax*

L'esperimento è stato condotto utilizzando tre individui di *Dicentrarchus labrax* (A, B e C) presi in maniera casuale da un lotto di 20 pesci allevati in una vasca di 3,5 m³ in fibra di vetro. Gli animali scelti sono stati lasciati a digiuno per 24 h e sono stati impiantati chirurgicamente con trasmettitori radio CEMG-R11-25 EMG (Lotek Wireless™) (Fig 19).



Fig. 19: inserimento del trasmettitore nella cavità addominale di *Dicentrarchus labrax*.

I pesci operati sono stati lasciati riprendere nella vasca con il lotto originale al fine di ridurre l'insorgenza di una gerarchia sociale. I pesci dopo circa 5 giorni (Carbonara et al. 2014) sono stati trasferiti contemporaneamente in una vasca di 1 m³ di vetro trasparente (tempo 0) utile per le osservazioni comportamentali. La temperatura dell'acqua ($18 \pm 0,5$ °C), il fotoperiodo (00:12 D: L) e il ricircolo dell'acqua (10 L min^{-1}) sono stati mantenuti costanti per l'intera durata dell'esperimento (15 giorni).

Il segnale radio EMG, connesso all'attività della muscolatura rossa, è stato registrato utilizzando il ricevitore radio-segnale RX-400 (Lotek Wireless TM) ogni giorno per un'ora tra 22 gennaio 2015 e il 5 febbraio 2015. Contemporaneamente il comportamento individuale dei pesci è stato registrato attraverso una videocamera (Fig. 20). I parametri utilizzati per classificare gli animali in "dominante", "β" subordinato e "γ" subordinato sono stati l'aggressività e la priorità all'alimentazione.

I campionamenti sono stati fatti all'inizio ($t = 0$) e alla fine dell'esperimento (dopo 15 giorni). I parametri analizzati sono stati: ematocrito (HCT), emoglobina (Hb), conta eritrocitaria (RBCC), il glucosio plasmatico e il lattato (reazione Trinder), la concentrazione di lisozima (test turbidimetrico modificato per lettore di micropiastre) e la concentrazione plasmatica di cortisolo (ELISA).

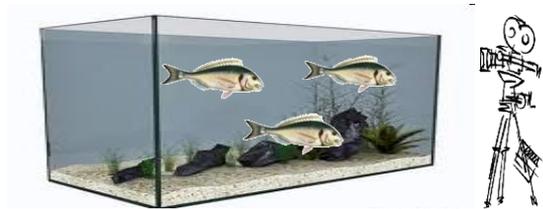


Fig. 20: primo modello sperimentale in cui i tre pesci sono stati inseriti contemporaneamente nella vasca sperimentale.

Il sangue, prelevato a livello del secondo arco branchiale, è stato utilizzato "intero" per le analisi di emoglobina, ematocrito e per la conta eritrocitaria, il resto è stato centrifugato (3000 rpm per 5 minuti) ed il plasma così ottenuto è stato aliquotato e conservato a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ per le successive analisi.

L'ematocrito (Hct) può essere definito come il rapporto tra le cellule e il plasma nel sangue ed è espresso come percentuale. Per le analisi sono stati utilizzati microcapillari eparinizzati (lunghezza 75 mm; diametro interno 1,2 mm; diametro esterno 1,5 mm) (Fig. 21). Immediatamente dopo il prelievo i capillari sono stati riempiti (a circa $\frac{3}{4}$ dell'intero volume) e chiusi ad una estremità con sigillante commerciale. Il campione è stato successivamente centrifugato a 13000 rpm per 3 minuti (centrifuga Tehtnica Centric®) e letto subito dopo.



Fig. 21: risultato della centrifugazione del sangue intero in un capillare per microematocrito.

La conta eritrocitaria (RBCC) è stata eseguita al microscopio (Nikon 400E) con ingrandimento di 40x nella camera conta-globuli di Bürker (Fig. 22) usando la soluzione di Hendricks's (Hendricks, 1952) come fissativo/diluente. Un volume pari a 5 μL di sangue intero è stato diluito in 1 mL di soluzione così da ottenere una diluizione di 1:200. La soluzione così ottenuta è stata conservata a 4°C prima della conta. La concentrazione eritrocitaria è stata espressa come 10^6 cellule per mm^{-3} .

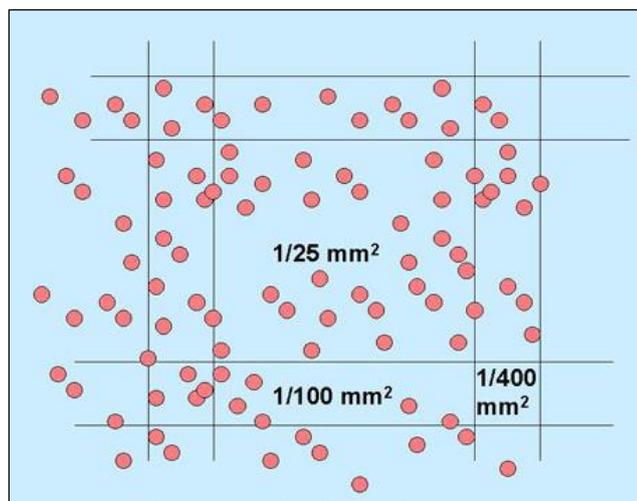


Fig. 22: esempio di conta cellulare con camera conta globuli di Bürker.

La concentrazione di emoglobina totale (mg/mL) è stata determinata con un kit commerciale (Sigma, St Louis, Missouri, USA) modificato per l'uso del microplate (Sutton et al. 2006) basato sulla conversione dell'emoglobina in ciano-metaemoglobina e la misura dell'intensità del colore a 540 nm (lunghezza d'onda di massimo assorbimento). La concentrazione è stata calcolata attraverso la comparazione con una curva standard costruita con emoglobina umana (Sutton et al. 2006).

L'ultimo parametro ematico indagato, indice dell'immunità aspecifica, è stato il lisozima (risposta terziaria allo stress). La concentrazione del lisozima plasmatico è stata misurata utilizzando il metodo turbidimetrico opportunamente modificato per la lettura di micro piastre (Sutton et al. 2006). In una sospensione (0,025% in tampone fosfato 0,06 M, pH 6,2) di *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) è stata registrata la riduzione (lisi di *M. lysodeikticus*) di assorbanza a 450 nm, misurando l'assorbanza prima e dopo l'incubazione (20 minuti a 37 °C). La concentrazione è stata calcolata attraverso la comparazione con una curva standard costruita utilizzando lisozima liofilizzato di uovo di gallina (HEWL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). I risultati sono stati espressi come $\mu\text{g mL}^{-1}$ HEWL.

2.3. Effetti dell'esposizione ai metalli pesanti sul muco di *Sparus aurata*

- **Animali**

Cento otto esemplari di *Sparus aurata* (60 ± 35 g di peso e $16 \pm 3,2$ cm di lunghezza) ottenuti da Doramenor acquacoltura SL (Murcia, Spagna), sono stati messi in vasche da 250 L presso l'Università di Murcia. La temperatura dell'acqua è stata mantenuta a 20 ± 2 °C con una portata di 900 L h^{-1} e 28 ‰ salinità. Il fotoperiodo è stato di 12 ore di luce e 12 h di buio e i pesci sono stati alimentati quotidianamente al 2% del loro peso corporeo con pellet commerciale (Skretting, Spagna). I pesci sono stati lasciati acclimatare per 15 giorni prima dell'inizio della fase sperimentale. Tutti i protocolli sperimentali sono stati approvati dal Comitato Etico dell'Università di Murcia.

- **Disegno sperimentale**

I pesci sono stati suddivisi in modo casuale in sei vasche identiche (18 pesci per vasca): tre vasche sono state usate come controllo (gruppi di controllo), in una vasca sono stati disciolti 5 mM di triossido di arsenico (As_2O_3 , Fluka) (gruppo As), in un'altra sono stati disciolti 5 mM di cadmio cloruro (CdCl_2 , Sigma) (gruppo Cd) e nell'altra sono stati disciolti 0,04 mM di cloruro di metilmercurio (CH_3HgCl , Sigma) (gruppo Hg) (Fig 23). La quantità esatta dei tre metalli pesanti (precedentemente sciolto in una piccola quantità di acqua) è stata somministrata direttamente nell'acqua delle vasche. Sei pesci per vasca sono stati campionati dopo 2, 10 e 30 giorni di trattamento.



N=18

Controllo

N=18

Arsenico 5 μ M
(As₂O₃, Fluka)

N=18

Cadmio 5 μ M
(CdCl₂, Sigma)

N=18

Metilmercurio 0,04 μ M
(CH₃HgCl, Sigma)

Fig. 23: modello sperimentale.

- **Raccolta del muco**

Campioni di muco sono stati raccolti con il metodo di Palakshaet al. (2008) apportando alcune modifiche. In breve, il muco è stato raccolto delicatamente raschiando la superficie dorso-laterale dei pesci con un raschietto evitando la contaminazione con il sangue e con le escrezioni urogenitali ed intestinali. Dopo la raccolta, il muco è stato omogeneizzato con un volume di soluzione salina tamponata con Tris (TBS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mMNaCl). L'omogenato è stato centrifugato (1500 rpm, 10 min, 4 °C), ed il supernatante è stato successivamente liofilizzato. I campioni di muco liofilizzati sono stati disciolti in acqua Milli-Q. La concentrazione proteica presente in ogni campione è stata determinata con il metodo di Bradford (1976) utilizzando l'albumina di siero bovino (BSA, Sigma) come standard. I campioni, alla concentrazione proteica di 500 mg ml⁻¹, sono stati aliquotati e conservati a -20 °C fino al momento delle analisi.

- **Test di emoagglutinazione**

L'attività di emoagglutinazione (HA) dei campioni di muco è stata analizzata in piastre a 96 pozzetti utilizzando una sospensione all'1% di eritrociti di coniglio (RBC) in PBS (PBS: KH₂PO₄ 6 mM, Na₂HPO₄ 0,11 mM, NaCl 30 mM, pH 7,4). Gli eritrociti sono stati forniti dall'Istituto Zooprofilattico della Sicilia (Palermo, Italia) e mantenuti in soluzione sterile di Alsever (citrato di sodio 27 mM, D-glucosio 115 mM, EDTA 18 mM, NaCl 336 mM in acqua distillata, pH 7,2). La miscela di reazione è stata eseguita in soluzione salina tamponata con Tris (TBS: 50 mM Tris HCl, NaCl 0,15 M, pH 7,4) arricchita con 1% di RBC in TBS contenente 0,1% (w/v) di gelatina. Aliquote di 25 µl di campioni di muco diluiti serialmente sono stati mescolati con un volume uguale di sospensione RBC e incubate a 37°C per 1 h. Il titolo di emoagglutinazione (HT) è stato registrato come il reciproco della più alta diluizione che mostra completa agglutinazione. Il controllo negativo è stato fatto sostituendo il muco con TBS (contenente 0,1% (w / v) gelatina).

- **Determinazione del pattern di glicosilazione terminale**

Il pattern di glicosilazione dei campioni di muco di *Sparus aurata* è stato determinato da un test ELISA- lectin come descritto in precedenza (Neuhaus et al. 2007). Così, 10 mg dei campioni di muco sono incubati overnight a 4 °C in piastre a 96 pozzetti a fondo piatto, in triplice copia con 100 µl di tampone carbonato-bicarbonato 50 mM, a pH 9,6. Dopo tre lavaggi con 100 microlitri per pozzetto di PBS-T (0,1 M tampone fosfato (PBS) e 0,05% Tween 20, pH 7,3), le piastre sono state bloccate per 2 ore a temperatura ambiente con tampone bloccante contenente il 3% di BSA

in PBS-T , seguita da tre nuovi risciacqui con PBS-T. I campioni sono stati poi incubati per 1 h con 20 µg per pozzetto di lectine biotinilate (Tabella 4), lavate e incubate con streptavidina-perossidasi di rafano (1: 1000) per 1 h. Dopo il risciacquo completo con PBS-T le piastre sono state sviluppate utilizzando 100 µl di una soluzione 0,42 mM di 3,3',5,5'-cloridrato tetrametilbenzidina (TMB, Sigma), preparati ogni giorno in un / tampone acetato di sodio 100 mM di acido citrico (pH 5,4) contenente 0,01% H₂O₂. La reazione è stata bloccata dopo 10 minuti con l'aggiunta di 50 µl di H₂SO₄ 2M e le piastre sono stati lette a 450 nm in un lettore di piastre (FLUOSTAR Omega, BMG Labtech). Controlli negativi consistevano in campioni senza muco o senza lectine, i cui valori di densità ottica (OD) sono stati sottratti per ogni valore del campione. I dati sono presentati come la densità ottica a 450 nm per ogni specie di pesci e lectina utilizzati.

- **Livelli di IgM**

Livelli di IgM totali sono stati analizzati utilizzando il test immunoenzimatico (ELISA) (Cuesta et al. 2004). Le piastre sono state poi incubate per 1 ora con 100 µl per pozzetto anticorpo monoclonale di topo anti-orata (AquaticDiagnostics Ltd.) (1/100 in tampone bloccante), lavate e incubate con l'anticorpo secondario anti-topo IgG-HRP (1/1000 in tampone di bloccaggio, Sigma). Lavaggio, lo sviluppo e la lettura è stata effettuata come sopra. Controlli negativi consistevano in campioni senza muco o senza anticorpo primario, i cui valori di densità ottica (OD) sono stati sottratti per ogni valore del campione.

Valutazione delle attività enzimatiche

- **Lisozima**

L'attività lisozimatica è stata misurata secondo il metodo turbidimetrico descritto da Parry et al. (1965) con alcune modifiche. Cento microlitri di campioni di muco diluito con PBS 10 mM, pH 6,2, sono stati collocati in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto in triplice copia. Per ogni pozzetto, 100 microlitri di liofilizzato di *Micrococcus lysodeikticus* nel buffer di cui sopra (0,3 mg ml⁻¹, Sigma) è stato aggiunto come substrato. La diminuzione di assorbanza a 450 nm è stata misurata dopo 0 e 15 min a 22 °C in un lettore di piastre. Una unità di attività lisozimatica è stata definita come una riduzione di assorbanza di 0,001 min⁻¹. Le unità di lisozima presente nel muco sono stati ottenuti da una curva standard (HEWL, Sigma) ed i risultati sono stati espressi come U mg⁻¹ proteine muco.

- **Fosfatasi alcalina**

L'attività di fosfatasi alcalina è stata misurata incubando un uguale volume di campione muco con 4 mM p-nitrofenil fosfato liquido (Sigma) in 100 mM di tampone di bicarbonato di ammonio contenente 1 mM MgCl₂ (pH 7,8, 30 °C) come descritto da Ross et al. (2000). La densità ottica è stata misurata a intervalli di 1 minuto per oltre 3 ore a 405 nm in un lettore di piastre. La velocità iniziale della reazione è stato utilizzato per calcolare l'attività. Un'unità di attività è stata definita come la quantità di enzima necessario per liberare 1 micromole di prodotto p-nitrofenolo in 1 min.

- **Esterasi**

Attività esterasi è stata determinata secondo il metodo di Rosset al. (2000). Un volume uguale di campione muco è stato incubato con 0,4 mM p-nitrofenil substrato myristate in 100 mM di tampone di bicarbonato di ammonio contenente 0,5% Triton X-100 (pH 7,8, 30 °C). La densità ottica è stata determinata come sopra.

- **Perossidasi**

L'attività di perossidasi in campioni di muco è stata misurata utilizzando il metodo di Quade e Roth (1997). In breve, 30 µl di campione di muco sono stati diluiti con 120 µl di tampone di Hank (HBSS) senza calcio né magnesio in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto. Come substrati, sono stati aggiunti 50 µl di 20 mM di tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di ossigeno (H₂O₂) 5 mM. La reazione colorimetrica è stata interrotta dopo 2 minuti con l'aggiunta di 50 µl di 2 M di acido solforico e l'OD è stata letta a 450 nm in un lettore di piastre.

- **Ceruloplasmina-ossidasi**

L'attività ceruloplasmina ossidasi è stata misurata secondo Dunier et al. (1995). In breve, uguale volume di muco è stato incubato con il 0,1% di para-fenilendiammina in tampone acetato, pH 5,2 e 0,02% di sodio azide. La cinetica di incremento di assorbanza è stata seguita a 550 nm per 15 minuti.

- **Proteasi**

L'attività proteasica è stata quantificata con il saggio di idrolisi utilizzando l'azocaseina come substrato secondo il metodo di Ross et al. (2000). In breve, un equal volume di campione di muco è stato incubato con 100 mM di tampone di bicarbonato di ammonio contenente lo 0,7% di azocaseina (Sigma) per 19 ore a 30 °C. La reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 4,6% di acido tricloro acetico (TCA) e la miscela è stata centrifugata (10.000 rpm, 10 min). I surnatanti sono stati trasferiti in una piastra a 96 pozzetti in triplicato contenente 100µl di NaOH 0,5 N, e la densità ottica (OD) è stata letta a 450 nm usando un lettore di piastre. Per il controllo positivo

i campioni di muco sono stati sostituiti da tripsina (5mg ml⁻¹, Sigma), (100% di attività delle proteasi), o da tampone per il controllo negativo (0% di attività).

- **Antiproteasi**

L'attività antiproteasi totale è stata determinata dalla capacità del muco di inibire l'attività della tripsina (Hanif et al.2004). L'attività antiproteasica nel muco era molto bassa e per questo test abbiamo utilizzato campioni adeguati a 2 mg ml⁻¹ di proteine (Guardiola et al. 2014). Brevemente, 10 µl di campioni di muco cutanei sono stati incubati (10 min, 22 °C) con lo stesso volume di soluzione di tripsina standard (5 mg ml⁻¹). Dopo l'aggiunta di 100 µl di tampone di bicarbonato di ammonio 100 mM e 125 µl di azocaseina 0,7%, i campioni sono stati incubati (2 ore, 30 °C) e, dopo l'aggiunta di 250 µl di TCA 4,6%, una nuova incubazione (30 min, 30 °C) è stata fatta. La miscela è stata quindi centrifugata (10.000 rpm, 10 min) e i surnatanti sono stati trasferiti in una piastra a 96 pozzetti in triplicato contenente 100 microlitri di NaOH 0,5 N, e l'OD letta a 450 nm usando un lettore di piastre. L'attività antiproteasi è stata espressa in termini di percentuale di inibizione tripsina.

- **Attività battericida**

Tre batteri marini patogeni (*Vibrio harveyi*, *V. angillarum* e *Photobacterium damsela subsp. piscicida*) e due batteri non patogeni (*Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*) sono stati utilizzati nei test batterici. I batteri sono stati coltivati in piastre di agar a 25 °C in un terreno appropriato: soia tritico (TSB, Sigma) per *V. harveyi*, *V. angillarum* e *P. damsela*, Luria (LB, Sigma) per *E. coli* e brodo di coltura (NB) (Conda) per *B. subtilis*; singole colonie di 1-2 mm sono stati diluite in 5 ml di terreno di coltura appropriato liquido e coltivate per 16 ore a 25 °C in un incubatore a 200-250 rpm. L'attività battericida del muco è stata determinata valutando i loro effetti sulle curve di crescita batterica utilizzando il metodo di Sunyer e Tort (1995) con alcune modifiche. Aliquote di 100 µl di ciascuna delle diluizioni batteriche (1/10) sono stati posti in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto e coltivate con volumi uguali di campioni di muco. L'OD dei campioni è stata misurata a 620 nm a intervalli di 30 min durante le 24 ore a 25 °C. I campioni senza batteri sono stati usati come controllo negativo. I campioni senza muco sono stati utilizzati come controlli positivi (crescita del 100% o 0% attività battericida).

- **Immunoblotting**

SDS-poliacrilammide gel (SDS-PAGE) è stata eseguita preparando un gel al 7,5% con il metodo di Laemmli (1970). I campioni sono stati diluiti 1/2 con acqua Milli-Q e condizioni ridotte sono state ottenute trattando il campione con 5% mercaptoetanolo. Dopo l'elettroforesi, il gel è stato colorato con Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma) e con nitrato di argento (Plus Silver Stain

Kit, Sigma). Per valutare i pesi molecolari delle bande è stato utilizzato uno standard a basso peso molecolare (6,5-200.0 kDa, Sigma). Gel SDS-PAGE sono stati immersi in tampone di trasferimento (Tris 20 mM, glicina 192 mM, 10% metanolo, pH 8.8) per 10 minuti e le proteine sono state trasferite per 60 min a 0,8 mA in un foglio di nitrocellulosa in un bagno blotting semi-secco (Biorad, USA). Il filtro è stato immerso in tampone bloccante PBS-T (PBS: KH_2PO_4 6 mM, Na_2HPO_4 0,11 mM, NaCl 30 mM, 1% di Tween 20, pH 7,4) contenente 3% BSA per 1 h. Dopo lavaggio con PBS-T, il foglio di nitrocellulosa è stato incubato con anticorpi anti-DIFBL-antisiero (1: 400 in PBS-T con 0,1% BSA) per 1 ora, poi lavata 3 volte con PBS-T e incubata per 1 h con un anticorpo secondario IgG di pecora anti-topo coniugato con fosfatasi alcalina (Sigma; 1: 10.000 in PBS-T con 0,1% BSA). Dopo il lavaggio per 3 volte con PBS-T, il filtro è stato trattato con 3 ml di 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato / nitro blu tetrazolio (BCIP / NBT) liquido. Fogli di nitrocellulosa sono stati analizzati per l'elaborazione delle immagini.

- **Cromatografia HPLC in fase inversa**

Campioni di muco sono stati analizzati mediante HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione) in fase inversa su una colonna di silice C18 Interchrom UP5ODB-25QS 250x4,6 mm (una catena idrofoba di 18 atomi di carbonio è adatto per la separazione di piccole proteine o peptidi). Duecento microlitri di ciascun campione diluito 1/4 con acqua Milli-Q sono stati caricati per l'analisi con un iniettore manuale e la lettura è stata eseguita a 280 nm (mAU). L'eluizione è stata ottenuta con una miscela di 0,05% di acido trifluoroacetico in Milli-Q oltre 35 minuti ad una portata di 1 ml al minuto.

2.4. Effetti della somministrazione nella dieta di vitamina D₃ sul sistema immunitario di *Dicentrarchus labrax*

- **Animali**

Quarantotto esemplari di *Dicentrarchus labrax* (100 ± 4 g di peso e 19 ± 2 cm di lunghezza) ottenuti da Ittica Trappeto srl (Palermo, Italia), sono stati mantenuti presso lo stabulario dell'Università di Palermo. L'acqua è stata mantenuta a 20 ± 2 °C con una portata di 1.000 L h^{-1} e 28 ‰ di salinità. Il fotoperiodo è stato di 12 ore di luce e 12 ore di buio, i pesci sono stati alimentati quotidianamente con una dieta a pellet commerciale (Veronesi, Italia) ad un tasso del 2% del peso corporeo. I pesci sono stati fatti acclimatare per 15 giorni prima dell'inizio della prova sperimentale. Gli esperimenti sono stati eseguiti nel pieno rispetto delle norme nazionali (D.Lgs 116/92 e successive modifiche) e delle linee guida della Commissione europea per la sistemazione e la tutela degli animali utilizzati a fini sperimentali (2007/526/CE).

- **Disegno sperimentale**

I pesci sono stati suddivisi in maniera casuale in quattro vasche contenenti ognuna 12 animali (Fig 24). Le diete sperimentali sono state preparate quotidianamente in laboratorio utilizzando un pellet commerciale (Veronesi, Italia) (proteine 44%, lipidi 24%, carboidrati 14,8; cenere 6,2%, cellulosa 2%). La vitamina D₃ (vD₃) è stata aggiunta sottoforma di colecalciferolo (Sigma), a concentrazioni di 0 (controllo), 3750, 18.750 e 37.500 U kg⁻¹. La vitamina D₃ è stata disciolta in etanolo nelle dosi appropriate e poi emulsionata con olio di fegato di merluzzo, che è stato poi spruzzato sul pellet prima di alimentare gli animali. La dieta non-integrato (controllo) è stato spruzzato solo con olio di fegato di merluzzo. I pesci sono stati alimentati quotidianamente ad un tasso del 2% del peso corporeo. Nessuna mortalità è stata osservata durante l'esperimento.

Dopo 2 e 4 settimane di trattamento, sei individui di ogni gruppo sono stati campionati. Prima del campionamento gli animali sono stati anestetizzati con 0.05% w/v di MS222 (acido etil-estere aminobenzoico) (Sigma) disciolto in acqua di mare. I campioni di sangue sono stati raccolti dalla vena caudale, lasciati coagulare a 4 °C e centrifugati. Il siero è stato rimosso e congelato a -80 °C fino alle analisi. Le cellule della cavità peritoneale (PCC) sono state ottenute come segue: successivamente alla disinfezione della superficie ventrale del corpo con il 70% di alcool etilico, nella cavità peritoneale sono stati iniettati 15 ml di soluzione fisiologica (Leibovitz L-15, terreno contenente siero bovino fetale 2%, 100 unità di penicillina ml⁻¹, 100 unità streptomicina ml⁻¹ e 10 unità di eparina ml⁻¹). Dopo aver massaggiato la superficie ventrale per 10 minuti, l'essudato peritoneale è stato prelevato, e le cellule sono state isolate mediante centrifugazione a 400g per

10 minuti a 4 °C. Le cellule morte sono state determinate mediante microscopia ottica dopo aggiunta di 0,01% trypan blu al mezzo.



N=12

Controllo

N=12

Vitamina D₃=3750 Units Kg⁻¹

N=12

Vitamina D₃=18750 Units Kg⁻¹

N=12

Vitamina D₃=37500 Units Kg⁻¹

Fig.24: disegno sperimentale

Parametri ematologici

- **Livelli di cortisolo nel siero**

I livelli di cortisolo nel siero sono stati determinati utilizzando il kit Intermedical Diagnostics.

- **Livelli di glucosio nel siero**

I livelli plasmatici di glucosio sono stati determinati utilizzando il kit Accutrend più (Roche) secondo le istruzioni del produttore.

- **Proteasi**

L'attività della proteasi è stata quantificata usando il saggio di idrolisi con azocaseina secondo il metodo di Ross et al. (2000). Brevemente, 100 microlitri di campione di siero (diluiti 1/10 in 100 mM di bicarbonato di ammonio) sono stati incubati con 125 µl di bicarbonato di ammonio 100 mM contenente 2% azocaseina (Sigma) per 24 ore a 30 °C. La reazione è stata bloccata con l'aggiunta del 10% di acido tricloroacetico (TCA), una nuova incubazione (30 min, 30 °C) è stata effettuata. La miscela è stata quindi centrifugata (10.000 rpm, 10 min) e il surnatante è stato trasferito in una piastra a 96 pozzetti in triplicato contenente 100 microlitri di NaOH 1N, e la densità ottica è stata letta a 450 nm usando un lettore di piastre. Per il controllo positivo il siero è stato sostituito da tripsina (5 mg ml⁻¹, Sigma) (100% di attività della proteasi), o da tampone, per il controllo negativo (0% di attività della proteasi).

- **Antiproteasi**

L'attività antiproteasica totale è stata determinata sfruttando la capacità del siero di inibire l'attività della tripsina (Hanif et al. 2004). Brevemente, 10 µl di campioni di siero sono stati incubati (10 min, 22 °C) con lo stesso volume di soluzione di tripsina standard (5 mg ml⁻¹). Dopo l'aggiunta di 100 µl di bicarbonato di ammonio (100 mM) e 125 µl di tampone contenente 2% azocaseina (Sigma), i campioni sono stati incubati (2 ore, 30 °C) e, dopo l'aggiunta di 250 µl di TCA (10%), una nuova incubazione (30 min, 30 °C) è stata fatta. La miscela di reazione è stata quindi centrifugata (10.000 rpm, 10 min) e i surnatanti sono stati trasferiti in una piastra a 96 pozzetti in triplicato contenente 100 microlitri di NaOH 1N, e la densità ottica è stata letta a 450 nm usando un lettore di piastre. Per il controllo positivo, il siero e la tripsina sono stati sostituiti da tampone e per il controllo negativo, il tampone è stato sostituito dal siero. L'attività antiproteasi è stata espressa in termini di percentuale d'inibizione della tripsina secondo la formula: % tripsina inibizione = (Trypsina OD – campione OD) / Trypsina OD - 1 x 100.

Parametri immunitari

- **Attività emolitica del complemento**

L'attività emolitica del complemento è stata analizzata utilizzando come cellule bersaglio gli eritrociti di pecora (SRBC, Biomedics) (Ortuno et al. 1998). Volumi uguali di sospensione eritrocitaria (6%) in soluzione di Hank (HBSS) contenente Mg^{2+} ed EGTA (tetraacetico glicole etilenico) sono stati mescolati con campioni di siero serialmente diluiti per dare concentrazioni sieriche finali che vanno dal 10% al 0,078%. Dopo incubazione per 90 min a 22 °C, i campioni sono stati centrifugati a 400 g per 5 minuti a 4°C per eliminare gli eritrociti lisati. Il contenuto di emoglobina relativa dei surnatanti è stata valutata misurando la densità ottica a 550 nm in un lettore di piastre. I valori di massimo (100%) e minimo (spontaneo) di emolisi sono stati ottenuti aggiungendo 100 μ l di acqua distillata o di HBSS a 100 μ l siero e di SRBC, rispettivamente. Il grado di emolisi (Y) è stato stimato e la curva di lisi per ogni campione è stata ottenuta tracciando $Y(1-Y)^{-1}$ contro il volume di siero aggiunto (μ l) su un grafico in scala logaritmica. Il volume di siero che produce il 50% emolisi (ACH_{50}) è stato determinato ed è stato ottenuto il numero di unità di $ACH_{50} ml^{-1}$ per ogni pesce sperimentale.

- **Attività perossidasi del siero**

L'attività della perossidasi nel siero è stata misurata secondo Quade e Roth (1997). In breve, 15 μ l di siero sono stati diluiti con 135 μ l di HBSS senza calcio né magnesio in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto. In ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 μ l di 3,3',5,5'-cloridrato tetrametilbenzidina 20 mM (TMB, Sigma) e H_2O_2 (5 mM). La reazione colorimetrica è stata interrotta dopo 2 minuti con l'aggiunta di 50 μ l di di acido solforico (2 M) e la densità ottica è stata letta a 450 nm in un lettore di piastre. Campioni standard senza siero sono stati utilizzati come bianco.

- **Livelli di IgM nel siero**

I livelli totali di IgM presenti nel siero sono stati analizzati utilizzando il test immunoenzimatico (ELISA) (Cuesta et al. 2004). Così, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 20 μ l di siero diluito 1/100 e 200 μ l di tampone di carbonato-bicarbonato ($NaHCO_3$ 35 mM e Na_2CO_3 15 mM, pH 9.6) e la piastra è stata incubata overnight a 4 °C. Dopo tre lavaggi con PBT (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,05%, pH 7,3), le piastre sono state bloccate per 2 ore a temperatura ambiente con il tampone di bloccaggio contenente il 3% di albumina sierica bovina (BSA, Sigma) in PBT, seguita da tre risciacqui con PBT. Le piastre sono state incubate per 1 ora con 100 μ l per pozzetto di anticorpo monoclonale di topo anti-spigola (Aquatic Diagnostics Ltd.) (1/100 in tampone bloccante), lavate e incubate con l'anticorpo secondario anti-topo IgG-HRP (1/1000 in tampone di bloccaggio, Sigma). Dopo il risciacquo completo con PBT le piastre sono

state sviluppate utilizzando 100 µl di una soluzione di TMB (0,42 mM), in un tampone acetato (100 mM) acido citrico / sodio, pH 5,4, contenente lo 0,01% H₂O₂. Dopo 10 minuti di incubazione, la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 50 µl di H₂SO₄ 2M e le piastre sono state lette a 450 nm. Controlli negativi consistevano in campioni senza siero o senza anticorpo primario, i cui valori di OD sono stati sottratti per ogni valore del campione.

- **Attività fagocitica**

L'attività fagocitica è stata analizzata utilizzando il metodo di Cammarata et al. (1994), utilizzando *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma) come target. Brevemente, i lieviti sono stati preparati in acqua distillata alla concentrazione di 0,25% (w/v), autoclavati per 20 minuti, lavati 2 volte a 2000g a 4 °C per 5 min e incubata per 1 ore a 20 °C con eosina Y (4-Bromo-fluoresceina) ad una concentrazione finale di 0,05%. I lieviti sono stati lavati quattro volte in acqua distillata e risospese ad una concentrazione finale di 0,0125% w/v in tampone fosfato salino (PBS: NaCl 103,6 mM, KH₂PO₄ 1,46 mM, Na₂HPO₄ 0,8 mM, KCl 2,6 mM, CaCl₂ 0,9 mM e MgCl 20,49 mM, pH 7,4) e conservato a -20°C per un massimo di 2 settimane. È stata aggiunta la sospensione di lievito (v/v) per 100 ml di sospensione di leucociti (2,5 x 10⁶) e posto in un'epENDORF. La miscela è stata incubata per 30 min a 20 °C con delicata agitazione. Per indicare l'attivazione della fagocitosi, 50 µl di una soluzione quenching (QS) (2 mg ml⁻¹ trypan blu e 2 mg ml⁻¹ cristallo viola a 0,02 M tampone citrato, pH 4,4 contenente 33 mg ml⁻¹ di NaCl) (Hed, 1986) è stata aggiunta alla miscela di reazione. I vetrini sono stati osservati al microscopio contrasto interferenziale di Normarski con fluorescenza (450-490 nm filtro) (Diaplan, Leika, Wetzlar, D).

- **Microscopia ottica**

Per lo studio al microscopio ottico, campioni di intestino sono stati fissati in una soluzione di Bouin e dopo fasi di disidratazione seriali in alcol, i campioni sono stati inclusi in paraffina (ThermoScientific). Le sezioni sono state tagliate a 5 micron (Microm), montati e colorati con ematossilina-eosina (HE). I vetrini sono stati analizzati da un microscopio ottico (Leica 6000B) e le immagini sono state acquisite con una fotocamera digitale Leica DFC280.

- **Real-time PCR**

L'RNA totale è stato estratto da 0,5 g di pronefro (HK) e intestino di orata utilizzando TRIzol Reagent (Chomczynski, 1993). È stato poi quantificato e la purezza è stata valutata mediante spettrofotometria. L'RNA è stato poi trattato con DNasi I (Promega) per eliminare la contaminazione di DNA genomico. Il DNA complementare (cDNA) è stato sintetizzato da 1 µg di RNA totale utilizzando la trascrittasi inversa SuperScript III (Invitrogen, Spagna) con un primer oligo-DT18. L'espressione dei geni selezionati è stata analizzata mediante real-time PCR,

che è stata eseguita con un PRISM strumento ABI 7500 (AppliedBiosystems) utilizzando SYBR Green PCR core Reattivi (AppliedBiosystems). Le miscele di reazione [contenente 10 µl di 2 x SYBR Green Supermix, 5 µl di primer (0,6 µM ciascuno) e 5 µl di cDNA] sono state incubate per 10 min a 95 °C, seguita da 40 cicli di 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, e, infine, 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C e 15 s a 95°C. Per ogni mRNA, l'espressione genica è stato corretta utilizzando come gene di riferimento il fattore di allungamento 1 α (EF1 α) di RNA contenuto in ogni campione.

2.5 Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm errore standard, (SE). I dati sono stati analizzati statisticamente mediante l'analisi della varianza (ANOVA) per determinare le differenze tra i gruppi. La normalità dei dati è stata precedentemente valutata utilizzando il test di Shapiro-Wilk e l'omogeneità della varianza è stata anche verificata con il test di Levene. I dati non normalmente distribuiti sono stati log-trasformati prima dell'analisi e un test di Kruskal-Wallis non parametrico, seguito da un test di confronto multiplo, è stato utilizzato quando i dati non soddisfano le ipotesi parametriche. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando SPSS 19.0 e le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p \leq 0,05$.

Risultati

3. Risultati

3.1. Instaurarsi di una gerarchia di dominanza in *Sparus aurata*.

Definizione dei rapporti di dominanza e di sottomissione

Il primo obiettivo del mio dottorato è stato quello di valutare gli effetti dell'instaurarsi di una gerarchia sociale in individui di *Sparus aurata*, utilizzando diversi modelli sperimentali nei quali gli individui sono stati distinti in dominante e subordinato. Questa distinzione è stata fatta secondo due parametri fondamentali:

- ✓ L'ordine di alimentazione, cioè lo schema di successione seguito da ciascun gruppo di pesci nel cibarsi.
- ✓ L'aggressività (A+) di ogni individuo, calcolata come il numero di attacchi effettuati nell'unità di tempo da ogni individuo con lo scopo di offendere (mordere, rincorrere, urtare) l'altro pesce.

La posizione gerarchica è stata stabilita dopo circa un'ora dall'esposizione allo stress sociale ed è rimasta invariata per tutta la durata delle osservazioni. Per caratterizzare lo stress da un punto di vista fisiologico, sono stati misurati i livelli di cortisolo nel plasma, di glucosio, così come l'osmolarità; inoltre è stata anche valutata l'attività di fagocitosi delle cellule dell'essudato peritoneale per verificare se lo stress sociale ha degli effetti sulla risposta immunitaria innata.

Modello “random”: instaurarsi di una gerarchia sociale in gruppi di tre individui di *Sparus aurata*.

Il modello “random” (Fig. 25) ha riguardato l'osservazione di un gruppo di tre esemplari di *Sparus aurata* in cui gli individui sono stati messi contemporaneamente nella vasca. La territorialità si è instaurata dopo circa un'ora e l'instaurarsi di una gerarchia sociale all'interno di ogni tripletta esaminata è rimasta invariata per tutto il periodo di osservazione. Dopo ventiquattro ore di osservazione sono stati fatti i prelievi di sangue. Dalle osservazioni etologiche è stato possibile suddividere gli animali in dominanti, subordinato (β) e subordinati (γ). Come mostrato in tabella 2, la percentuale di aggressività media (A+) e l'ordine di alimentazione (FO) mi ha permesso di distinguere ($p < 0,001$) gli animali in dominate, subordinato β e subordinato γ (Dom>Sub (β)= A+: 98 \pm 2 %, FO: 100 \pm 0 %; Dom>Sub(γ)= A+: 85,7 \pm 4 %, FO=100 \pm 0 %; Sub(β)>Sub(γ)= A+: 81,0 \pm 4 %; FO=98,0 \pm 1 %). Questa distinzione è rimasta invariata per tutta la durata dell'esperimento in tutti i gruppi.



Fig. 25: modello random: i tre pesci sono stati inseriti contemporaneamente nella vasca e sono stati osservati per 24 h.

Tabella 2. Dati e percentuali riguardanti i due parametri sopra menzionati che hanno permesso di distinguere tra soggetti dominanti e subordinati.

Modello random: tre pesci inseriti contemporaneamente	Aggressività (A+) Media % \pm SD	Priorità all'alimentazione (FO) Media % \pm SD
Dom > Sub (β)	98,0 \pm 2 %	100 \pm 0 %
Dom > Sub (γ)	85,7 \pm 4 %	100 \pm 0 %
Sub (β) > Sub (γ)	81,0 \pm 4 %	98,0 \pm 1 %

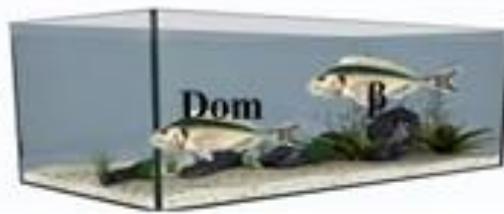
Nel primo modello, definito modello “random”, lo stress sociale causato dalla contemporanea presenza di tre individui nella vasca determina dopo un’ora d’interazione la formazione di una gerarchia sociale che si mantiene inalterata per tutto il periodo di osservazione. I valori di cortisolo nel plasma sono correlati con lo status sociale dell’individuo e i livelli più alti sono stati riscontrati negli individui subordinati. In particolare, dopo l’instaurarsi della gerarchia sociale, differenze significative sono state osservate tra il dominante (54 \pm 8 ng ml⁻¹), il subordinato β (160 \pm 9 ng ml⁻¹) e il subordinato γ (300 \pm 93 ng ml⁻¹) (Fig. 17). Comunque tutti i livelli di cortisolo erano più alti rispetto al controllo (19 \pm 3 ng ml⁻¹). Inoltre, ho osservato un aumento di glucosio nel plasma negli individui subordinati (β = 80 \pm 1 mg ml⁻¹; γ = 129 \pm 1 mg ml⁻¹) rispetto ai dominanti (Dom= 83 \pm 1 mg ml⁻¹) (Tabella 4). I valori di osmolarità del plasma dopo 24 ore erano più alti nei subordinati γ (465 \pm 2 mOsm kg⁻¹) rispetto ai dominanti (419 \pm 1 mOsm kg⁻¹) mentre nei subordinati β i valori di osmolarità del plasma erano di 410 \pm 1 mOsm kg⁻¹ (Tabella 3). L’attività di fagocitosi delle cellule della cavità peritoneale è diminuita nei subordinati (β =12 \pm 1%; γ =13 \pm 2%) rispetto agli individui dominanti (Dom=33 \pm 2) come mostrato in Figura 18.

Modello “sequential”: contributo della territorialità e del tempo di esplorazione nella determinazione di una gerarchia sociale.

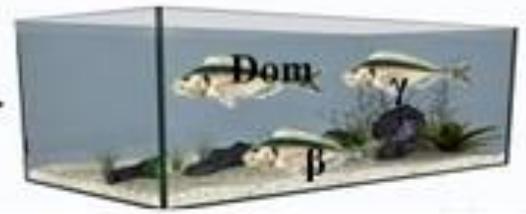
Il modello “sequential” (Fig. 19) ha riguardato l’osservazione di triplete di esemplari in cui gli individui sono stati messi nella vasca in modo sequenziale con una distanza temporale di due giorni l’uno dall’altro. Come mostrato in Tabella 3, la percentuale di aggressività (A+) e l’accesso preferenziale al cibo hanno permesso di distinguere ($p < 0,001$) gli animali in dominanti, subordinati β e subordinati γ in ogni gruppo (A+: Dom > Sub (β) = $95,7 \pm 5$ %, FO: 100 ± 0 %; Dom > Sub (γ) = 85 ± 5 %, FO = 100 ± 0 %; Sub (β) > Sub (γ) = 90 ± 5 %; FO = 95 ± 3 %).



Giorni: 1-2



Giorni: 3-4



Giorni: 5-6

Fig. 19: modello sequential: i pesci sono stati inseriti nella vasca a distanza di un giorno l'uno dall'altro.

Tabella 3: dati e percentuali relative ai due parametri sopra menzionati che hanno permesso di distinguere tra soggetti dominanti e subordinati.

Modello sequential: tre pesci inseriti sequenzialmente	Aggressività (A+) Media % \pm SD	Priorità all'alimentazione (FO) Media % \pm SD
Dom> Sub (β)	95,7 \pm 5 %	100 \pm 0 %
Dom> Sub (γ)	85 \pm 5 %	100 \pm 0 %

Il modello “sequential” ha evidenziato che la condizione di benessere dipende dal tempo di esplorazione che determina l’acquisizione della territorialità. Un tempo di esplorazione maggiore da parte di un individuo corrisponde a un maggiore senso di territorialità che favorisce la formazione di una gerarchia di dominanza. I valori di cortisolo nel plasma sono correlati con lo status sociale ovvero più alti negli individui subordinati (β : 200 \pm 1 ng ml⁻¹; γ : 400 \pm 1 ng ml⁻¹) rispetto ai dominanti (Dom : 100 \pm 1 ng ml⁻¹) (Fig. 26). L’attività di fagocitosi delle cellule della cavità peritoneale aumenta negli individui subordinati (β : 7 % \pm 4; γ : 9 % \pm 5) rispetto agli individui dominanti (Dom: 5 % \pm 2) a seguito dello stress sociale come mostrato in Fig. 27. I valori di osmolarità erano più bassi nei dominanti e nei subordinati rispetto al controllo mentre i livelli di glucosio erano più alti nei dominanti rispetto ai subordinati (tab. 3). Questi risultati sono in accordo con Cammarata et al. (2012) che ha mostrato la stessa risposta di modulazione delle cellule della cavità peritoneale negli individui subordinati nel modello sperimentale a coppia dopo quindici giorni di stress sociale.

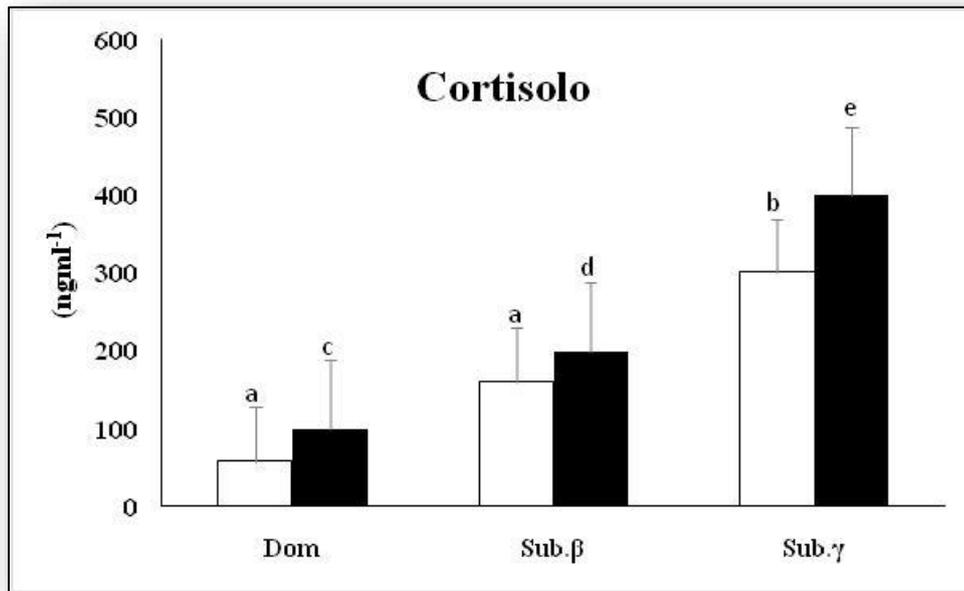


Fig. 26: i grafici illustrano i livelli di cortisolo e in individui dominanti, subordinati (β) e subordinati (γ) dopo esposizione allo stress sociale nel modello "random" (istogramma bianco) e in quello "sequential" (istogramma nero). Le lettere differenti indicano differenze significative tra gruppi ($p \leq 0,05$).

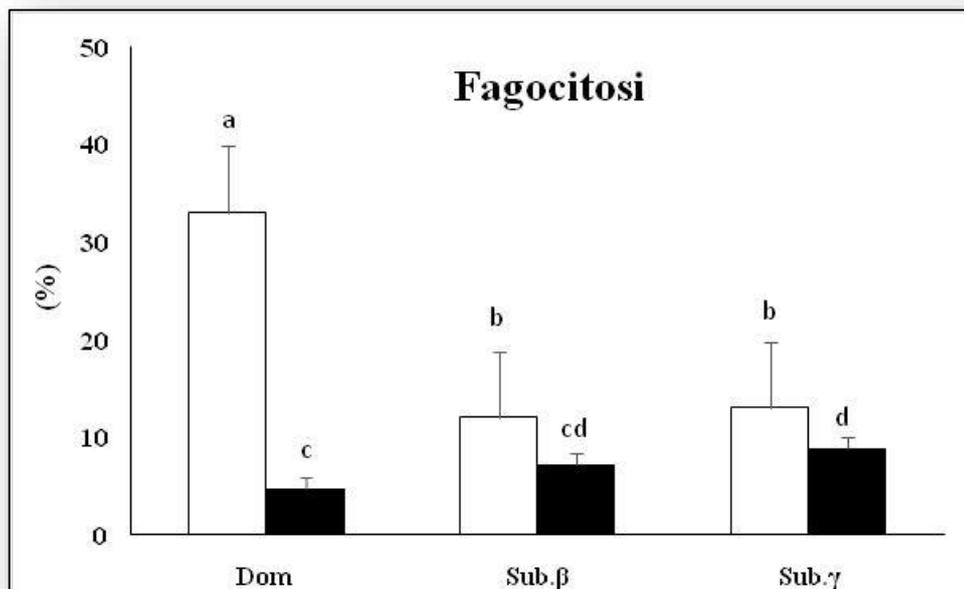


Fig. 27: i grafici illustrano le percentuali di fagocitosi delle cellule della cavità peritoneale in individui dominanti, subordinati (β) e subordinati (γ) dopo esposizione allo stress sociale nel modello "random" (istogramma bianco) e in quello "sequential" (istogramma nero). Le lettere differenti indicano differenze significative tra gruppi ($p \leq 0,05$).

Tabella 4: valori di osmolarità e di glucosio(\pm SD) prima e dopo l'instaurarsi della gerarchia sociale nel modello random e nel modello sequential.

	Modello random				Modello sequential		
	Controllo	D	S(β)	S(γ)	D	S(β)	S(γ)
Osmolarità (mOsm)	384 \pm 3	419 \pm 1*	410 \pm 1	465 \pm 1*	307 \pm 2*	286 \pm 5*	287 \pm 2*
Glucosio (mg dl ⁻¹)	50 \pm 4	83 \pm 1*	80 \pm 1*	129 \pm 1*	77 \pm 44*	40 \pm 4	58 \pm 16*

D=Dominante; S=subordinato

*=p<0.01

Analisi discriminante dei parametri plasmatici e immunitari.

Come mostrato in Figura 28, è possibile osservare una netta separazione tra i due modelli e rispetto al controllo. Inoltre si evince che gli individui del modello “random” mostrano maggiori alterazioni dei parametri plasmatici e immunologici rispetto agli individui del modello “sequential”. Gli assi canonici 1 e 2 dell'analisi discriminante spiegano circa il 98% della variabilità tra i gruppi. Lungo asse, i valori di osmolarità e fagocitosi sono determinanti per differenziare l'effetto dei due modelli sperimentali. Lungo l'asse Y, cortisolo e fagocitosi contribuiscono principalmente a discriminare tra subordinati e pesci dominanti gruppi.

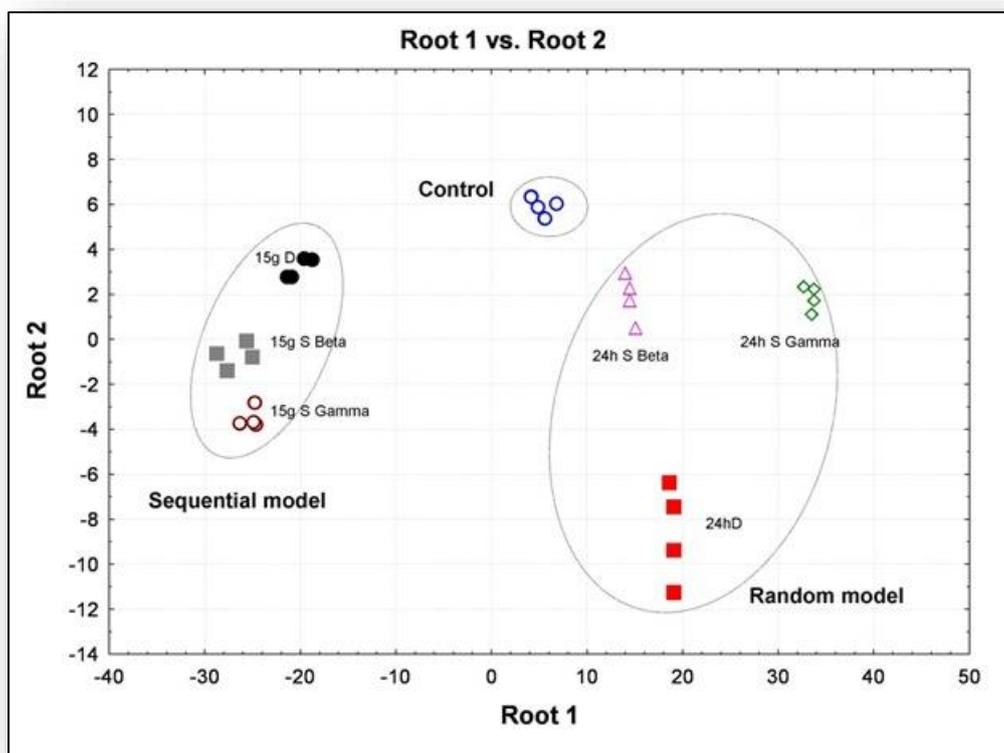


Fig. 28: Scatter plot dell'analisi discriminante canonica dei parametri ematologici e dell'attività immunologica. Effetto dello status sociale in *Sparus aurata* in tempi diversi (giorni) dopo l'inserimento nella vasca. I valori di osmolarità e di fagocitosi sono stati discriminanti lungo l'asse X (Root 1) tra i gruppi di pesci subordinati e dominanti durante tutto il periodo dell'esperimento. Nell'asse Y (Root 2), cortisolo e fagocitosi contribuiscono alla discriminazione.

Terzo modello sperimentale: confusione indotta dalla percezione del territorio con barriera trasparente.

Nel terzo modello (Fig. 29), definito dell'inganno, ho separato la vasca in due corridoi orizzontali e ho inserito i due pesci; dopo una settimana ho tolto il separatore e ho osservato il loro comportamento. Entrambi i pesci si aggredivano, cambiavano colore e drizzavano la pinna dorsale, questo testimonia che entrambi si sono impossessati del loro spazio dove sono stati confinati e cercano di difenderlo dall'intrusione del conspecifico. I dati ormonali confermano questa ipotesi.

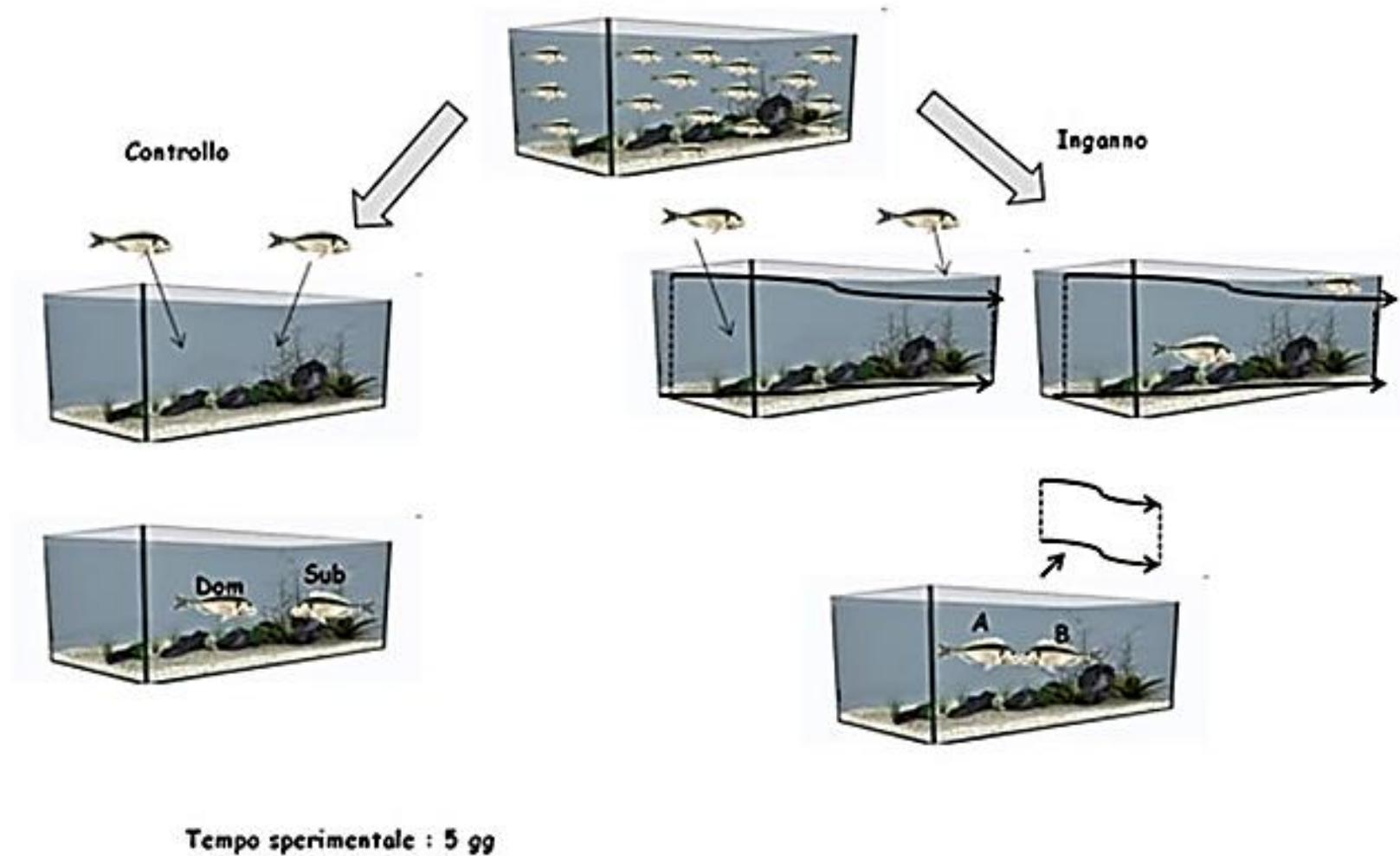


Fig. 29: Modello dell'inganno: i due pesci sono stati inseriti contemporaneamente nei due reparti. Tempo di osservazione cinque giorni.

Dall'analisi delle osservazioni etologiche considerando i due parametri fondamentali ovvero l'aggressività e la priorità all'alimentazione si evince che entrambi i pesci si aggredivano e si alimentavano senza mostrare differenze di comportamento cioè entrambi i pesci cercano di difendere il proprio territorio dall'intrusione dell'altro ed entrambi vogliono affermare la propria dominanza sull'altro a differenza degli animali che sono stati inseriti contemporaneamente nella vasca. Infatti, questi hanno mostrato sin da subito una netta gerarchia di dominanza (tab. 4). I dati ormonali (cortisolo) e quelli cellulari (fagocitosi) sono in linea con le osservazioni comportamentali (Fig. 30).

Tabella 4: Dati e percentuali relative ai due parametri sopra menzionati che mi hanno permesso di dimostrare che tra i due individui non vi sono differenze comportamentali.

Terzo modello: inganno	Aggressività (A+) Media % \pm SD	Priorità all'alimentazione (FO)Media % \pm SD
Pesce A >Pesce B	50 \pm 5 %	50 \pm 0 %
Pesce B >Pesce A	50 \pm 5 %	50 \pm 0 %
Dom>Sub	94 \pm 3%	100 \pm 0%

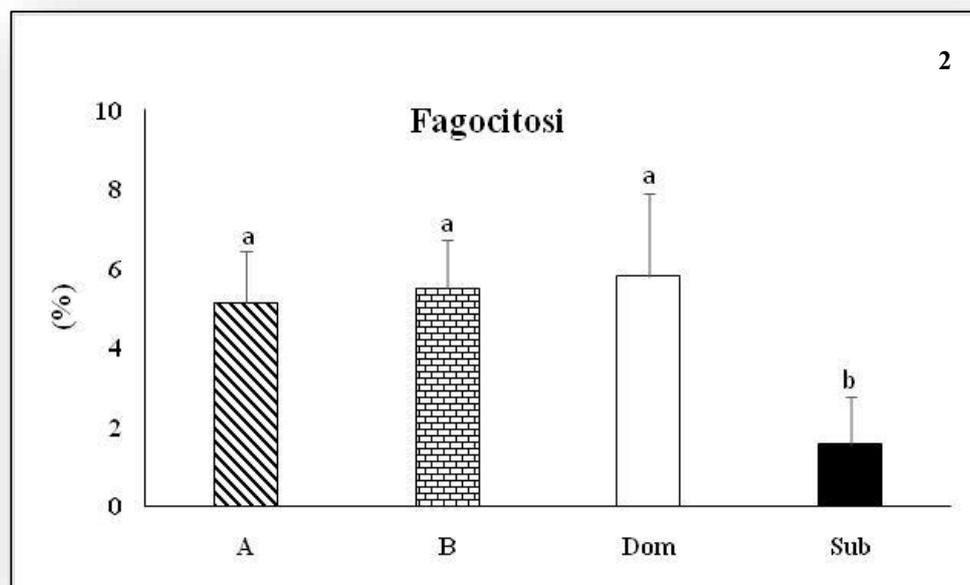
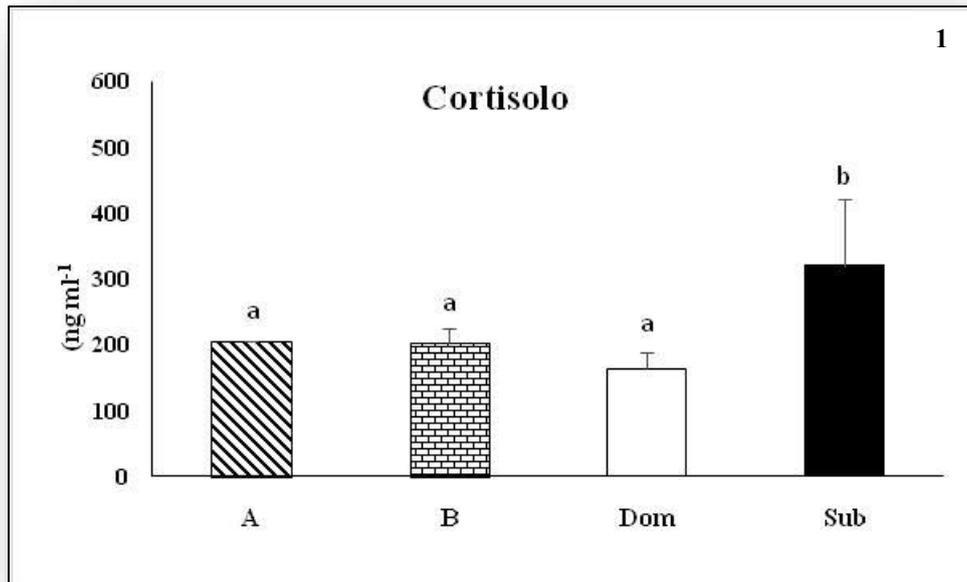


Fig. 30: i grafici illustrano i parametri plasmatici (1) e cellulari (2) analizzati negli individui dominanti (istogramma bianco) e nei subordinati (istogramma nero) del modello controllo e negli individui A (istogramma a righe) e B (istogramma muretto) del modello dell'inganno. Le lettere differenti (a-b) indicano differenze significative tra gruppi ($p \leq 0,05$).

3.2 Instaurarsi di una gerarchia sociale in *Dicentrarchus labrax*

Il modello sperimentale (Fig. 20) ha riguardato l'osservazione di un gruppo di tre esemplari di *D. labrax* che, come nel primo modello di *S. aurata*, sono stati introdotti contemporaneamente nella vasca. La gerarchia di dominanza si è instaurata dopo 2 giorni di convivenza. Tale gerarchia non è rimasta invariata per tutto la durata dell'esperimento ma abbiamo assistito ad un cambiamento di dominanza; infatti durante la prima settimana di esperimento il pesce dominante era il campione C mentre dalla seconda settimana sino alla fine dell'esperimento l'individuo dominante è stato A. Durante la prima settimana di esperimento nessun animale si è alimentato, mentre dalla seconda settimana l'ordine di alimentazione riflette lo status sociale degli individui ovvero A>B>C (tab. 5).

Tabella 5: dati e percentuali relative ai due parametri sopra menzionati che hanno permesso di distinguere tra soggetti dominanti e subordinati osservati nella prima settimana e nella seconda settimana di esperimento.

Prima settimana		
Modello random:	Aggressività (A+) Media % ± SD	Priorità all'alimentazione (FO) Media % ± SD
C>B	98 ± 3 %	0 ± 0 %
C>A	85,7 ± 4 %	0 ± 0 %
B>A	80 ± 4%	0 ± 0 %
Seconda settimana		
Modello random:	Aggressività (A+) Media % ± SD	Priorità all'alimentazione (FO)Media % ± SD
A>C	98 ± 3 %	100 ± 0 %
A>B	95,7 ± 4 %	100 ± 0 %
C>B	81 ± 4 %	0 ± 0 %

Le osservazioni comportamentali sono state confermate dalle analisi biochimiche e dai dati della telemetria; infatti i dati EMG indicano (Fig. 31a) che l'attività muscolare più bassa viene mostrata dal campione A (dominante alla fine dell'esperimento), mentre quella più alta dal campione B (γ). I livelli di cortisolo (Fig. 31b) sono in accordo con i dati presenti in letteratura ovvero livelli più alti di cortisolo sono presenti negli individui subordinati; anche il lisozima era

significativamente più basso nel subordinato γ (Fig. 31b), e i parametri ematologici (Tab. 6) sono indicativi di una condizione di stress nel campione B. Glucosio e lattato non hanno mostrato un andamento chiaro (Fig. 31b).

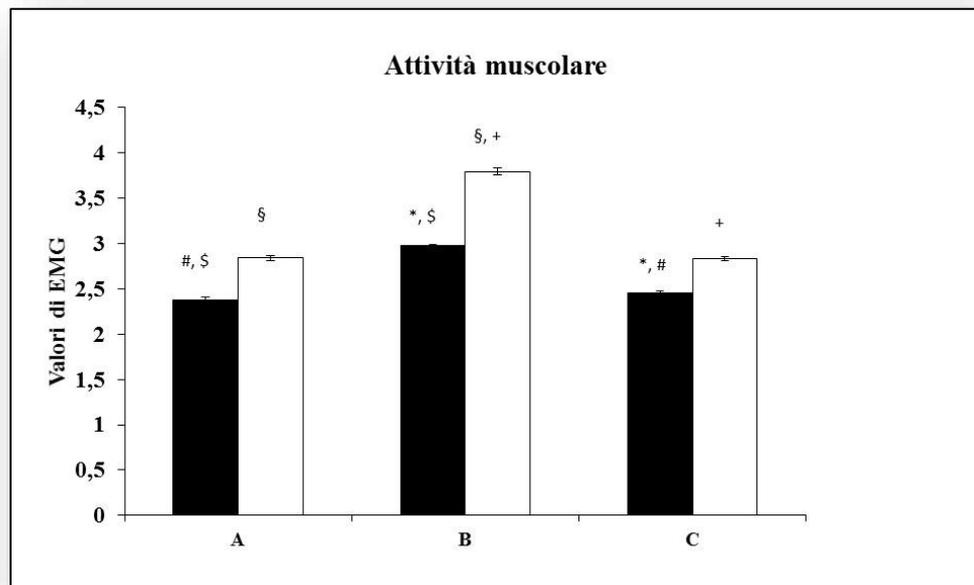


Fig. 31a: valori di attività muscolare, all'inizio (istogramma nero) e alla fine (istogramma bianco) dell'esperimento nei tre individui (A, B e C); segni differenti indicano differenze significative.

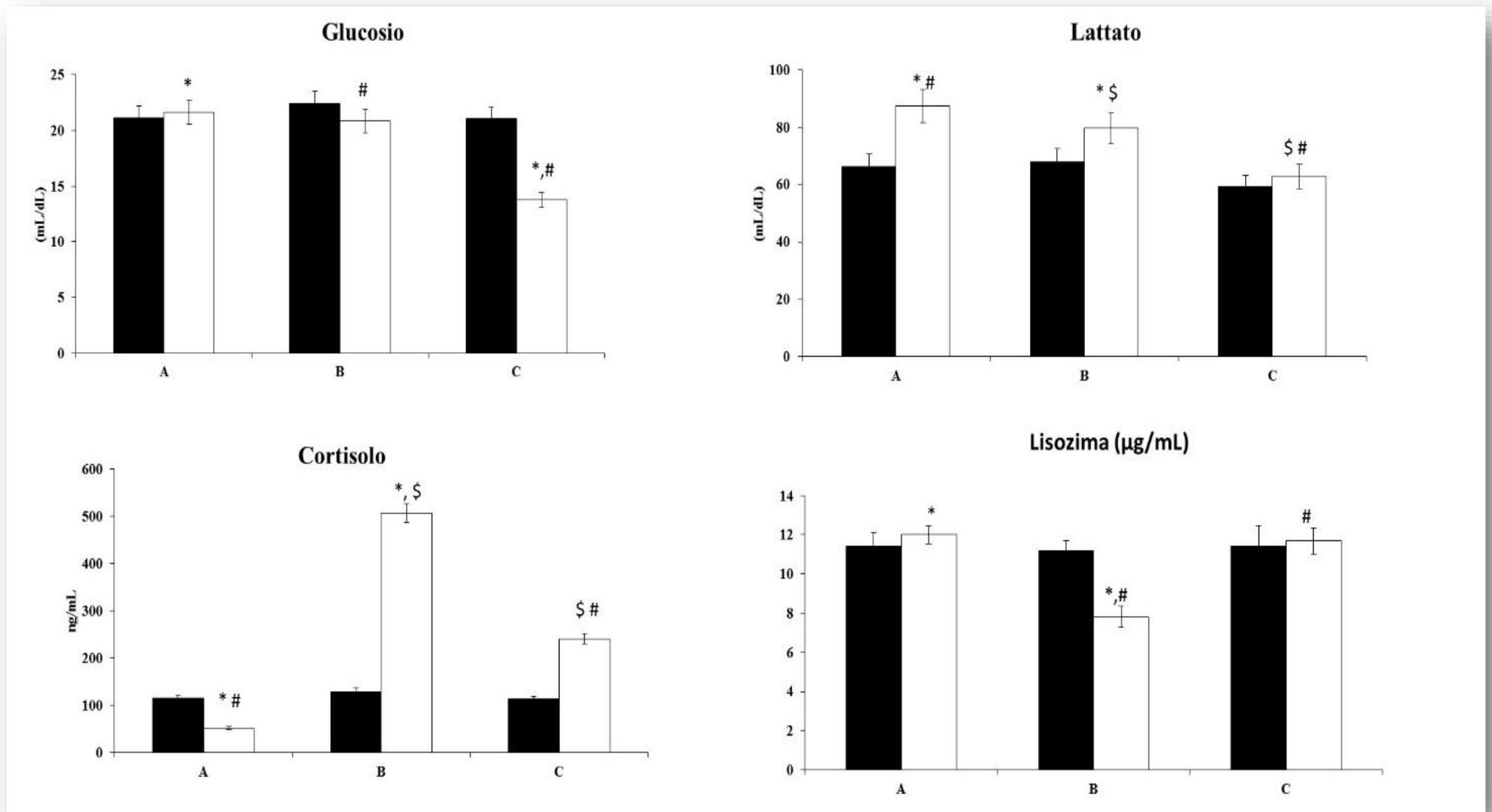


Fig. 31b: valori di glucosio, lattato, cortisolo e lisozima all'inizio (istogramma nero) e alla fine (istogramma bianco) dell'esperimento nei tre individui (A, B e C); segni differenti indicano differenze significative.

Tabella 6: valori ematologici all'inizio e alla fine dell'esperimento nei tre individui; segni differenti indicano differenze significative differenti; (Hct= ematocrito; HB=concentrazione di emoglobina; RBCC= conta eritrocitaria

Prima settimana			
Individui	Hct	HB	RBCC
A	23,87 ± 1,85	8,04 ± 0,18	2,41 ± 0,54
B	22,05 ± 0,52	8,04 ± 0,41	2,78 ± 0,51
C	22,48 ± 0,16	8,76 ± 0,21	2,38 ± 0,38
Seconda settimana			
Individui	Hct	HB	RBCC
A	17,64 ± 1,37 (*\$)	8,33 ± 0,67 (*#)	1,74 ± 0,12 (*)
B	26,57 ± 2,08 (*#)	12,91 ± 1,04 (*)	2,94 ± 0,35 (*#)
C	21,00 ± 1,73 (#\$)	11,06 ± 0,87 (#)	1,85 ± 0,15 (#)

3.3. Effetti dell'esposizione ai metalli pesanti sul muco di *Sparus aurata*

- **Saggio di emoagglutinazione**

Campioni di muco da pesci esposti a diversi metalli pesanti per diversi periodi di trattamento (per 2 e 10 giorni) mostravano valori di agglutinazione a diverse concentrazioni, mentre dopo 30 giorni di esposizione è stata osservata agglutinazione solo nei campioni non diluiti.

- **Glicosilazione delle proteine di muco di pesci esposti ai metalli pesanti**

Tutti i residui monosaccaridici terminali testati erano presenti nei campioni di muco di individui non esposti ed esposti ai metalli pesanti ma differivano nel tipo di zucchero, nel tempo di esposizione e nel tipo di metallo utilizzato (Fig. 32). In generale, il legame alla lectina dei campioni di muco esposti ad arsenico, cadmio e mercurio era WGA > A > WFA > BSL Con I > PNA > LEA > UEA I come testimoniano le letture di OD. Questo tipo di legame suggerisce che i carboidrati terminali presenti nel muco sono acido N-acetilneuraminico, glucosio, N-acetilglucosamina, N-acetilgalattosamina, galattosio e residui di fucosio. Tutti i pesci esposti hanno mostrato un aumento dei livelli di carboidrati dopo 30 giorni di esposizione rispetto ai valori controllo. È stato evidenziato un aumento dei livelli di carboidrati (PNA e WGA) dopo 2 giorni di esposizione dei pesci al cadmio e mercurio, rispettivamente, (Fig. 32 B e C). Inoltre è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa dei livelli di N-acetilglucosamina (WGA) dopo 10 giorni di esposizione con arsenico (Fig. 32 A).

Tabella 7: Lectine usate nel saggio ELISA, i loro acronimi e lo zucchero che legano.

Acronimo	Lectine	Specificità dello zucchero che legano
BSL I	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	α -D-galactose, N-acetyl- α -D-galactosamine
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	β -D-galactose
UEA I	<i>Ulex europeus</i>	α -L-Fucose
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -D-mannose, α -D-glucose
WFA	<i>Wisteria floribunda</i>	N-acetyl-D-galactosamine
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	N-acetyl- β -D-glucosamine, N-acetylneuraminic acid
LEA	<i>Lycopersicon esculentum</i>	N-acetyl- β -D-glucosamine

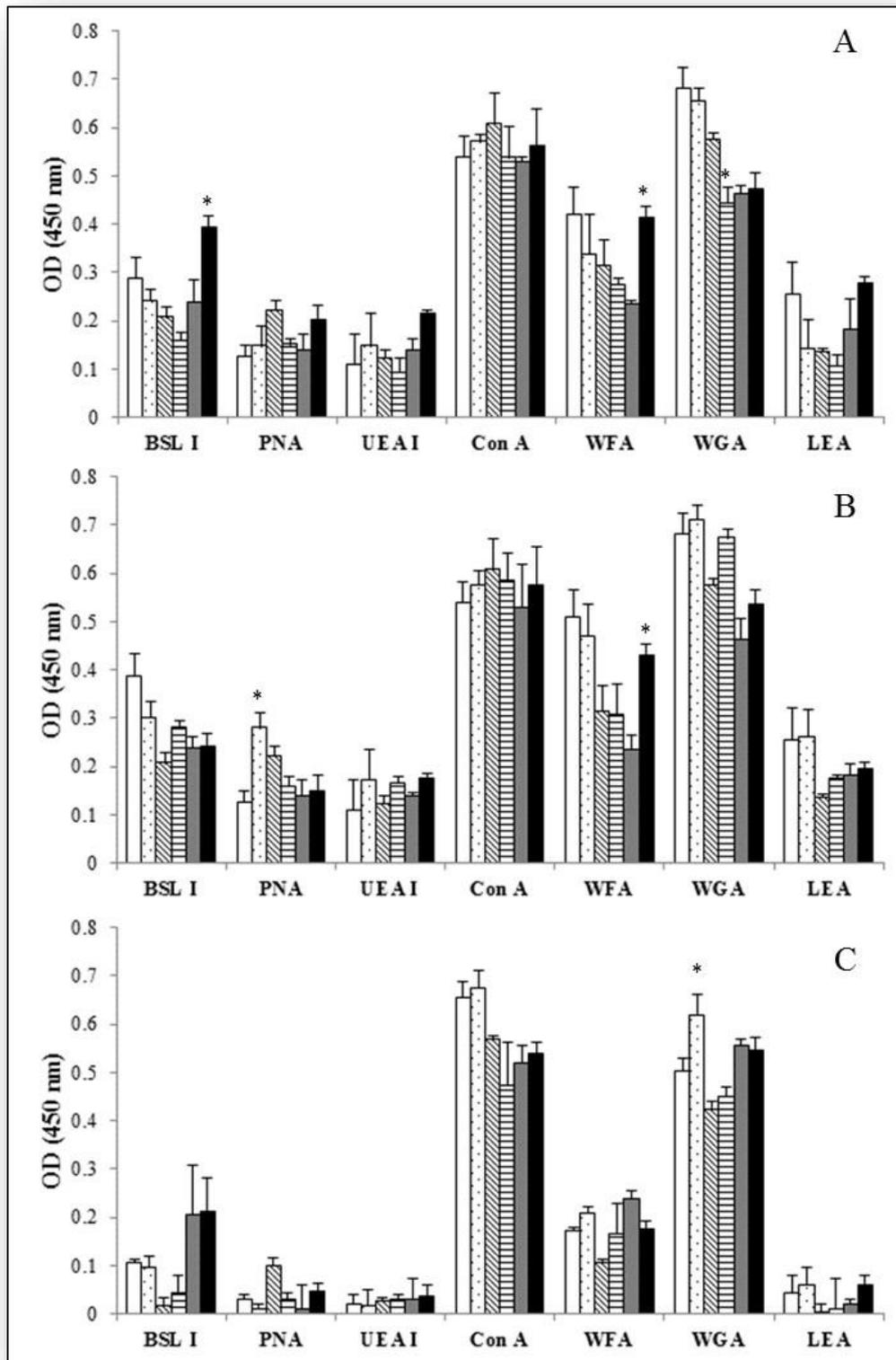


Fig.32: lectine leganti imonosaccaridi presenti nel muco di *D. labrax* (OD 450 nm) non trattate (controllo) e esposte a arsenico (5 μM) (A), cadmio (5 μM) (B) e mercurio (0,04 μM) (C). I dati rappresentano la media ± S.E. (n=6). Gli asterischi denotano differenze significative tra gruppi controlli e esposti (P ≤ 0,05). Vedere tabella 4 per la specificità delle lectine.

- **Livelli di IgM nel muco di pesci esposti ai metalli pesanti**

I livelli di IgM nei campioni di muco diminuiscono nei pesci esposti, per 2 giorni, a qualsiasi metallo pesante, mentre aumentano per il resto dei tempi sperimentali, rispetto ai valori di controllo; inoltre abbiamo osservato un aumento significativo dei livelli di IgM nei campioni di muco esposti per 30 giorni al mercurio (Tab. 8).

Tabella 8. Livelli di IgM (OD 450 nm), attività proteasica (%) e antiproteasica (%) nel muco di *Sparus aurata* non esposti (controlli) e esposti a arsenico (5 μM), cadmio (5 μM) e mercurio (0,04 μM). I dati rappresentano la media \pm S.E. (n=6). Gli asterischi denotano differenze significative tra gruppi controlli e esposti ($P \leq 0.05$).

		Gruppi sperimentali						
		Giorni	Arsenico (5 μM)		Cadmio (5 μM)		Mercurio (0,04 μM)	
			Controlli	Esposti	Controlli	Esposti	Controlli	Esposti
Livelli di IgM (OD 450 nm)	2	0,127 \pm 0,011	0,123 \pm 0,011	0,126 \pm 0,011	0,117 \pm 0,014	0,131 \pm 0,009	0,120 \pm 0,008	
	10	0,121 \pm 0,012	0,144 \pm 0,027	0,122 \pm 0,012	0,139 \pm 0,004	0,126 \pm 0,004	0,146 \pm 0,011	
	30	0,130 \pm 0,015	0,132 \pm 0,006	0,131 \pm 0,015	0,157 \pm 0,005	0,134 \pm 0,006	0,188 \pm 0,005*	
Proteasi (%)	2	28,58 \pm 1,81	25,81 \pm 2,73*	28,98 \pm 2,12	22,36 \pm 2,87*	31,93 \pm 3,45	59,21 \pm 9,28*	
	10	28,60 \pm 0,86	33,94 \pm 3,31*	29,08 \pm 1,53	35,23 \pm 3,21*	30,50 \pm 6,07	41,40 \pm 8,16*	
	30	28,28 \pm 1,93	28,03 \pm 6,12	28,73 \pm 2,42	22,22 \pm 2,18*	31,76 \pm 4,35	32,57 \pm 9,12	
Antiproteasi (%)	2	9,07 \pm 0,41	10,89 \pm 0,31	8,70 \pm 0,19	11,53 \pm 0,29*	7,74 \pm 0,42	8,07 \pm 0,41	
	10	9,11 \pm 0,23	7,69 \pm 0,17	8,44 \pm 0,40	6,27 \pm 0,50*	8,38 \pm 0,33	7,14 \pm 0,23	
	30	8,97 \pm 0,95	9,51 \pm 1,01	8,97 \pm 0,26	9,01 \pm 0,16	7,58 \pm 0,43	12,91 \pm 0,53*	

- **Attività enzimatiche nel muco**

Il lisozima, le attività di fosfatasi, esterasi, perossidasi, ceruloplasmina-ossidasi, proteasi ed antiproteasi presenti nel muco di *Sparus aurata* variano a seconda dei metalli utilizzati e del tempo di esposizione (Tab. 8 e 9). L'attività lisozimatica aumenta in modo statisticamente significativo nei campioni di muco esposti ad As per 10 giorni, Cd per 10 e 30 giorni e Hg per 30 giorni, rispetto ai campioni controllo. Nel caso dell'attività fosfataseica, questa è aumentata in pesci esposti per 2 e 10 giorni al mercurio. Tuttavia questa attività è stata ridotta nei campioni di muco di pesci esposti a As e Cd per 30 giorni, rispetto ai valori di controllo (Tab. 9). L'attività esteraseica è aumentata nei pesci esposti all'arsenico e al mercurio per 2 e, soprattutto, per 10 giorni, e nei pesci esposti al Cd per 2 e 30 giorni. L'attività perossidaseica presente nel muco era poco influenzata dalla presenza di metalli pesanti in acqua; in particolare, tale attività aumentava dopo 10 giorni di esposizione al Hg e diminuiva dopo 30 giorni di esposizione. Infine, l'attività ceruloplasmina-ossidaseica aumentava nei pesci esposti all'arsenico per 10 giorni e al cadmio per 2 giorni, mentre diminuiva nei pesci esposti al cadmio per 30 giorni e non variava in modo statisticamente significativo nei pesci esposti al mercurio (Tab. 9). L'attività proteaseica diminuiva nei campioni di muco di pesci esposti a As e Cd per 2 giorni e anche nei campioni di muco esposti al Cd per 30 giorni, rispetto ai campioni controllo. Tuttavia, questa attività è aumentata in campioni esposti a As o Cd per 10 giorni. Inoltre, in tali campioni esposti ad As, l'attività proteaseica aumentava dopo 2 e 10 giorni di esposizione (Tab. 8). Per quanto riguarda l'attività antiproteaseica, questa aumentava nei pesci esposti al Cd e all'As per 2 e 30 giorni, rispettivamente.

Tabella 9. Attività enzimatiche, espresso come U mg⁻¹ di proteina, nel muco di *Sparus aurata* non esposti (controlli) e dopo esposizione a (5 µM), cadmio (5 µM) e mercurio (0,04 µM). I dati rappresentano la media± S.E. (n=6). Gli asterischi denotano differenze significative tra gruppi controlli e esposti (P≤0.05).

Metalli pesanti e giorni di esposizione		Gruppi	Attività enzimatiche (U mg ⁻¹ di proteine)				
			Lisozima	Fosfatasi alcalina	Esterasi	Perossidasi	Ceruloplasmina
As	2	Controllo	36,71 ± 7,67	36,56 ± 2,75	36,76 ± 3,74	4,68 ± 0,24	29,32 ± 0,53
		Esposti	28,81 ± 3,76	48,86 ± 3,13	81,54 ± 4,25*	5,04 ± 0,39	37,31 ± 0,83
	10	Controllo	36,66 ± 3,86	36,24 ± 2,15	40,77 ± 3,85	4,32 ± 0,49	45,31 ± 2,13
		Esposti	43,64 ± 4,12*	54,39 ± 2,43*	93,55 ± 4,95*	5,48 ± 0,28	59,17 ± 1,07*
	30	Controllo	34,38 ± 6,46	38,53 ± 1,74	33,85 ± 2,33	5,04 ± 0,64	32,24 ± 0,63
		Esposti	32,71 ± 3,16	18,82 ± 1,97*	36,40 ± 2,89	3,28 ± 0,68*	22,92 ± 0,53
Cd	2	Controllo	37,11 ± 6,69	36,12 ± 3,14	36,16 ± 2,91	4,76 ± 0,48	28,35 ± 0,53
		Esposti	35,56 ± 6,11	34,94 ± 2,73	62,97 ± 3,55*	4,96 ± 0,60	65,03 ± 5,33*
	10	Controllo	35,26 ± 4,96	36,58 ± 2,58	40,32 ± 3,13	4,68 ± 0,24	44,32 ± 2,13
		Esposti	42,78 ± 4,84*	36,56 ± 2,86	52,05 ± 3,86	5,88 ± 0,27	54,90 ± 1,60
	30	Controllo	35,98 ± 4,36	37,96 ± 3,67	34,21 ± 2,54	4,44 ± 0,65	31,23 ± 0,63
		Esposti	27,58 ± 3,04*	28,53 ± 1,84*	61,88 ± 3,52*	4,12 ± 0,36	17,46 ± 1,20*
Hg	2	Controllo	23,68 ± 3,76	36,49 ± 1,92	44,59 ± 3,12	5,48 ± 0,77	69,83 ± 5,46
		Esposti	28,53 ± 3,16	58,33 ± 4,17*	79,32 ± 4,34*	5,88 ± 0,83	79,96 ± 5,99
	10	Controllo	24,52 ± 3,76	30,87 ± 2,15	53,50 ± 3,18	4,86 ± 0,68	62,37 ± 1,61
		Esposti	28,04 ± 3,26	52,78 ± 3,68*	73,11 ± 3,78*	7,58 ± 0,80*	68,23 ± 3,22
	30	Controllo	23,91 ± 4,51	38,17 ± 2,72	56,39 ± 2,35	5,28 ± 0,35	75,69 ± 2,25
		Esposti	40,94 ± 3,81*	28,21 ± 2,32	57,53 ± 2,92	6,61 ± 0,61	85,82 ± 4,82

- **Attività battericida**

L'attività battericida del muco di esemplari di *S. aurata* esposti a metalli pesanti contro batteri sia patogeni che non patogeni è stata determinata (Tab. 10). La crescita batterica ha mostrato lievi differenze a seconda del metallo, del tempo di esposizione e del tipo di batteri utilizzati. Abbiamo osservato che la crescita di *V. anguillarum* è stata ridotta nel muco di esemplari esposti per 2 e 10 giorni al Hg. Allo stesso modo, la crescita di *P. damseale* è stata ridotta nel muco di pesci esposti per 10 giorni al Hg, rispetto ai valori presenti nel muco dei pesci non esposti (controllo). L'attività battericida del muco verso *V. harveyi*, *E. coli*, *B. subtilis* e *S. putrefaciens* non è stata influenzata in modo significativo, rispetto ai valori dei pesci controllo.

Tabella 10: crescita batterica in campioni di muco di pesci non esposti (controllo) e dopo esposizione ad arsenico (5 µM), cadmio (5 µM) e mercurio (0,04 µM). I dati rappresentano la media± S.E. (n=6). Gli asterischi denotano differenze significative tra gruppi controlli e esposti (P≤0,05).

Batteri	Giorni	Gruppi sperimentali					
		Arsenico (5 µM)		Cadmio (5 µM)		Mercurio (0,04 µM)	
		Controllo	Esposti	Controllo	Esposti	Controllo	Esposti
<i>Vibrio harveyi</i>	2	43,51 ± 2,01	44,46 ± 0,82	42,91 ± 2,81	44,70 ± 3,30	49,24 ± 1,27	46,10 ± 1,12
	10	43,23 ± 3,24	43,77 ± 2,66	42,58 ± 3,04	43,54 ± 1,75	43,38 ± 1,82	39,72 ± 2,54
	30	42,93 ± 3,73	45,28 ± 2,30	43,23 ± 2,78	42,60 ± 0,76	41,21 ± 2,61	44,90 ± 1,45
<i>Vibrio angillarum</i>	2	68,88 ± 4,54	63,85 ± 1,91	67,28 ± 4,74	65,67 ± 3,35	69,50 ± 1,36	53,92 ± 1,23*
	10	66,77 ± 1,84	64,88 ± 2,39	67,87 ± 1,24	72,65 ± 6,34	66,51 ± 8,53	50,48 ± 1,34*
	30	63,77 ± 2,26	66,61 ± 1,25	62,33 ± 2,66	61,08 ± 2,35	70,67 ± 6,15	67,21 ± 6,31
<i>Photobacterium damsela</i>	2	65,82 ± 5,48	62,74 ± 2,60	66,12 ± 4,58	65,42 ± 4,65	66,34 ± 3,01	69,33 ± 2,35
	10	62,61 ± 3,84	64,31 ± 3,90	63,11 ± 2,14	70,32 ± 8,62	67,97 ± 2,07	47,26 ± 1,27*
	30	60,65 ± 3,24	67,36 ± 2,33	61,35 ± 4,54	57,63 ± 0,77	64,01 ± 0,32	57,01 ± 0,98
<i>Escherichia coli</i>	2	105,51 ± 3,03	107,64 ± 0,66	104,61 ± 3,33	106,04 ± 4,79	122,84 ± 2,10	113,32 ± 1,38
	10	103,52 ± 4,09	99,91 ± 1,75	101,12 ± 3,34	106,28 ± 1,64	116,87 ± 4,35	109,68 ± 2,38
	30	103,59 ± 2,02	101,84 ± 1,62	104,89 ± 2,54	102,67 ± 2,28	118,97 ± 1,94	117,73 ± 2,11
<i>Bacillus subtilis</i>	2	119,93 ± 7,32	125,99 ± 2,69	118,83 ± 5,66	112,33 ± 3,12	107,86 ± 2,09	98,14 ± 5,12
	10	125,81 ± 4,08	112,67 ± 1,22	124,61 ± 4,78	122,26 ± 3,32	109,97 ± 1,65	100,26 ± 3,02
	30	124,22 ± 0,98	123,36 ± 4,51	125,66 ± 2,78	110,33 ± 8,54	101,05 ± 6,68	100,29 ± 5,38
<i>Shewanella putrefaciens</i>	2	83,68 ± 2,12	81,14 ± 1,26	84,58 ± 2,76	83,45 ± 1,47	102,89 ± 1,98	102,94 ± 3,12
	10	80,21 ± 1,07	82,61 ± 1,34	79,51 ± 1,65	83,39 ± 2,93	102,21 ± 1,34	98,42 ± 2,43
	30	84,61 ± 0,96	84,36 ± 0,21	86,67 ± 1,53	81,19 ± 2,17	100,58 ± 2,69	101,95 ± 7,02

- **SDS-PAGE e Immunoblotting**

Nel muco di individui di *S. aurata* esposti a metalli pesanti, tramite elettroforesi su gel, sono stati identificati quattro bande. I pesi molecolari di tali bande erano approssimativamente di 45, 36, 24 e 14,2 kDa (Fig. 33). È interessante notare che tutte le elettroforesi su gel hanno mostrato un andamento simile, non dipendente del metallo pesante a cui erano stati esposti gli animali. Tuttavia, la banda di circa 14,2 kDa era assente nei pesci esposti a As e Cd per 30 giorni (Fig. 13 A e B, colonna 5 e 6).

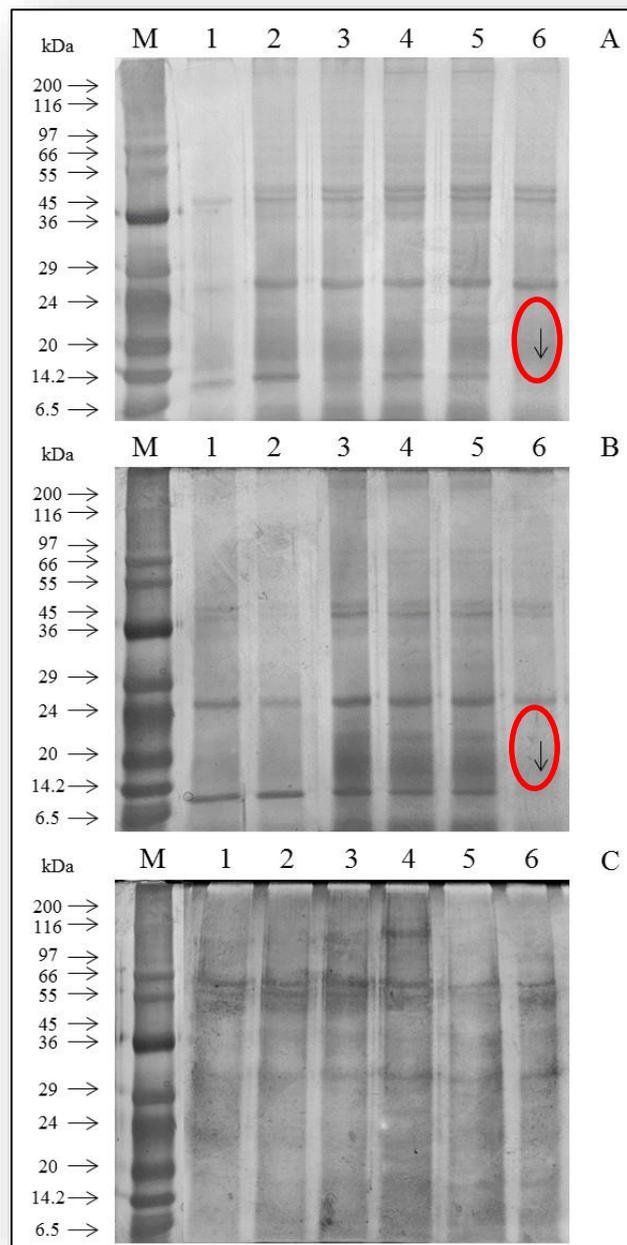


Fig. 33: SDS-PAGE di campioni di muco di individui di *S.aurata* non esposti (controllo: linee 1, 3 e 5) e esposti al triossido di arsenico (As_2O_3) 5 μM (A), cloruro di cadmio ($CdCl_2$) 5 μM (B) al cloruro di metilmercurio (CH_3HgCl) 0,04 μM (C) dopo 2 (linea 2), 10 (linea 4) and 30 giorni (linea 6) in condizioni ridotte. I gel sono stati colorati con

il nitrato di argento. Le frecce indicano la posizione degli standards; i pesi molecolari sono espressi in kilodaltons (kDa).

L'immunoblotting ha rivelato la presenza, nei campioni di muco di pesci esposti ai metalli, di una proteina che interagisce con una *lectina legante il fucosio* (DIFBL) isolata dal siero di spigola (*Dicentrarchus labrax*). La banda non è stata osservata in campioni di muco di pesci esposti per 30 giorni ad arsenico e al cadmio (Fig. 34).

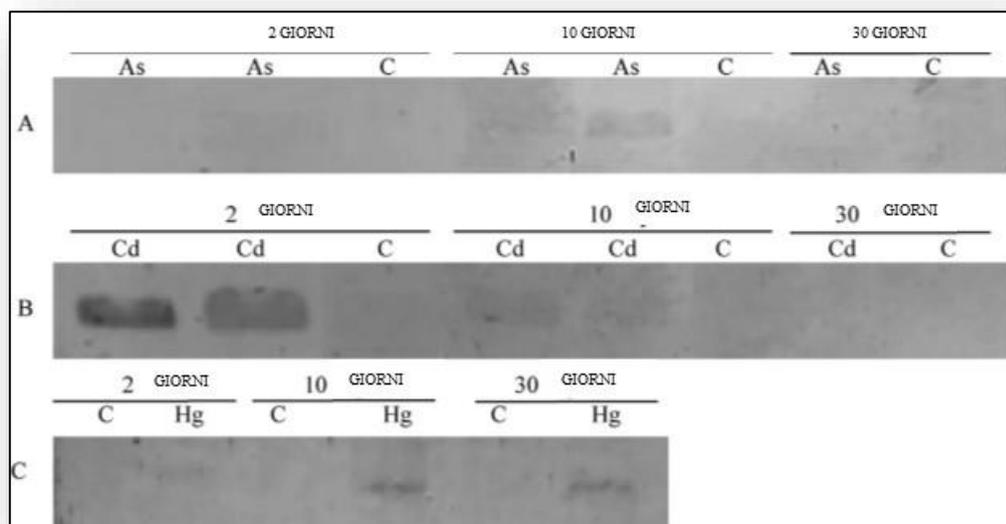


Fig.34: immunoblotting con anticorpi primari anti-DIFBL con gel elettroforetico (7,5%) in campioni di muco di pesci non esposti (controllo: C) esposti al triossido di arsenico (As_2O_3) 5 μM (A), cloruro di cadmio ($CdCl_2$) 5 μM (B) e al cloruro di metilmercurio (CH_3HgCl) 0,04 μM (C) dopo 2, 10 e 30 giorni in condizioni ridotte.

- **Cromatografia HPLC in fase inversa**

L'analisi cromatografica ha mostrato un modello simile di picchi tra i campioni di muco dei pesci controllo (non esposti) e i campioni di muco di pesci esposti ai metalli. Tuttavia, questo modello di intensità variabile a seconda del tempo di esposizione e del tipo di metallo (Fig. 35). Così, è stato osservato un leggero calo di intensità del modello nei campioni esposti per breve tempo ai metalli (2 o 10 giorni) ad eccezione dei i campioni di muco di pesci esposti per 10 giorni al Cd in cui è stato trovato un grande aumento del modello di pesci esposti, rispetto ai valori riscontrati nei controlli (non esposti). Al contrario, il modello di pesci esposti a Hg è aumentato notevolmente dopo 30 giorni di esposizione, mentre le variazioni erano lievi nei campioni di pesce As e Cd esposto.

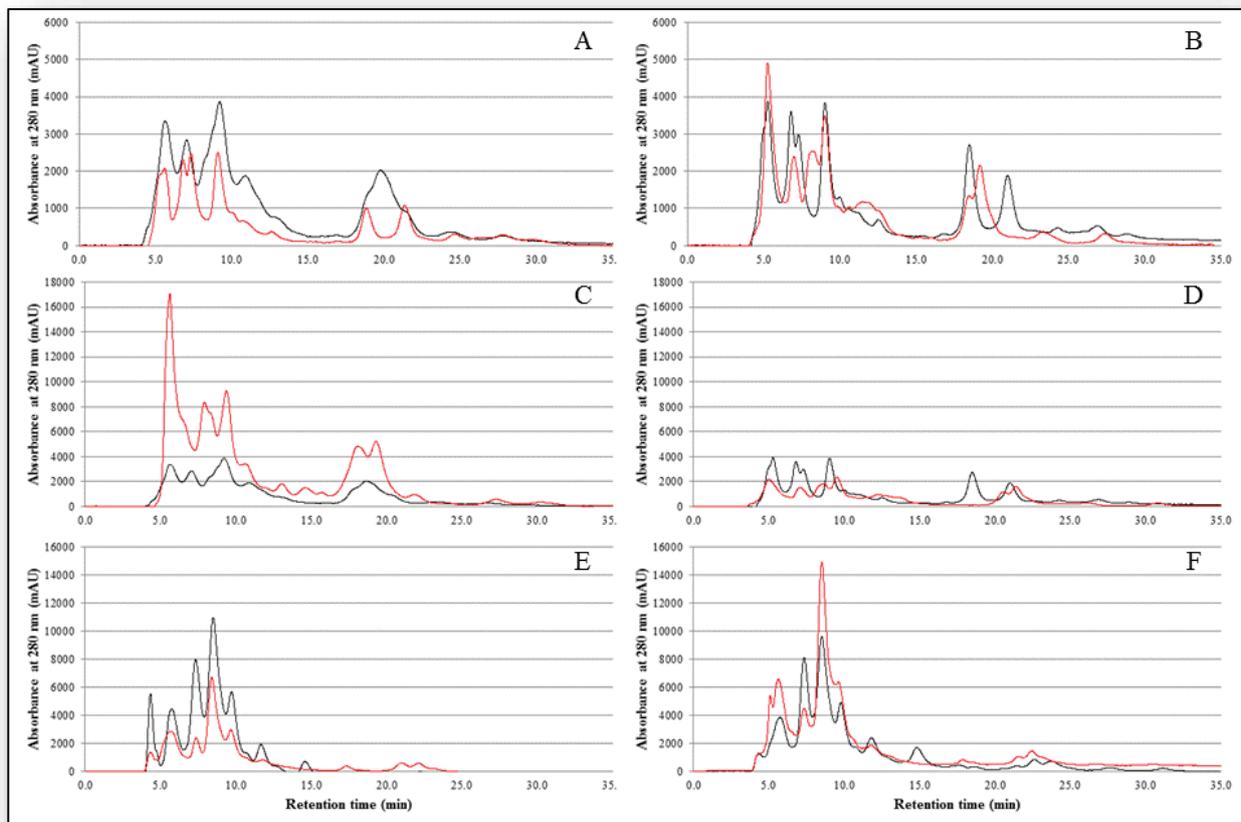


Fig. 35: Profilo cromatografico di campioni di muco di pesci non esposti (linea nera) ed esposti (linea rossa) al triossido di arsenico (As_2O_3) 5 μM (dopo 10 (A) e 30 (B) giorni), al cloruro di cadmio ($CdCl_2$) 5 μM (dopo 10 (C) e 30 (D) giorni) e al cloruro di metilmercurio (CH_3HgCl) 0,04 μM (dopo 10 (E) e 30 (F) giorni). I profili di eluizione sono stati determinati misurando l'assorbanza a 280nm.

3.4. Effetti della somministrazione di vitamina D₃ in *Dicentrarchus labrax*

- **Parametri sierologici**

I livelli di glucosio nel siero mostravano differenze significative nei campioni alimentati per due settimane con l'aggiunta di alte concentrazioni di vitamina D₃ rispetto agli animali controllo alimentati con pellet non integrato, anche i livelli di cortisolo nel siero erano più bassi negli animali alimentati per 4 settimane con l'aggiunta di vD₃ rispetto al controllo. L'attività proteasica ed antiproteasica del siero non mostravano differenze significative nel pesce alimentato con l'aggiunta di vitamina D₃ a diverse concentrazioni (Tab. 11).

Tabella 11: Parametri sierici di individui alimentati con differenti concentrazioni di vitamina (controllo, 3750; 18,750 e 37,500 U kg⁻¹) dopo 2 e 4 settimane di trattamento. I dati rappresentano la media ± SEM (n=5). Lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi (P ≤ 0,05).

Tempi sperimentali	Gruppi sperimentali	Parametri			
		Livelli glucosio (mg ml ⁻¹)	Livelli di cortisolo (ng ml ⁻¹)	Attività Proteasica (%)	Attività antiproteasica (%)
2	Controllo	44,75± 10,93ab	69,1±12,7a	9,40 ± 0,50a	10,54 ± 0,37a
	3750 (U Kg ⁻¹)	57,5 ± 12,82a	47,8±8,3a	10,42 ± 1,58a	9,45 ± 0,48a
	18750 (U Kg ⁻¹)	44,6 ± 4,02ab	58,7±8,6a	12,20 ± 2,58a	10,75 ± 0,57a
	37500 (U Kg ⁻¹)	28,25 ± 3,20b	50,7±13,6a	9,57 ± 0,44a	11,04 ± 0,20a
4	Controllo	49,8 ± 9,98a	81,0±9,9a	9,71 ± 0,42a	11,66 ± 0,85a
	3750 (U Kg ⁻¹)	43,75 ± 7,03a	50,4±14,7b	10,82 ± 0,31a	11,87 ± 0,36a
	18750 (U Kg ⁻¹)	29,4 ± 3,84a	44,1±5,2b	11,03 ± 0,66a	11,11 ± 0,59a
	37500 (U Kg ⁻¹)	25,5 ± 1,50a	29,0±12,4b	10,31 ± 0,32a	11,21 ± 0,61a

- **Effetti della vitamina D₃ su alcuni parametri umorali**

L'attività emolitica del complemento e i livelli di IgM del siero isolate non hanno mostrato differenze significative nei pesci alimentati con l'aggiunta di vitamina D₃ a diverse concentrazioni rispetto ai pesci controllo (Tab.12). Al contrario, un aumento statisticamente significativo dose-dipendente è stato trovato per l'attività perossidasi del siero in spigole alimentate con pellet integrato con la vD₃ dopo 4 settimane rispetto ai valori presenti nel controllo (Fig. 36).

Tabella 12: Parametri immunitari umorali nel siero di individui alimentati con differenti concentrazioni di vitamina (controllo, 3750; 18,750 e 37,500 U kg⁻¹) dopo 2 e 4 settimane di trattamento. I dati rappresentano la media \pm SEM (n=5). Lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi ($P \leq 0,05$).

Tempi sperimentali	Gruppi sperimentali		
		Attività emolitica del complemento (ACH ₅₀ units ml ⁻¹)	Livelli di IgM (OD 450 nm)
2	Controllo	45,13 \pm 4,36a	0,26 \pm 0,02a
	3750	49,37 \pm 4,86a	0,28 \pm 0,02a
	18750	37,31 \pm 5,11a	0,27 \pm 0,03a
	37500	44,25 \pm 5,97a	0,29 \pm 0,01a
4	Controllo	37,22 \pm 8,34a	0,28 \pm 0,03a
	3750	48,10 \pm 12,34a	0,31 \pm 0,01a
	18750	37,47 \pm 9,52a	0,28 \pm 0,02a
	37500	61,33 \pm 15,14a	0,32 \pm 0,05a

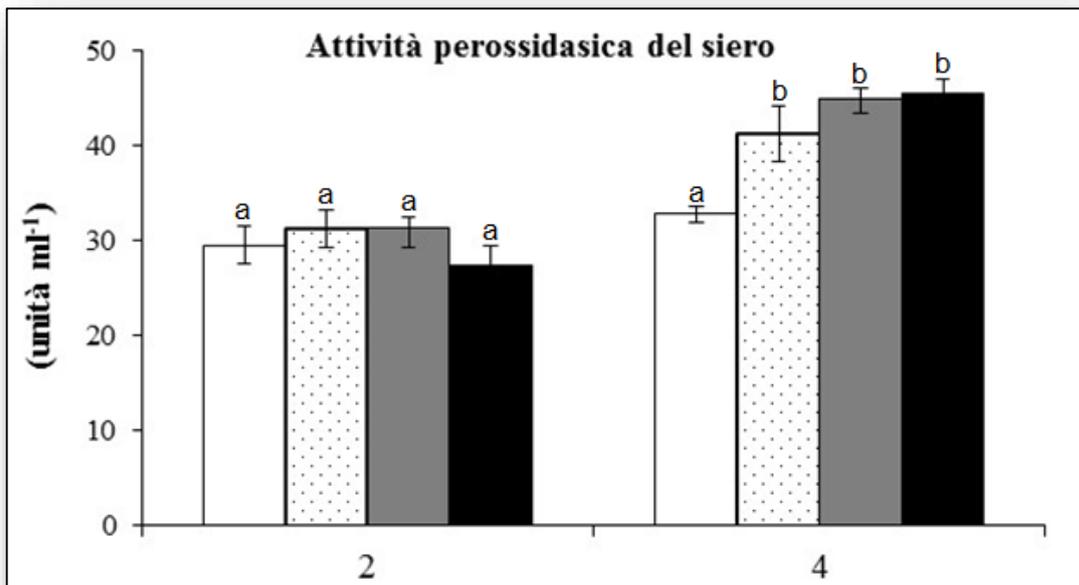


Fig. 36: attività perossidasi del siero (unità ml⁻¹) di spigole alimentate con differenti concentrazioni di vitamina D₃: controllo (istogramma bianco) 3750 (istogramma a pallini), 18,750 (istogramma grigio) e 37,500 (istogramma nero) U kg⁻¹ dopo 2 e 4 settimane di trattamento. Lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi ($P \leq 0,05$).

- **Effetti della vitamina D₃ sull'attività fagocitica**

La capacità fagocitica (percentuale di cellule fagocitiche) dei leucociti dell'essudato della cavità peritoneale, ha mostrato un aumento statisticamente significativo nei pesci alimentati con la maggiore concentrazione di vitamina (37,500 U kg⁻¹) per 2 settimane (Fig. 37). Tuttavia, è stato osservato un aumento statisticamente significativo quando i pesci sono stati alimentati con le due più alte concentrazioni (18,750 e 37,500 U kg⁻¹) dopo 4 settimane di trattamento (Fig. 37).

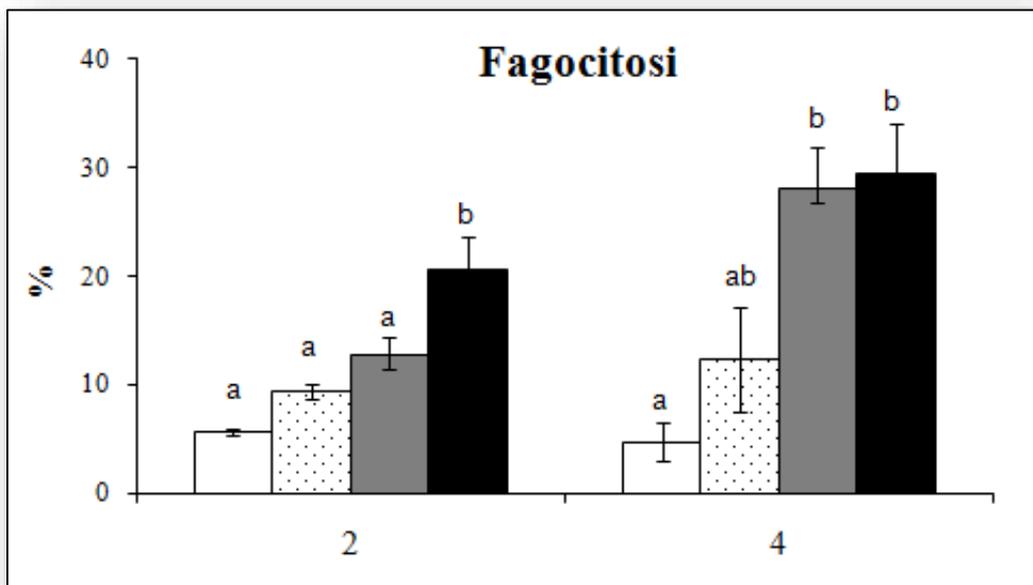


Fig. 37: percentuale di cellule fagocitiche di leucociti dell'essudato della cavità peritoneale di *D. labrax* alimentati con differenti concentrazioni di vitamina: controllo (istogramma bianco) 3750 (istogramma a pallini), 18,750 (istogramma grigio) 37,500 (istogramma nero) U kg⁻¹, dopo 2 e 4 settimane di trattamento. Lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi ($P \leq 0,05$).

- **Effetti della vitamina D₃ sull'espressione genica**

L'espressione dei geni legati all'immunità, come le proteine leganti i carboidrati, FBL e RBL (fucosio e ramnosio-*binding-lectin*), stress ossidativo, *sod* (superossidodismutasi), peptidi antimicrobici, epcidina e *lys* (lisozima), e citochine proinfiammatorie, iL-1 β (interleuchina-1 β), sono stati valutati nella testa del rene (HK) e nell'intestino dei pesci sperimentale (Fig. 38 e 39). In HK, c'era un up-regulation statisticamente significativo dei geni di FBL ed RBL nei pesci alimentati con la maggiore concentrazione di diete vD3-integrate (37.500 U kg⁻¹) dopo 4 settimane rispetto al gruppo di controllo (Fig. 38B). Per contro, nell'intestino c'era un'up-regulation statisticamente significativa del gene *hep* nei pesci alimentati con la minore concentrazione di VD3 (3,750 U kg⁻¹) dopo 2 settimane (fig. 39A), mentre l'espressione di questo gene ha mostrato soltanto un'up-regulation statisticamente significativa nelle spigole alimentate con le due più alte concentrazioni di vitamina (18,750 e 37,500 U kg⁻¹) dopo 4 settimane di trattamento (Fig. 39B). Inoltre, dopo 4 settimane, è stato osservato un aumento dell'espressione genica di *sod* nei pesci alimentati con la maggiore concentrazione di VD₃ rispetto ai pesci alimentati con una dieta non integrata (Fig. 39B).

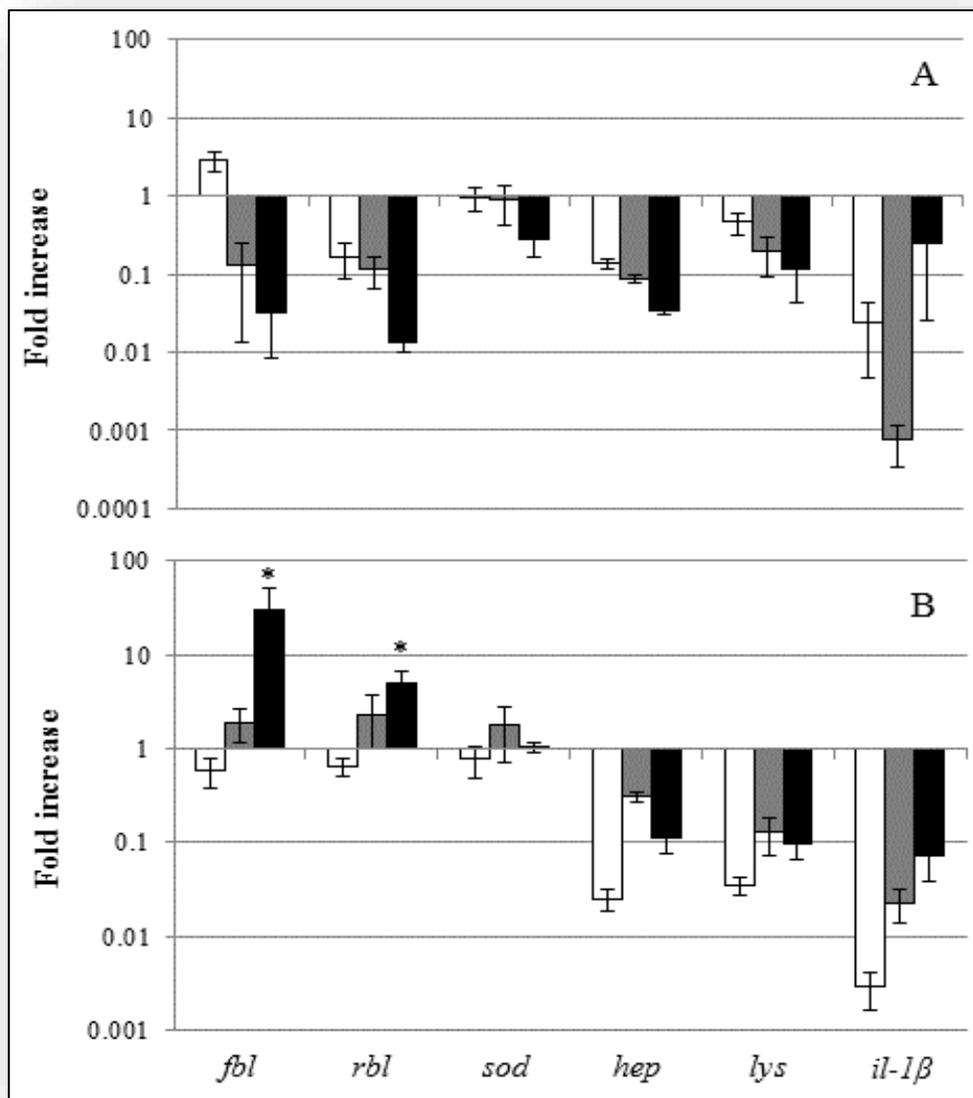


Fig. 38: Espressione genica, determinata tramite real-time PCR nella testa del rene di *D. labrax* alimentati con differenti concentrazioni di vitamina D3: 3750 (istogramma bianco) 18,750 (istogramma grigio) e 37,500 (istogramma nero) U kg⁻¹, dopo 2 (A) e 4 (B) settimane di trattamento. Gli asterischi indicano differenze significative tra i gruppi trattati ($P \leq 0,05$). Le barre rappresentano la media \pm ESM (n=5) dell'incremento rispetto al controllo.

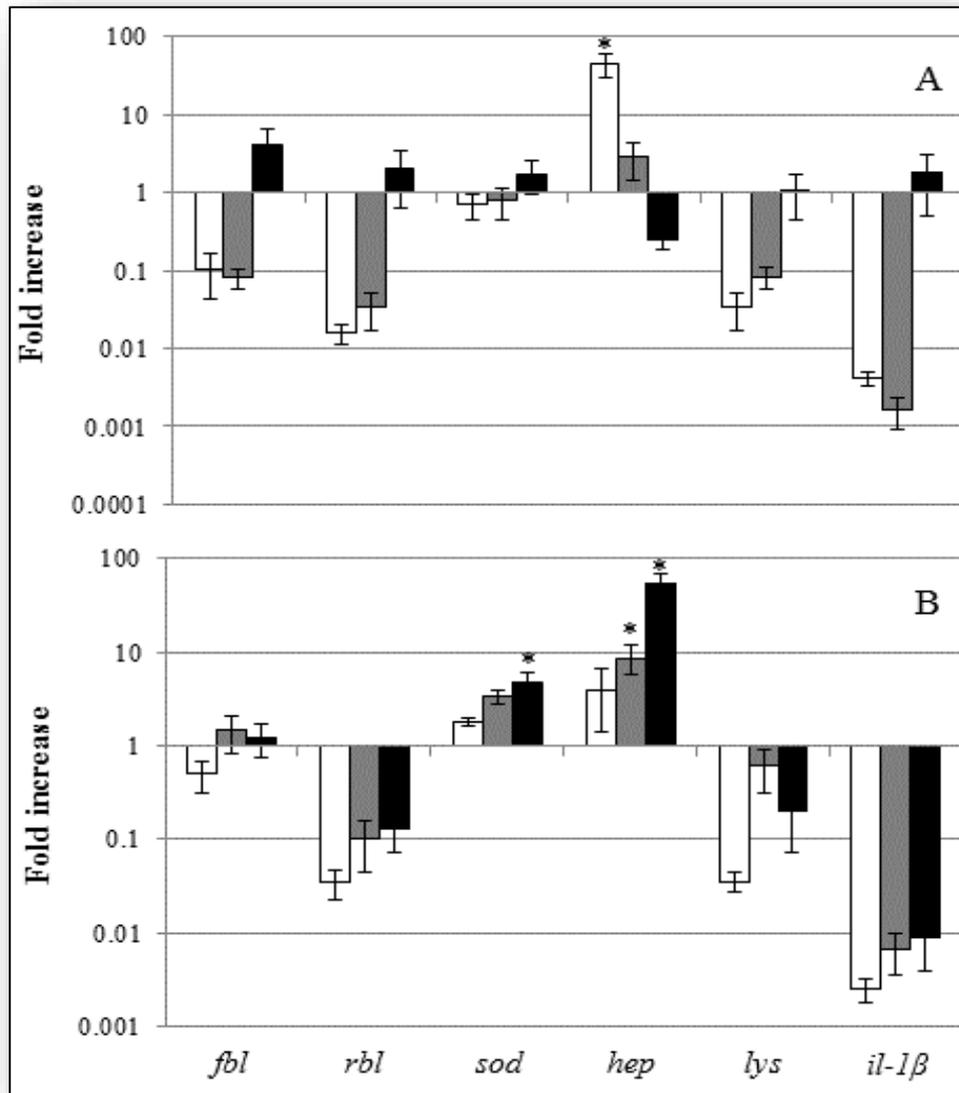


Fig. 39: espressione genica, determinata tramite real-time PCR nell'intestino di *D. labrax* alimentati con differenti concentrazioni di vitamina D3: 3750 (istogramma bianco) 18,750 (istogramma grigio) e 37,500 (istogramma nero) U kg⁻¹, dopo 2 (A) e 4 (B) settimane di trattamento. Gli asterischi indicano differenze significative tra i gruppi trattati (P ≤ 0.05). Le barre rappresentano la media ± ESM (n=5) dell'incremento rispetto al controllo.

- **Studio istologico dell'intestino dopo somministrazione di vD₃**

Strutturalmente, la parete intestinale di *D. labrax* è formata da quattro strati, che sono: la mucosa, la sottomucosa, la muscolare (muscolare interna e esterna) e la sierosa. Le osservazioni al microscopio ottico hanno rivelato che i pesci alimentati per 2 e 4 settimane con la dieta con l'aggiunta di vD₃ o avevano una struttura morfologica intestinale normale rispetto al controllo (Fig. 40). Gli animali alimentati con la dieta sperimentale presentavano una barriera epiteliale intatta, enterociti ben strutturati e non erano presenti detriti cellulari, confrontati con i pesci controllo. Inoltre, non abbiamo osservato segni di segni di edema o di infiammazione. La mucosa

intestinale era formata da un semplice epitelio con abbondanti cellule caliciformi e una lamina propria; erano evidenti alcuni leucociti e uno strato continuo di muco è stato osservato sulla parte apicale dell'epitelio (Fig. 40).

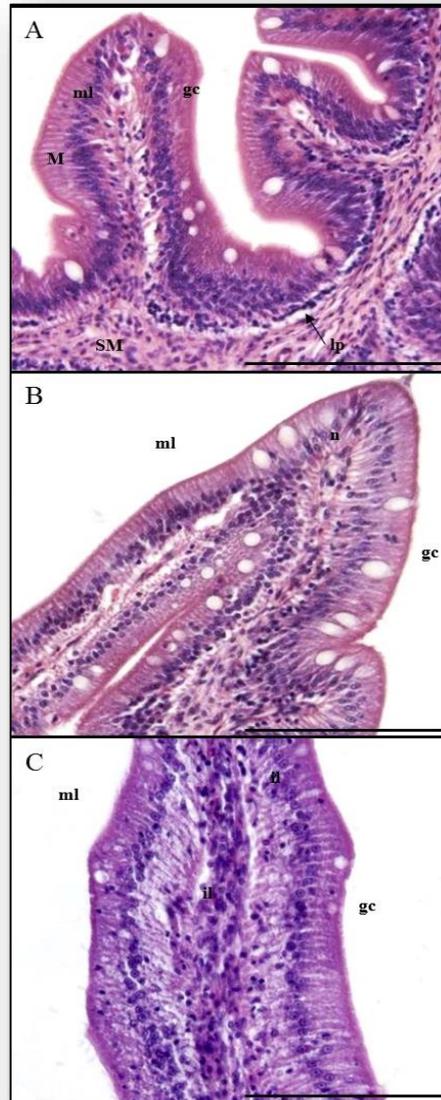


Fig. 40: sezioni istologiche dell'intestino di *Dicentrarchus labrax* alimentati per 4 settimane con la dieta controllo (A e B) e con la dieta con l'aggiunta di vitamina D₃ alla concentrazione di 37,500 U kg⁻¹(C). m: mucosa; sm: submucosa; gc: goblet cells, ml: strato di muco; il: leucociti infiltrati; n: nuclei, lp: lamina propria. Bar = 100 µm

Discussione

4. Discussione

La maggior parte delle definizioni di benessere degli animali possono essere liberamente classificati in “function-based” e in “feeling-based”. La definizione “function-based” presuppone che il benessere sia correlato con il funzionamento biologico tra cui le risposte allo stress fisiologico (Duncan 2005), mentre nella definizione “feeling-based”, il benessere corrisponde allo stato emotivo dell'animale (Duncan e Dawkins 1983) che a lungo termine, rappresenta l'equilibrio tra le esperienze soggettive sia positivo che negative (Spruijt et al. 2001). La base principale per il concetto di 'benessere animale' è la convinzione che gli animali sono esseri senzienti, con una capacità di provare sentimenti buoni o cattivi o stati emotivi (Dawkins 1990).

Il comportamento rappresenta una reazione all'ambiente ed è quindi un elemento chiave per la valutazione del benessere dei pesci.

I pesci, così come tutti gli altri vertebrati, possiedono differenti strategie comportamentali e fisiologiche di adattamento che si sono evolute per affrontare situazioni stressanti.

Le risposte comportamentali sono la prima linea di difesa di un animale contro cambiamenti ambientali avversi, predatori, e il conflitto sociale, spesso è innescato dagli stessi stimoli che attivano una risposta allo stress fisiologico. Le risposte comportamentali dei pesci di fronte a fattori stressanti possono essere di varia natura. Modelli alterati di nuoto (cambi di velocità e direzione) sono mostrati in risposta a molti fattori di stress (Juell & Fosseidengen, 2004). Dopo un attacco da parte di un conspecifico, i pesci possono fuggire, nascondersi o assumere una postura di sottomissione, spesso con cambiamenti nella livrea (O'Connor et al. 1999; Sutor & Huntingford, 2002). L'alimentazione può essere soppressa a seguito di un incontro con un predatore, o possono essere adottate strategie alimentari inefficaci (Hart, 1993) e pesci possono evitare le aree in cui precedentemente erano stati attaccati (Lima, 1998).

L'ambiente sociale di una specie può essere una notevole fonte di stress (Koolhaas et al. 1997; Blanchard et al. 1999; DeVries et al. 2003). In molte specie, gli animali sono organizzati in territori, e viene stabilita una gerarchia di dominanza. In questi casi, lo stress sociale può essere considerato il risultato del contatto fisico tra animali (alta densità e interazione agonistica) più componenti psicologiche, come l'instabilità e la sottomissione gerarchica (Zayan 1991). Lo stress può interessare diversi aspetti della fisiologia dei vertebrati, tra cui risposta allostatica. Il carico allostatico (AL) rappresenta cambiamenti significativi alla ricerca di una nuova condizione di omeostasi durante situazioni stressanti (stress cronico) (McEwen e Stellar 1993). La maggior

parte degli studi che hanno affrontato questo argomento sono stati condotti su primati e piccoli mammiferi da laboratorio e in condizioni acute, ad esempio, gli animali sono stati sottoposti a stimoli stressanti per un breve periodo, e sono state monitorate le risposte comportamentali e fisiologiche durante e subito dopo l'evento stressante è rimosso (Chrousos et al. 1995; Csermely 1998). Nei pesci, sono stati condotti alcuni studi utilizzando la stessa procedura, ed i risultati ottenuti sono stati simili a quelli prodotti in altri vertebrati (Auperin et al. 2008; Fast et al. 2008). Le interazioni sociali in molti animali sono determinate da relazioni di dominanza o gerarchia dove la posizione gerarchica regola l'accesso a risorse come il cibo, l'acqua, lo spazio e, il successo riproduttivo (Paull et al. 2010). Le relazioni dominante-subordinato possono avere conseguenze sullo stato fisiologico e sulla reattività dell'animale (Currie et al. 2010). Durante le interazioni sociali, gli individui ricevono molteplici forme di informazioni sensoriali e utilizzano questi segnali per stabilire e mantenere la gerarchia (Rosenthal et al 2001; Korzan et al 2007). Le interazioni sociali tra conspecifici sono, almeno per alcune specie di pesci, processi dinamici, in cui i subordinati spesso tentano di diventare dominanti e i dominanti cercano di mantenere il loro status dominante tramite attacco diretto o tramite i segnali visivi (Oliviera et al. 2002). Inoltre, è stato dimostrato che queste alterazioni nei pesci subordinati possono determinare l'inibizione dell'appetito (Meerlo et al.1997; Øverli et al. 1998; Kramer et al. 1999), la riduzione di aggressione (Blanchard et al.1995; Höglund et al. 2001), e la compromissione del comportamento riproduttivo (D'Amato 1988; Perret 1992). Inoltre, il contatto tra i pesci conspecifici non promuove assuefazione (Fernandes de Castilho et al. 2008). Nei pesci, la sconfitta sociale rappresenta un potente fattore di stress che può portare a cambiamenti nel comportamento degli animali e nella fisiologia (Sloman & Armstrong 2002; Martins et al. 2006; Edeline et al. 2010). Nei pesci, i segnali visivi dei conspecifici possono contribuire alla regolazione del comportamento sociale (Chen & Fernald 2011). E 'noto che il pesce può dedurre rango sociale dalla sola osservazione (Grosenick et al. 2007). Infatti, i teleostei spesso vivono in ambienti ottimali per la segnalazione visiva (Fernald et al. 1977) e hanno un ottimo sistema visivo con visione ad alta risoluzione (Fernald et al. 1985). La variazione dell'aggressione e i cambiamenti fisiologici sono usati come indicatori di benessere (FSBI, 2002). La posizione dominante e il rango sociale sono inestricabilmente legati alla regolamentazione di testosterone e cortisolo (Rivers et al. 2010). Inoltre, è stato dimostrato che il cortisolo è correlato con l'instaurarsi della gerarchia (Sloman et al. 2001). Sloman et al. (2002) ha dimostrato che nei salmoni gli individui subordinati avevano tassi di crescita ridotti, un aumento dei costi metabolici, e un aumento di cortisolo nel siero.

In *Sparus aurata* lo stress sociale influenza soprattutto la risposta delle cellule dell'essudato

peritoneale (PEC) negli individui subordinati come rivelato dalla fagocitosi e dell'attività respiratoria (Cammarata et al. 2012).

In letteratura è riportato che le PEC sono coinvolte nelle risposte aspecifiche e specifiche del sistema immunitario (Ellis 1982; Sakai 1984; Suzuki 1986; Oliviera et al. 1992; Bodammer 1986; Vazzana et al. 2003; Cammarata et al. 2000). Fattori di stress diminuiscono l'attività respiratoria e citotossica dei leucociti nel pronefro e nella cavità peritoneale dei pesci (Vazzana et al. 2002).

Inoltre, esperimenti condotti *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che l'aumento dei livelli di cortisolo in *D. labrax* influenzano l'attività di fagocitosi attraverso il suo recettore citosolico DIGR1 (Vizzini et al. 2007). Questo recettore è stato localizzato nel pronefro, nella milza, nelle branchie, nell'intestino, nel cuore e nel fegato (Vazzana et al. 2008) evidenziando il ruolo cruciale del cortisolo nella regolazione dell'omeostasi.

Durante la fase sperimentale della presente tesi di dottorato, i parametri utilizzati per stabilire una gerarchia sociale sono stati l'aggressività e la priorità di alimentazione. Per esaminare le variazioni dei parametri comportamentali e fisiologici ho utilizzato vari modelli sperimentali che hanno mostrato variazioni di aggressività e nell'ordine di alimentazione dopo l'instaurarsi di una gerarchia di dominanza come definito da Øverli et al. (2002).

In questo lavoro, la gerarchia si è stabilita nel giro di un'ora ed è rimasta invariata per tutto il periodo sperimentale. Nel "modello random" in cui i pesci sono stati inseriti contemporaneamente nella vasca, dopo 24 ore abbiamo osservato un aumento di cortisolo statisticamente significativo negli individui subordinati con un maggiore incremento nel subordinato γ rispetto all'individuo dominante e un incremento dell'attività fagocitica delle cellule dell'essudato peritoneale negli individui dominanti come riportato da Cammarata et al. (2012). Il modello sequenziale ha rivelato l'importanza dell'acquisizione di territorialità nella formazione di una gerarchia di dominanza. I risultati di questo lavoro mostrano che lo stress può anche essere determinato da interazioni sociali e dalle dispute territoriali attivando la via di risposta classica allo stress con secrezione di cortisolo come avviene in risposta ad altri fattori di stress e in tutti i vertebrati (Sloman 2011). Inoltre, nel modello sequenziale, abbiamo esaminato lo stato dell'animale dopo 15 giorni, poiché è stato dimostrato essere il momento in cui si sono riscontrati maggiori variazioni fisiologiche e comportamentali in *Sparus aurata* (Cammarata et al. 2012). In questa fase, abbiamo osservato un aumento dei livelli di cortisolo nel plasma nei subordinati (β e γ) e un aumento dell'attività fagocitica nei subordinati. Inoltre, il modello sequenziale ci ha permesso di sottolineare l'importanza dell'acquisizione di territorialità nella determinazione di una gerarchia di dominanza, in quanto abbiamo dimostrato che il pesce che è

stato inserito nella vasca per primo è diventato dominante. Questo significa che un maggior tempo di esplorazione dello spazio è determinante nella formazione di una gerarchia sociale.

Il maggiore tempo ad esplorare corrisponde a un maggior senso di territorialità, che si traduce nella gerarchia di dominanza (Hughes e Blight 1999).

Inoltre, i dati ottenuti evidenziano una differenza nella risposta allo stress dipendente dal tempo per quanto riguarda gli individui subordinati, mentre i dominanti mostrano una tendenza alla omeostasi. Va notato che in questo studio, gli individui che si alimentano dopo l'instaurarsi della gerarchia sociale quasi sempre vincono le lotte per affermare la loro dominanza. Infine, una valutazione statistica effettuata mediante analisi discriminante in entrambi i modelli sperimentali ha evidenziato la netta separazione tra i due modelli sperimentali (random e sequential) e il controllo e una separazione dei singoli individui rispetto al controllo.

Anche se i risultati finali dopo l'instaurarsi della gerarchia nei due modelli esaminati sono simili, una separazione significativa tra i due modelli in termini di status fisiologico è chiaramente definita e, in particolare il modello casuale ha subito un'alterazione più significativa del modello sequenziale. Queste differenze tra i modelli potrebbero essere attribuite a diversi carichi allostatici e al tempo di adattamento nelle risposte, indicando che questi potrebbero essere utilizzati come biomarker di carico allostatico nelle risposte allo stress sociale e di impatto sulla salute dei pesci. Questi studi potrebbero avere un interesse commerciale (Ringo et al. 1997) in quanto *Sparus aurata* è una specie economicamente importante poiché, da quanto sinora detto le interazioni sociali possono essere fonte di stress e quindi di possibile insorgenza di malattie alla pari di qualsiasi altro fattore stressante come la temperatura, la qualità dell'acqua, la salinità, la quantità di ossigeno disciolto, presenza di contaminanti i cui effetti sui parametri sierologici e immunitari sono ampiamente documentati in letteratura (Cnaani et al. 2004). L'importanza delle interazioni sociali che si instaurano tra gli animali è molto spesso sottovalutato. I risultati, per entrambi i modelli sperimentali studiati, indicano una separazione significativa dei gruppi di pesci subordinati rispetto ai gruppi dominanti e ai controlli e una differenza significativa tra i modelli casuali e sequenziali, differenza che in quest'ultimo caso è probabilmente attribuibile alla percezione territorio nel modello sequenziale.

Invece, nel modello dell'inganno l'inserimento del separatore ondulato ha determinato confusione nei pesci, i quali perdendo i riferimenti spaziali dopo averlo tolto hanno mostrato entrambi un comportamento aggressivo in quanto presumibilmente si sentivano dominanti dello stesso territorio. Pertanto in questo ultimo modello abbiamo assistito per la prima volta nei pesci al fenomeno da noi definito "codominanza a oltranza" confermata sia dalle osservazioni etologiche che dall'analisi ormonali (cortisolo) e cellulari (fagocitosi).

Nel corso degli anni, lo studio del benessere animale ha assunto un significato sempre più importante, non solo per motivi etici, ma anche perché paradigmatico della qualità dell'ambiente e, più in generale, delle condizioni vitali in cui gli animali sono mantenuti. Opinione comune è che lo stress, di per sé, sia nocivo per gli esseri viventi. In realtà la risposta allo stress è una funzione normale ed essenziale per tutti gli organismi viventi, poiché è un meccanismo adattativo che consente, nello specifico a un pesce, di far fronte, mediante un complesso insieme di reazioni, agli stimoli destabilizzanti il normale equilibrio omeostatico del proprio organismo. Il grado di alterazione a carico dell'organismo è strettamente correlato, tuttavia, all'intensità e alla durata dello stimolo stressante, nonché al grado d'importanza che il modulo comportamentale modificato riveste per la sopravvivenza. Tra le varie risposte allo stress che i pesci possono manifestare, i cambiamenti a livello dell'attività di nuoto hanno senz'altro suscitato negli ultimi anni notevole interesse scientifico. In termini ecologici è ormai opinione diffusa che la "velocità critica di nuoto" (Ucrit) sia un buon indicatore fisiologico dell'impatto dei cambiamenti ambientali sull'organismo. Un indice di maggiore importanza ecologica, il "recovery test" si basa sull'idea che un pesce in buona salute possa ripetere, dopo un breve periodo di riposo dedicato a ristabilire le riserve di glicogeno, una prova di nuoto mantenendo invariato il proprio livello di prestazione. Anche la misura degli "elettromiogrammi" (EMG), ossia del segnale elettrico derivante dalla differenza di potenziale legata alla contrazione muscolare, si è rivelata utile per valutare il benessere animale in acquacoltura attraverso la stima della quantità di ossigeno consumata da un pesce in movimento "metabolic scope for activity", in contrapposizione con il consumo di ossigeno a livelli basali "standard metabolic rate". Un contributo significativo, in questo campo, è stato fornito dalla telemetria fisiologica che, attraverso l'impianto (interno o esterno) di un trasmettitore "wireless", consente di monitorare l'attività muscolare in pesci liberi di nuotare nel proprio ambiente. Pertanto in collaborazione con il COISPA di Bari, sono stati analizzati gli effetti dell'instaurarsi di una gerarchia sociale anche in *D. labrax* utilizzando oltre ai parametri utilizzati per *Sparus aurata* anche la telemetria fisiologica per valutare il benessere animale. La sconfitta sociale può essere un potente fattore di stress che può portare ad alterazioni drammatiche nel comportamento e nella fisiologia dei pesci. Questi risultati preliminari hanno mostrato che l'uso contemporaneo di parametri funzionali (attività muscolare), ematologici, biochimici e comportamentali consente un maggior di approfondimento lo studio dell'instaurarsi di gerarchie nei pesci. I valori di cortisolo nel plasma sono correlati con lo status sociale; infatti, erano più alti nei soggetti subordinati in accordo con i dati presenti in letteratura. Dai risultati di questo studio l'EMG sembra essere un indicatore molto sensibile del profilo comportamentale individuale, l'attività muscolare registrato dalla

prima settimana era più bassa nei campioni designati come dominante. La dominanza è qui espresso da un minor utilizzo della muscolatura rossa che indica un "costo della vita" inferiore (Carbonara et al. 2014) e una maggiore riserva di energia utile per affrontare condizioni avverse o altre esigenze biologiche (ad esempio la riproduzione, l'alimentazione, la fuga, predazione). I livelli bassi di lisozima sono indicativi della presenza di una condizione di stress cronico negli individui subordinati.

Il monitoraggio degli EMG dopo calibrazione con l'Ucrit (Carbonara et al. 2010b), ha messo in evidenza che i pesci dominanti utilizzavano, in media, il 25% di energia in meno rispetto a quelli subordinati. La concentrazione plasmatica di cortisolo era più elevata negli individui subordinati e il contenuto di emoglobina, di eritrociti e l'ematocrito seguivano lo stesso pattern, mentre la concentrazione di lisozima diminuiva. I risultati dei profili di EMG e i dati ematologici convergevano, dunque, nell'indicare che la condizione di subordine, uno dei parametri chiave nel determinare le condizioni di benessere in allevamento contribuiva a generare condizioni di stress cronico. In definitiva, l'uso complementare dell'EMG e dei profili ematologici e biochimici esplicava un maggiore potere nella formulazione di una diagnosi di stress causato. Questi dati preliminari possono essere utilizzati per studiare il benessere in condizioni di allevamento.

In letteratura è noto che l'innalzamento dei livelli di cortisolo in circolo rappresenta la risposta iniziale allo stress che se prolungato nel tempo può compromettere le difese immunitarie dell'organismo (Sapolski et al. 2000).

Nei pesci teleostei, la resistenza alle malattie è mediata dal sistema immunitario innato non-specifico. In particolare, il sistema immunitario della mucosa dei vertebrati presenta cellule e molecole (biologicamente attive) dell'immunità innata e adattiva che agiscono di concerto per proteggere l'organismo dall'attacco di agenti patogeni e / o fattori di stress (Gomez et al. 2013). Così, una componente importante del tessuto linfoide è il MALT (tessuto linfoide associato alla mucosa). Nei pesci, il MALT è presente nella pelle (chiamato SALT), nelle branchie (GIALT) e nel tratto gastrointestinale (GALT) (Subramanian et al. 2007).

Il MALT rappresenta la prima linea di difesa contro un ampio spettro di patogeni presenti nell'ambiente (Subramanian et al. 2007; Shephard, 1994). Nei pesci il muco gioca un ruolo importante (Gomez et al. 2013) in quanto rappresenta una barriera naturale, semipermeabile, chimica e biologica con funzione immunologica (Spitzer et al. 1998; Esteban, 2012). Nel muco sono presenti glicoproteine, lisozima, immunoglobuline, proteine del complemento, lectine, proteina C-reattiva, flavoenzimi, enzimi proteolitici e peptidi antimicrobici (Fletcher, 1982; Bansil et al. 1995), elementi che costituiscono l'immunità innata e acquisita. L'epidermide dei

pesci è un tessuto multifunzionale che è in costante e diretto contatto con l'ambiente acquatico. Nei pesci è stato osservato un legame tra l'inquinamento ambientale e l'insorgenza delle malattie (Perez-Vilar,1999; Tort et al. 2003). Infatti, molti ricercatori hanno dimostrato che tale collegamento potrebbe essere dovuto al deterioramento del sistema immunitario innato (Cone, 2009). Nel caso della pelle, sia la struttura che la composizione cellulare dell'epidermide possono essere influenzate da fattori di stress, come agenti patogeni o contaminanti ambientali (Nigam et al. 2012; Cole et al. 1997), tra cui metalli pesanti (Guardiola et al. 2014; Saurabh et al. 2008). Inoltre, cambiamenti nella composizione e nella quantità di muco prodotto potrebbero alterare il corretto funzionamento dell'epidermide come barriera protettiva contro i possibili rischi per l'ambiente acquatico (Saurabh et al. 2008; Fast et al. 2002). Il muco è prodotto dalle cellule mucose (dette anche cellule a calice) e la prima risposta di queste cellule a condizioni avverse (ad esempio tossine, sostanze inquinanti, microrganismi patogeni, sostanze irritanti) è un incremento della secrezione di muco (Morrissey, 1998; Yoshikawa et al. 2001). Questa ipersecrezione di muco può avere un ruolo protettivo nel ridurre la perdita passiva di ioni attraverso i tessuti danneggiati (Cho, 2002).

Ad oggi, vi è una scarsa comprensione delle interazioni tra metalli pesanti e muco secreto dalla pelle dei pesci. Il muco presenta una complessiva carica negativa e polianionica, il che significa che ha la capacità di legare metalli di grandi dimensioni, e potrebbe agire come una trappola ionica per proteggere la superficie del corpo e le membrane branchiali (Cho, 2002). L'esposizione ai metalli in acqua aumenta la produzione di muco in pelle e branchie (Parry, 1965; Quade et al. 1997), che facilita l'escrezione attraverso il muco dei contaminanti (Ingram, 1980). Il muco aiuta a tenere i metalli lontano da superfici epiteliali (Ross et al. 2000). Inoltre, il muco è un'ottima matrice per studiare gli effetti dei contaminanti sul sistema immunitario perché è facile da campionare e il campionamento non danneggia l'animale (Cone, 2009). Pertanto un altro obiettivo della presente tesi è stato quello di analizzare gli effetti dei metalli pesanti su alcuni parametri immunitari presenti nel muco di *Sparus aurata* L.

Le superfici epiteliali esterne e interne dei pesci sono coperte da uno strato di muco che fornisce protezione contro i fattori ambientali avversi come microrganismi, tossine, inquinanti, pH acido ed enzimi idrolitici (Raeder et al. 2007). Le malattie dei pesci possono derivare da un aumento del numero di batteri patogeni e dal malfunzionamento del sistema immunitario dovuto a fattori stressanti (Snieszko,1974). Pertanto, la cute è considerata l'interfaccia tra l'ambiente esterno e l'organismo. La cute e le superfici mucosali sono elementi determinanti dell'immunità mucosale e sono considerate la prima linea di difesa. Esse sono in contatto diretto con le sostanze chimiche tossiche presenti nell'acqua, con parassiti, microrganismi non patogeni e patogeni presenti

nell'ambiente acquatico (McKim et al. 2001). Nel caso del tegumento, la barriera è formata da un epitelio rivestito da uno strato di muco contenente molti tipi di molecole biologicamente attive (Ellis, 1999; Huang et al. 2011). In questo senso, il muco svolge un importante ruolo nel proteggere il tegumento dei pesci dai metalli pesanti presenti nell'ambiente acquatico (Gheorghiu et al. 2012).

Una delle prime risposte dell'epitelio della cute a situazioni stressanti è l'aumento della secrezione di muco da parte delle cellule mucose (Handy et al. 1990).

Tuttavia, gli effetti di sostanze chimiche tossiche nel muco di pesce, con l'eccezione di branchie di pesce, non sono stati ampiamente studiati. Studi condotti in orata (uno dei pesci più allevati nell'area del Mediterraneo) hanno rivelato i principali parametri immunitari innati presenti nel muco della cute che ha un ruolo centrale nell'immunità mucosale (Guardiola et al. 2014). Il sistema immunitario innato protegge l'organismo dagli agenti patogeni. Il riconoscimento dell'agente estraneo è mediato da lectine, che svolgono varie funzioni tra cui l'agglutinazione, l'immobilizzazione, l'opsonizzazione e l'uccisione di potenziali patogeni (Vasta et al. 2004). Molti di questi organismi utilizzano proteine che legano zuccheri come le lectine per riconoscere e legarsi ai residui carbossi-terminali dell'ospite (Wang et al. 2013; Imberty et al. 2008). I residui carbossi-terminali testati in questo studio sono presenti nei mammiferi e anche sono stati osservati nelle superfici mucose dei pesci come la pelle, l'apparato digerente e le branchie (Tasumi et al. 2002; Estensoro et al. 2013).

In questo studio, l'emoagglutinazione di eritrociti di coniglio è diminuita in campioni di muco esposti ai metalli pesanti per breve tempo di esposizione (2 e 10 giorni), mentre dopo 30 giorni di esposizione è stata osservata una diminuzione dell'agglutinazione in tutti i casi. Ciò indica che le lectine presenti nel muco sono state inattivate dai metalli pesanti. Inoltre, i residui carbossi-terminali presenti nel muco sono l'acido N-acetilneuraminico > glucosio> N-acetilglucosamina> N-acetilgalattosamina> galattosio> fucosio.

Confrontando l'esposizione a metalli, un aumento dei carboidrati è stato osservato in tutti i pesci esposti ai metalli pesanti per 30 giorni. L'aumento di acido N-acetylneuraminiccialico, può essere associata a fenomeni di prevenzione delle infezioni quindi può essere una risposta all'esposizione a questi metalli. In modo analogo, Nacetyl-galactosamine è in relazione con la corretta comunicazione cellula-cellula, che è importante per entrambi i processi funzionali e le malattie sistemiche come l'infiammazione e l'immunità (Frederick et al. 2005). Inoltre, un aumento di PNA e WGA era osservato anche dopo breve tempo (2 giorni) nei pesci esposti a Cd e Hg, rispettivamente, mentre si è osservato una diminuzione statisticamente significativa di acido N-acetilneuraminico dopo 10 giorni di esposizione all'arsenico. Questo è stato confermato

in uno studio precedente, dove si è osservato un notevole diminuzione dell'espressione di acido sialico nel tratto digestivo di *S. aurata* parassitata da *Enteromyxum leei* (Redondo et al. 2010). Così, l'acido sialico potrebbe proteggere inizialmente l'intestino di questo pesce dall'invasione di parassiti, tuttavia, una drastica riduzione nell'espressione di acido N-acetilneuraminico è collegata alla progressione dell'infezione. Pertanto, sono necessari ulteriori studi per la caratterizzazione dei carboidrati presenti nel muco, al fine di comprendere il loro ruolo nella difesa contro agenti patogeni, nonché, se la loro presenza è correlata alla resistenza alle malattie o meno.

Per quanto riguarda le IgM, esse giocano un ruolo fondamentale nel proteggere i pesci da agenti estranei (Palaksha et al. 2008; Sinyakov et al. 2002). È risaputo che nel muco di pesce sono presenti fattori immunitari adattativi e innati. I pesci che vivono in acque inquinate sono più soggetti ad aumento della prevalenza di malattie, pertanto rispondono a batteri patogeni producendo anticorpi sierici (Robohm et al. 1979).

In accordo con ciò, nel presente studio, la concentrazione di IgM nel muco di pesci esposti era diminuita dopo un breve periodo di esposizione (2 giorni), mentre è aumentata in tutti gli altri gruppi sperimentali rispetto al controllo. Inoltre i campioni di muco esposti al mercurio per 30 giorni hanno mostrato un aumento significativo dei livelli di IgM.

Inoltre, lisozima, fosfatasi alcalina, esterasi, perossidasi, ceruloplasmina ossidasi, proteasi e antiproteasi sono stati misurati nel presente studio e in generale queste attività hanno subito un incremento. I livelli basali di lisozima e proteasi nel muco proteggono gli organismi da batteri che vivono nello stesso ambiente (Stabili et al. 2009; Hjelmeland et al. 1983). Le proteasi sono essenziali per l'attivazione dell'immunità innata e adattiva e possono svolgere un ruolo protettivo contro gli agenti patogeni.

In questo studio, le attività lisozimatica e proteasica hanno mostrato un aumento in tutti i pesci esposti a Hg, e nei pesci esposti a As e Cd per 10 giorni mentre le attività di questi enzimi sono diminuite in campioni di muco esposti a tali metalli per 30 giorni. Al contrario, l'attività antiproteasica ha mostrato un aumento nella maggior parte dei campioni esposti (tranne dopo 10 giorni). È interessante notare che la produzione di antiproteasi è stata negativamente correlata con l'attività proteasica nei pesci esposti a As e Cd, forse per compensare le variazioni dei livelli di proteasi attive nel muco. Altri enzimi studiati sono stati la fosfatasi alcalina, l'esterasi e la perossidasi che sono presenti nel muco, ma il loro ruolo nella immunità mucosale non è ben chiaro (Nigamet al. 2014).

E' stato dimostrato che la fosfatasi alcalina agisce come un agente antibatterico nel muco, grazie alla sua attività idrolitica, e che aumenta nei pesci in seguito a stress fisico o chimico,

immunostimolazione, infezioni batteriche e parassitarie (Ross et al. 2000; Sheikhzadeh et al. 2012; Rai et al. 1991). Nel nostro studio, l'attività della fosfatasi alcalina è stata ridotta dopo esposizione per lungo tempo ai metalli, mentre l'attività esterasi è stata aumentata in tutti i pesci esposti indipendentemente dal tempo di esposizione.

Inoltre, la perossidasi è un importante agente microbica (Guardiola et al. 2014). L'attività perossidasi nel nostro studio, incrementava soprattutto nei campioni esposti al Hg. L'incremento in questi enzimi potrebbe suggerire un accumulo di "rodlet cells" dovuto a situazioni di stress e conseguentemente al rilascio del loro contenuto nel muco. Per quanto riguarda l'ultimo enzima analizzato, la ceruloplasmina, essa è una proteina antiossidante della fase acuta, è rilasciata in risposta alle infezioni e infiammazioni giocando un ruolo importante come agente antinfiammatorio, trasportatore di rame dagli epatociti ad altri tessuti, regolatore per la mobilitazione del ferro epatico così come un eliminatore di radicali liberi e superossidi (Cousins, 1985; Arnaud et al. 1988). Le proteine che legano i metalli come la ceruloplasmina hanno funzioni importanti nella detossificazione da metalli tossici, e anche giocano un ruolo importante nell'omeostasi e nel metabolismo di metalli essenziali (Kelly et al. 1998). Inoltre, questo enzima svolge varie funzioni legate alla difesa limitando la dispersione di agenti infettivi, riparando danni ai tessuti, uccidendo i microbi e altri potenziali patogeni (Dautremepuits et al. 2004). Ugualmente alla perossidasi, l'attività di questo enzima è stata ridotta dopo lungo tempo di esposizione a As e Cd, mentre tale attività è stata aumentata dopo esposizione a Hg. Analogamente, i livelli di ceruloplasmina erano elevati dopo l'infezione da agenti patogeni in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e nella carpa (*Cyprinus carpio*) (Perrier et al. 1974; Siwicki et al. 1986).

Pertanto, la maggior parte degli enzimi analizzati sono stati influenzati dall'esposizione ai metalli, quindi questi potrebbero essere utilizzati come bioindicatori e servire come indicatori di contaminazione. La prevenzione della colonizzazione da parte di parassiti acquatici, batteri e funghi è mediata sia da componenti del sistema immunitario (IgM, lisozima, proteasi, etc.) sia da peptidi e polipeptidi antimicrobici. Molti ricercatori hanno studiato l'attività antimicrobica di estratti di muco della pelle in numerose specie di pesci, rivelando una forte attività anti-batterica e anti-funginea nei confronti di una vasta gamma di agenti patogeni, microbici e funghi nei (Ebran et al. 2000; Loganathan et al. 2011). E' ormai ben noto che il muco epidermico dei pesci gioca un ruolo significativo nella protezione meccanica e fisiologica dei pesci contro condizioni ambientali sfavorevoli e infezioni da patogeni (Ebran et al. 2000).

I nostri risultati hanno mostrato lievi differenze nella crescita batterica dipendente dall'esposizione ai metalli, al tempo di esposizione o ai batteri. Tuttavia, abbiamo potuto

osservare che generalmente la crescita dei batteri è stata ridotta in campioni di muco esposti al mercurio. Diversi studi hanno riportato minore resistenza dei pesci contro batteri dopo l'esposizione ai contaminanti (Carlson et al. 2002; Karami et al. 2012).

Inoltre, l'analisi immunoblotting ha rivelato la presenza di una lectina-legante il fucosio, precedentemente identificati nel siero di *Dicentrarchus labrax* (DIFBL) (Salerno et al. 2009), nel muco di pesci esposti ai metalli.

In questo lavoro, si è riscontrato che i campioni di muco di orata esposti ai metalli pesanti hanno mostrato piccoli cambiamenti nei profili carbossi-terminali e la maggior parte delle risposte immunitarie studiate hanno mostrato un incremento principalmente dopo esposizione a Hg.

Inoltre, alcune differenze nei profili proteici determinati da SDS-PAGE e dalla cromatografia in fase inversa sono attribuibili all'esposizione a metalli pesanti, però se queste differenze siano legate alle funzioni immunitarie meritano ulteriore caratterizzazione. Pertanto, un'ulteriore caratterizzazione degli enzimi presenti nel muco dei pesci e il loro ruolo preciso nella immunità mucosale sarebbe necessaria per meglio comprendere gli effetti di alcuni contaminanti nel sistema immunitario innato dei pesci.

Questo studio è il primo che valuta gli effetti dell'esposizione ai metalli pesanti attraverso la valutazione dei parametri immunitari presente nel muco di *Sparus aurata*. Questi dati potrebbero trovare ulteriori conferme analizzando anche il muco di spicole esposte a metalli pesanti.

Recentemente è stato visto che le diete integrate con specifici nutrienti (aminoacidi, acidi grassi essenziali (FAS), vitamine o minerali) con dosi appropriate possono sia migliorare le condizioni di salute e la resistenza alle malattie sia ridurre l'utilizzo di agenti chemioterapici (soprattutto antibiotici e fattori di crescita) in allevamento.

Mangimi poveri di alcuni nutrienti possono influire non solo sulla crescita, ma possono aumentare la suscettibilità alle malattie, indurre la comparsa di segni di carenza, tra cui anche il manifestarsi di comportamenti alterati e cambiamenti patologici. Diete squilibrate possono anche indurre interazioni negative tra i nutrienti che provocando sintomi simili a quelli causati dalla carenza di sostanze nutritive. In condizioni di allevamento intensivo, i pesci sono soggetti a un aumento dello stress dovuto sia a fattori ambientali (qualità dell'acqua, ipossia...) sia sanitari (parassiti e malattie infettive). Tutti questi fattori hanno impatti negativi sul benessere dei pesci allevati, con conseguenti perdite economiche. Nonostante le buone pratiche di gestione contribuiscano a ridurre gli effetti stressanti, in condizioni di allevamento lo stress da sovraffollamento è sempre presente. Quindi un'alimentazione adeguata è fondamentale per evitare segni di carenza, mantenere adeguate prestazioni degli animali (Trichet 2010).

Per ottimizzare la nutrizione e prevenire le malattie si sta cercando di produrre diete con prodotti

naturali (Kiron, 2012; Oliva-Teles, 2012) convenienti sia per il produttore che per il consumatore senza alterare il valore nutrizionale del pesce e senza provocare effetti indesiderati sulla salute umana. In questo contesto, il rafforzamento dei meccanismi di difesa del pesce attraverso la somministrazione profilattica di immunostimolanti, probiotici, prebiotici e altre sostanze naturali è uno degli approcci più promettenti per migliorare la redditività dell'acquacoltura (Nayak, 2010). Questi ingredienti, che possono essere di origine molto diversa, possono migliorare la risposta immunitaria dei pesci, conferire una protezione contro vari agenti patogeni e ridurre al minimo il rischio associato all'uso di sostanze chimiche (Magnadottir, 2010).

Un altro obiettivo principale del presente studio è stato quello di valutare l'effetto della somministrazione di vitamina D₃, per un breve periodo, 2 e 4 settimane, su diversi parametri immunitari, sull'istologia intestinale e sull'espressione dei geni immuno-correlati di spigola (*D. labrax L.*), una delle specie ittiche più importanti del settore dell'acquacoltura mediterranea.

La vitamina D è uno steroide e svolge un ruolo importante nel metabolismo del calcio e fosforo e nello sviluppo delle ossa, ed è un nutriente essenziale per la normale crescita degli animali acquatici (Li, 1994). Ci sono molti studi sulla sintesi e gli effetti della vitamina D (Barnett et al. 1982; O'Connell et al. 1995). A differenza dei mammiferi, i pesci non possono produrre vitamina D₃ dalla luce del sole, e acquisiscono vitamina D₃ solo dal cibo (Darias et al. 2011). Pertanto, l'aggiunta di vitamina D alla dieta in acquacoltura gioca un ruolo importante nella crescita dei pesci. Diversi gruppi di ricerca hanno iniziato a studiare gli effetti della vitamina D sulla funzione immunitaria negli animali acquatici (Cerezuela et al. 2009). Questo studio ha lo scopo di incrementare le conoscenze sull'effetto di sostanze nutritive sul sistema immunitario per migliorare il benessere animale e aumentare la resistenza alle malattie nei pesci. L'utilizzo di immunostimolanti in acquacoltura è una strategia, non solo per migliorare le risposte di difesa contro le avversità a cui i pesci sono esposti, ma anche per trovare alternative ai chemioterapici e agli antibiotici, agenti utilizzati per il trattamento di malattie dei pesci (Meena et al. 2013). È noto che il sistema immunitario innato dei pesci può essere rafforzato da diversi immunostimolanti tra cui ricordiamo il levamisole (Bich Hang et al. 2014), glucano (Meena et al. 2013) glucano più vitamina C (Verlhac et al. 1996), lievito RNA (Sakai 1999), lipopolisaccaride (Bich Hang et al. 2014), l'ormone della crescita (Shved et al. 2011), zeranolo (Keles et al. 2002) e chitosan (Quin et al. 2014). Questi immunostimolanti, estratti sintetici o biologici, migliorano il sistema immunitario aumentando la produzione cellulare e umorale (Fujimoto et al 2013; Sado et al 2013). Studi sul sistema immunitario dei pesci indicano che gli immunostimolanti possono attivare le risposte immunitarie anche negli stati immunosoppressivi causati da molte forme di tossine o situazioni di stress, e quindi invertire gli effetti deleteri

mediati da stress (Sahoo et al 2003; Gannam et al. 2008). In questo lavoro, abbiamo dimostrato che la somministrazione di vD₃ influenza alcuni parametri biochimici e immunologici di *D. labrax*, una delle specie ittiche più importanti nel settore dell'acquacoltura mediterranea. In letteratura è noto che nei pesci la modulazione di alcuni parametri del sistema immune innato dipende sia dal tempo di dosaggio che dalla concentrazione (Cerezuela et al. 2008). In questo studio, le attività proteasiche e antiproteasiche del siero non mostravano differenze significative nei pesci alimentati con l'aggiunta di vD₃ alle diverse concentrazioni. Non vi è alcuna influenza diretta di vD₃ nelle attività probabilmente perché i tempi di trattamento sono brevi. Anche l'attività emolitica del complemento e i livelli di IgM nel siero non hanno mostrato differenze significative nei campioni alimentati con l'aggiunta di vD₃ rispetto al controllo, mentre i livelli sierici di perossidasi hanno mostrato un aumentodose-dipendente statisticamente significativo dopo 4 settimane di somministrazione. Questi risultati suggeriscono che vD₃ esercita la sua azione sui leucociti che rilasciano perossidasi nel siero (Reschly et al. 2007). Inoltre, l'attività fagocitica dei leucociti della cavità peritoneale, ha mostrato un aumento statisticamente significativo nei pesci alimentati con la maggiore concentrazione di VD₃ (37.500 U kg⁻¹) già a partire dalla seconda settimana di trattamento. Inoltre, è stato osservato un aumento statisticamente significativo nella fagocitosi nei pesci che sono stati alimentati con le due più alte concentrazioni vD₃ (18.750 e 37.500 U kg⁻¹) dopo 4 settimane di trattamento. I fagociti dei pesci sono considerati una delle componenti più importanti del sistema di difesa non specifico e svolgono un ruolo importante nella funzione immunitaria (Clem et al. 1985). La scoperta che la maggior parte delle cellule del sistema immunitario, tra cui i macrofagi, linfociti B e T, i neutrofili e le cellule dendritiche (DC) possiedono il recettore per la vitamina D (VDR) (Provvedini et al 1983; Baeke et al 2010), ha spinto i ricercatori a investigare sulle possibili funzioni della vitamina D a livello del sistema immunitario (Mathieu et al. 2002). Oltre agli effetti diretti sulla attivazione delle cellule T,1, la vitamina D modula le risposte dei macrofagi, impedendo loro di rilasciare citochine infiammatorie e chemochine più di quanto richiesto (Alappat et al. 2010). Questi risultati sono in accordo anche con alcuni studi in vitro condotti nei mammiferi, compreso l'uomo, in cui VD₃ incrementa la chemiotassi, la fagocitosi e le funzioni citotossiche (Bar-Shavit et al 1983; Yamamoto 2004). La vitamina D₃ attenua anomalie della funzione immunitaria, indicando un suo importante ruolo immunoregolatorio nel meccanismo di eliminazione degli antigeni da parte dei granulociti e dei monociti (Labudzyns'kyi et al. 2014). Pesci trattati con immunostimolanti come β-glucano (Meena et al. 2013), lattoferrina (Sakai et al. 1993), levamisole (Kajita et al. 1990), FK-565 (Kitao et al. 1987), la chitina (Sakai et al. 1992), EF203 (Yoshida et al. 1993) solitamente mostrano un incremento dell'attività di fagocitosi. Per valutare

se il trattamento con la vitamina D influenzi l'espressione dei geni immuno-correlati, è stata valutata l'espressione di lectine, di peptidi antimicrobici e di una citochina proinfiammatoria in HK e nell'intestino dei pesci con real-time PCR. Nel presente studio, l'espressione genica in HK è stata significativamente influenzata dalle diete sperimentali rispetto al gruppo di controllo. Così, si è osservato un aumento significativo dell'espressione di *fb1* e *rbl* nei pesci alimentati con alta concentrazione di vitamina dopo 4 settimane. Le lectine sono proteine che legano gli zuccheri ampiamente distribuiti nei taxa eucarioti e svolgono un ruolo importante nella risposta immunitaria di invertebrati e vertebrati sia riconoscendo glucani sui potenziali patogeni sia attraverso il legame ai carboidrati sulla superficie delle cellule immunocompetenti (Matsushita et al. 1996; Vasta 2009). RBL riconoscere vari tipi di agenti patogeni a livello del sito infiammatorio e facilita la loro fagocitosi legandosi sulla superficie dei leucociti (Cammarata et al. 2014). Nell'intestino, c'era un up-regulation statisticamente significativo di gene epcidina nei pesci alimentati con la minore concentrazione di VD₃ dopo 2 settimane e branzino alimentato con le due concentrazioni più alte di diete VD₃-integrate (18.750 e 37.500 U kg⁻¹) dopo 4 settimane di esperimento. Lo studio dimostra che la somministrazione VD₃ determina il tempo di effetti e dose-dipendenti. Il gene epcidina è ampiamente espresso in vari pesci, suggerendo che questo peptide antimicrobico è una componente molto importante del sistema immunitario innato (Wang et al. 2009). La funzione di epcidina nel pesce non è ancora completamente noto. L'epcidina è una piccola proteina ricca di cisteina con attività antimicrobica che svolge un ruolo importante nell'omeostasi del ferro e nella difesa contro le infezioni, e può essere possibile sviluppare come un farmaco anti-infettivi (Rodrigues et al. 2006; Hsieh et al. 2010). Pertanto, l'alimentazione con l'aggiunta di vitamina D per 2 e 4 settimane ha prodotto una stimolazione di alcuni parametri dell'immunità innata, come la fagocitosi e i livelli di perossidasi nel siero; inoltre la vitamina D influenza l'espressione di alcuni geni correlati con la risposta immunitaria. Quindi, questi risultati, in accordo anche con gli studi condotti su *Sparus aurata* (Cerezuela et al. 2008), suggeriscono che vD₃ può essere considerata un immunostimolante di grande interesse se usato come additivo nell'alimentazione dei pesci di allevamento. Sono necessari ulteriori studi per comprendere l'effetto della vitamina sul sistema immunitario adattativo dei pesci e anche sulla resistenza alle malattie.

Considerazioni conclusive

Lo studio del benessere animale nella presente tesi è stato effettuato attraverso l'utilizzo di approcci innovativi come: lo studio del comportamento in condizioni di stress sociale; la valutazione dei parametri immunitari presenti nel muco in presenza di sostanze inquinanti e la valutazione degli effetti immunostimolanti della vitamina D₃ in pesci teleostei.

In particolare:

1. in *Sparus aurata* e in *Dicentrarchus labrax* lo stato sociale può essere considerato un potente fattore di stress alla pari di altri fattori stressanti, in quanto può portare all'alterazione dei parametri fisiologici e comportamentali dei pesci. La gerarchia sociale determina la formazione di due gruppi di esemplari con caratteristiche fisiologiche e comportamentali distinte ovvero i dominanti e i subordinati. Inoltre variazione dell'aggressione e i cambiamenti fisiologici possono essere usati come indicatori di benessere;
2. l'esposizione ai metalli pesanti è stata valutata in campioni di muco di *Sparus aurata* evidenziando piccole variazioni nei patterns di glicosilazione carbosilica e nei profili proteici e variazioni significative per la maggior parte delle attività enzimatiche correlate con la risposta immunitaria innata. Pertanto, alcuni di questi parametri mucosali potrebbero essere utilizzati come potenziali biomarcatori per la tossicologia nei pesci;
3. il rafforzamento del sistema immunitario può essere ottenuto attraverso la somministrazione nella dieta di vitamina D₃ in grado di modulare alcuni parametri immunitari innati di *D. labrax*. Questa vitamina potrebbe essere considerata un ottimo immunostimolante se usato come additivo negli impianti di allevamento.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare alcune persone per il loro fondamentale contributo, che ha reso possibile la stesura di questo lavoro di tesi.

La Dottoressa Mirella Vazzana (Università degli Studi di Palermo) per il sostegno scientifico e personale durante tutto il triennio di Dottorato.

Il gruppo di lavoro coordinato dal Prof. Matteo Cammarata dell'Università degli Studi di Palermo per l'interessante scambio di sapere e per avermi dato la possibilità di svolgere la mia attività di ricerca.

Il gruppo di lavoro coordinato dalla Prof.ssa M.A. Esteban dell'Università di Murcia (Spagna) per la fondamentale collaborazione nell'ampliare e completare il mio lavoro.

Il gruppo di lavoro coordinato dal Dott. Giuseppe Lembo della Stazione Sperimentale per lo Studio delle Risorse del Mare (COISPA) di Bari per il supporto tecnico-scientifico fornito.

Appendice

Produzione scientifica

Publicazioni:

- F. A. Guardiola, M. Dioguardi, M. G. Parisi, M. R. Trapani, J. Meseguer, A. Cuesta, M. Cammarata, M. A. Esteban. Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish & Shellfish Immunology 45 (2015) 112-123.
- M. Dioguardi, M. Vazzana, I. Vazzana, D. Accardi, M. Cammarata. The social hierarchy affects stress responses and phagocytic activity in subordinates β and γ in the sea bream (*Sparus aurata*). Fish Physiology and Biochemistry Submitted.
- M. Dioguardi, F. A. Guardiola, M. Vazzana, A. Cuesta, M. A. Esteban, M. Cammarata. Vitamin D₃ affect innate immune status of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture Nutrition Submitted.

Abstract e poster presentati presso congressi:

- M. Cammarata, M. Vazzana, D. Accardi, M. Dioguardi, N. Parrinello. Seabream (*Sparus aurata*) hierarchy among alfa and beta subordinates and dominant interplay affects stress responses and phagocytic activity by peritoneal cavity cells. First International Conference of Fish and Shellfish Immunology June 25-28, 2013 Vigo (Spain).
- M. Dioguardi, F.A. Guardiola, M. Vazzana, A. Cuesta, M.A. Esteban, M. Cammarata. Effects of dietary vitamin D₃ administration on innate immune response of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). XV Incontro Scientifico della SIICS Ferrara, 12-14 Febbraio 2014.
- M. Dioguardi, M. Vazzana, M. Cammarata. Seabream (*Sparus aurata*) hierarchies of social behavior affects stress responses and immunity. Congresso Scientifico: Ricerca di base, interdisciplinare e traslazionale in ambito Biologico e Biotecnologico, Giugno 26-27, 2014 Palermo.
- F. A. Guardiola, M. Dioguardi, M. G. Parisi, M. R. Trapani, J. Meseguer, A. Cuesta, M.

Cammarata, M. A. Esteban. Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*). 13° ISDCI Congress, 28 Jule-3 July 2015, in Murcia, Spain.

- Y. Valero, M. Arizcun, M.R. Trapani, M. Dioguardi, M. Cammarata, M.A. Esteban, A. Cuesta, E. Chaves-Pozo. Identification of antimicrobial peptides in the gonad of European sea bass males and females. 13° ISDCI Congress, 28 Jule-3 July 2015, in Murcia, Spain.
- P. Carbonara, G. Lembo, M.T. Spedicato, W. Zupa, M. Dioguardi, M. Vazzana, M. Cammarata. Integrating stress coping styles and physiological profiles to increase knowledge on behavior of reared sea bass. 3rd ICFT-Halifax (Canada), 13-17 Luglio 2015.

Bibliografia

Bibliografia

Abbas A, Lichman A, Pober J. General properties of immune responses. In: Abbas A, Lichman A, Pober J (Eds.). *Cellular and Molecular Immunology*, McGraw-Hill-American Court, Spain: 2002, p. 1–16.

Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W., Li, H.(2007). Effects of dietary beta -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish Immunology* 22, 394–402.

Alappat, L., Valerio, M., Awad, A.B. (2010). Effect of vitamin D and β -sitosterol on immune function of macrophages. *Int Immunopharmacol* 10, 1390-1396.

Alexander JB, Ingram GA. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annu Rev Fish Dis* 1992; 2:249–79.

Ashley P.J. (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 104, 199–235.

Alsop D.H., Wood C.M. (1997). The interactive effects of feeding and exercise on oxygen consumption, swimming performance and protein usage in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), «*The Journal of Experimental Biology*», 200, pp. 2337-2346.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T. (2004). Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish and Shellfish Immunology* 16, 527–537.

Anderson DP, Zeeman MG. (1996). Immunotoxicology in fish. In: Rand GM (Ed.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, New York., p. 371–402.

Arabadzisz D., Rochellys Diaz-Heijt, Knuesel I., Weber E., Pilloud S. Dettling A.C., Feldon J., Law A.J., Harrison P.J., and Pryce C.R. (2009). Primate Early Life Stress Leads to Long-Term Mild Hippocampal Decreases in Corticosteroid Receptor Expression. *Rev Fish Sci*; 10, 1-38.

Arkoosh M, Casillas E, Clemons E, Huffman P, Kagley A, Collier T, et al. (2000). Increased susceptibility of juvenile chinook salmon to infectious disease after exposure to chlorinated and aromatic compounds found in contaminated urban estuaries. *Mar Environ Res* 50, 470–1.

Arnaud P, Gianazza E, Miribel L. (1988). Ceruloplasmin. *Methods Enzym*; 163: 441– 452.

Arranz, L., de Vicente, A., Munoz, M., & De la Fuente, M. (2009). Impaired immune function in a homeless population with stress-related disorders. *Neuroimmunomodulation* 16, 251-260.

Auperin B, Geslin M (2008). Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content. *Gen Comp Endocr* 158(3): 234-243

Austin, B., Austin, D.A., (2007). *Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish*, 4th ed. Springer-Praxis, Chichester, UK.

Avitsur R, Stark JL, Dhabhar FS, Sheridan JF. (2002). Social stress alters splenocyte phenotype and function. *J Neuroimmunol* 132, 66–71.

Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C and Mathieu C(2010). Vitamin D: modulator of the immune system, *Curr Opin Pharmacol*, 10:1-15.

Bailey M. T., Engler H., Powell N. D., Padgett D. A., & Sheridan J. F. (2007). Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like receptor-dependent pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293, 1180-1190.

Bailey M.T., Kierstein S., Sharma S., Spaitis M., Steven G. Kinsey S.G., Tliba O., Sheridan J.F., Panettieri R.A., Haczku A. (2009). Social Stress Enhances Allergen-Induced Airway Inflammation in Mice and Inhibits Corticosteroid Responsiveness of Cytokine Production. *The Journal of Immunology* 182, 7888–7896.

Bansil R, Stanley E, LaMont J. Mucin biophysics. *Annu Rev Physiol* 1995;57: 635–57.

Barnett V S, Cho C Y, Slinger S J. (1982). Relative biopotency of dietary ergocalciferol and cholecalciferol and the role of and requirement for vitamin D in rainbow trout (*Salmon gairdneri*). *Journal of Nutrition* 112, 2011-2019.

Barnum C. J., Blandino P, Jr., Deak T. (2008). Social status modulates basal IL-1 concentrations in the hypothalamus of pair-housed rats and influences certain features of stress reactivity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22, 517-527.

Bar-Shavit, Z., Noff, D., Edelstein, S., Meyer, M., Shibolet, S., Goldman, R. (1983). 1,25 dihydroxyvitamin D₃ and the regulation of macrophage function. *Calcif Tissue Int* 33, 673–6.

Barton B. A & Iwama G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effect of corticosteroids. *Ann Rev Fish Dis*; 1, 3-26.

Beaman JR, Finch R, Gardner H, Hoffmann F, Rosencrance A, Zelikoff JT. (1999). Mammalian immunoassays for predicting the toxicity of malathion in a laboratory fish model. *J Toxicol Environ Health A*; 56: 523–42.

Beamish F.W.H. (1978). Swimming Capacity, in *Fish Physiology*, a cura di Hoar W.S., Randall D.J., New York, Academic Press, pp. 101-187.

Beitia G., Garmendia L., Azpiroz A., Vegas O., Brain P. F., Arregi A. (2005). Time dependent behavioral, neurochemical, and immune consequences of repeated experiences of social defeat stress in male mice and the ameliorative effects of fluoxetine. *Brain, Behavior, and Immunity*, 19, 530-539.

Besedovsky H. O., Del Rey A. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and release by the pituitary-interrenal axis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Endocrinol*; 120, 135-142.

Bich Hang, B.T., Phuong, N.T., Kestemont, P. (2014). Can immunostimulants efficiently replace antibiotic in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) against bacterial infection by

Edwardsiella ictaluri? Fish Shellfish Immunol 40, 556-562.

Blanchard D.C., Sakai R.R., McEwen B., Weiss S.M., Blanchard R.J (1993). Subordination stress: behavioural, brain and neuroendocrine correlates. Behav. Brain Res. 58, 113-121.

Blanchard D.C., Spencer R.L., Weiss S.M., Blanchard R.J., McEwen B., and Sakai R.R. (1995). Visible burrow system as a model of chronic social stress: Behavioural and neuroendocrine correlates. Psychoneuroendocrinology 20, 117-134.

Blanchard RJ, Hebert M, Sakai RR, Mckittrick C, Henrie A, Yudko E, McEwen B, Blanchard DC (1999). Chronic social stress: changes in the behavioral and physiological indices of emotion. Aggressive Behav 24: 307-321.

Bourmaud CAF., Romestand B., Bouix G. (1995). Isolation and partial characterization of IgM- like sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758). Aquaculture 132, 53-58.

Bradford M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248–54.

Brambell F.W.R. (1965). “Report of the Technical Committee to Enquire into the Welfare of Animals Kept under Intensive Livestock Husbandry Systems. Her Majesty’s Stationary Office, London UK, Cmnd. 2836.

Brandtzaeg P. (2009). Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. Scand J Immunol; 70: 505–15.

Brattgjerd, S., Evensen, O., Lauve, A., 1994. Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophages in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., as evaluated by in vitro hydrogen peroxide production and phagocytic capacity. Immunology 83, 288–294.

Brett J.R. (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon, «Journal of Fisheries Research », 21, pp. 1183-1226.

Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish and Shellfish Immunology 19, 457–472.

Bridger C.J., Booth R.K. (2003). The effects of biotelemetry transmitter presence and attachment procedures on fish physiology and behaviour, «Reviews in Fisheries Science», 11, pp. 13-34.

Broom D. M. (1986). “Indicators of poor welfare”. British Veterinary Journal 142: 524-526. Citato da Fraser e Boom (1997).

Brown GD1, Gordon S. (2003). Fungal beta-glucans and mammalian immunity. Immunity 19(3):311-5.

Burgetz I.J., Rojas-Vargas A., Hinch S.G., Randall D.J. (1998). Initial recruitment of anaerobic metabolism during sub-maximal swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), «The Journal of Experimental Biology», 201, pp. 2711-2721.

Cabello F.C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environment Microbiol.* 8, 1137-1144.

Cammarata M. & Arizza V. (1994). Method for phagocytosis fluorescence quenching in vitro assay for hemocytes in tunicates. *Animal Biology* 3, 173-174.

Cammarata M., Vazzana M., Cervello M., Arizza V., Parrinello N. (2000). Spontaneous cytotoxic activity of eosinophilic granule cells separated from the normal peritoneal cavity of *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 143-154.

Cammarata M., Vazzana M., Chinnici C., Parrinello N. (2001). A serum fucoselectin isolated and characterized from sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Biochim. Biophys Acta* 1528, 196-202.

Cammarata, M., Vazzana, M., Accardi, D. & Parrinello, N. (2012). Seabream (*Sparus aurata*) long-term dominant-subordinate interplay affects phagocytosis by peritoneal cavity cells. *Brain Behavior and Immunity* 26, 580–587.

Cammarata M., Parisi M.G., Benenati G., Vasta G. R., Parrinello N. (2014). A rhamnose-binding lectin from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) plasma agglutinates and opsonizes pathogenic bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 44, 332–340

Carbonara P., Corsi I., Focardi S., Lembo G., Rochira S., Scolamacchia M., Spedicato M.T., McKinley R.S. (2010a). The effects of stress induced by cortisol administration on the repeatability of swimming performance tests in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), «*Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* », 43 (4), pp. 283-296.

Carbonara P., Scolamacchia M., Spedicato M. T., Zupa W., McKinley R. S., Lembo G (2014). Muscle activity as a key indicator for welfare in farmed European sea bass. *Aquaculture Research*.doi:10.1111/are.12369.

Carbonara P., Scolamacchia M., Spedicato M.T., Lembo G., Zupa W., McKinley R.S. (2006). Swimming performances as a well-being indicator of reared sea-bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Preliminary results, «*Biologia Marina Mediterranea*», 13, pp. 488-491.

Carbonara P., Scolamacchia M., Spedicato M.T., Zupa W., McKinley R.S., Lembo G. (2010b). Muscle activity as a key indicator of welfare in farmed European sea bass, «*Fisheries Management and Ecology*», in press.

Carlson E, Zelikoff J. (2008). The immune system of fish: A target organ of toxicity. In: Di Giulio R, Hinton D (Eds.). *The Toxicology of Fishes*, New York: p. 489–530.

Carlson EA, Li Y, Zelikoff JT. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquat Toxicol* 2002; 56: 289–301.

Cerezuela R., Cuesta A., Meseguer J. & Esteban M.A. (2009). Effects of dietary vitamin D-3 administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 26, 243–248.

Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A. (2008). Effects of dietary vitamin D3 administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) *Fish Shellfish Immun* 26, 243–245.

Chandroo K.P., Cooke S.J., Mckinley R.S., Moccia R.D. (2005). Use of electromyogram telemetry to assess the behavioural and energetic responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to transportation stress, «*Aquaculture Research*», 36, pp. 1226-1238.

Chatelier A., McKenzie D.J., Claireux G. (2005). Effects of changes in water salinity upon exercise and cardiac performance in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), «*Marine Biology*», 147, pp. 855-862.

Chen CC, Fernald RD (2011). Visual Information Alone Changes Behavior and Physiology during Social Interactions in a Cichlid Fish (*Astatotilapia burtoni*) *PLoS ONE* 6(5): e20313.

Cheng, Z., Buentello, A., Gatlin, D.M., (2011). Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 143–147.

Cho JH, Park IY, Kim HS, Lee WT, Kim MS, Kim SC. Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2002; 16: 429–31.

Cho JH, Park IY, Kim MS, Kim SC. Matrix metalloproteinase 2 is involved in the regulation of the antimicrobial peptide parasin I production in catfish skin mucosa. *FEBS Lett* 2002;531: 459–63.

Chong Y.G., Chao T.M. (1969). *Common Diseases in Marine Finfish*. Primary Production Department, Republic of Singapore.

Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532–7.

Chrousos GP, McCarty R, Pacak K, Cizza G, Sternberg E, Gold PW, Kvetnabsky R (1995). *Stress: Basic Mechanisms and Clinical Implications*. *Ann NY Acad Sci* 771, 1-742.

Chung S. and Secombes C.J. (1988). Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comparative Biochemistry and Physiology* 89 B, 539-544.

Cleland GB, McElroy PJ, Sonstegard RA. (1988). The effect of dietary exposure to Aroclor 1254 and/or mirex on humoral immune expression of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquat Toxicol* 2, 141–6.

Clem, L.W., Sizemore, R.C., Ellsaesser, C.F., Miller, N.W. (1985). Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Dev Comp Immunol* 9, 803-809.

Clement T.S., Parikh, V. Schrupf M., Fernald R. D. (2005). Behavioral coping strategies in a cichlid fish: the role of social status and acute stress response in direct and displaced aggression. *Hormones and Behavior* 47, 336– 342.

- Cole AM, Weis P, Diamond G.** Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem* 1997; 272:12008–13.
- Cone R. (2009).** Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev*; 61:75–85.
- Cooke S.J., Chandroo K.P., Beddow T.A., Moccia R.D., McKinley R.S. (2000).** Swimming activity and energetic expenditure of captive rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), estimated by electromyogram telemetry, «*Aquaculture Research*», 31, pp. 495-506.
- Cousins RJ. (1985).** Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* 65, 238–309.
- Csermely P. (1998).** *Stress of Life: From Molecules to Man*, Vol.851. The New York Academy of Sciences, New York.
- Cuesta A, Meseguer J, Esteban MÁ. (2011).** Immunotoxicological effects of environmental contaminants in teleost fish reared for aquaculture. In: Stoytcheva M (Ed.). *Pesticides in the Modern World-Risks and Benefits*, p. 241–66.
- Cuesta A., Meseguer, J., Esteban, M.A. (2004).** Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 101, 203–210.
- Currie S., LeBlanc S., Watters M.A., Gilmour K.M. (2010).** Agonistic encounters and cellular angst: social interactions induce heat shock proteins in juvenile salmonid fish. *P Roy Soc Lond B Bio* 277:905–913.
- D'Amato F.R. (1988).** Effects of male social status on reproductive success and on behaviour in mice (*Mus musculus*). *J. Comp. Psychol.* 102, 146-151.
- D'Amato F.R., Rizzi R., Moles A. (2001).** A model of social stress in dominant mice. Effects on social sexual behavior. *Physiology & Behavior* 73, 421-426.
- Dalmo R., Bøggwald J. (2008).** Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 384–396.
- Dannevig B.H., Lauve A., McL. Press C., Landsverk T. (1994).** Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 3-18.
- Darias M J, Mazurais D, Koumoundouros G, et al. (2011).** Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. *Aquaculture* 315 (1-2): 49-60.
- Das, B.K., Debnath, C., Patnaik, P., Swain, D.K., Kumar, K., Mishra, B.K. (2009).** Effect of beta-glucan on immunity and survival of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch). *Fish and Shellfish Immunology* 27, 678–683.
- Das, B.K., Ellis, A.E., Collet, B. (2009).** Induction and persistence of Mx protein in tissues, blood and plasma of Atlantic salmon parr, *Salmo salar*, injected with poly I:C. *Fish and Shellfish Immunology* 26, 40–48.

Dautremepuits C, Betoulle S, Paris-Palacios S, Vernet G. (2004). Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Aquat Toxicol*; 68:325–38.

Dawkins M.S. (1990). From an animal's point of view: motivation, fitness, and animal welfare. *Behav Brain Sci* 13, 1–61.

Dawkins M.S. (1998). Evolution and animal welfare. *Quarterly Review of Biology*; 73, 305–328.

DeLuca HF. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D, *Am. J. Clinical Nutrition* 80(6) 1689S–96S.

DeVries, A.C., Glasper, E.R & Detillion, C.E. (2003). Social modulation of stress responses. *Physiol Behav* 79, 399–407.

Do Vale A., Afonso A., Silva M. T. (2002). The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L): cytochemical characterization of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish & Shellfish Immunology* 13, 183–198.

Duncan P.L., Klesius P.H. (1996a). Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune response in channel cat fish but not resistance to *Edwardsella ictaluri*. *J. Aqua. Anim. Health* 8, 24–248.

Duncan P.L., Klesius P.H. (1996b). Effect of feeding spirulina on specific and nonspecific immune response in channel cat fish. *J. Aqua. Anim. Health* 8, 308–313.

Duncan I.J.H. (2005). Science-based assessment of animal welfare: farm animals. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 24, 483–492.

Duncan I.J.H., Dawkins M.S. (1983). The problem of assessing 'well-being' and 'suffering' in farm animals. In: Smidt D (ed) *Indicators relevant to farm animal welfare*. Martinus Nijhoff, The Hague, pp 13–24.

Dunier M, Vergnet C, Siwicki AK, Verlhac V. (1995). Effect of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. IV. Prevention of nonspecific and specific immunosuppression by dietary vitamin C (ascorbate-2-polyphosphate). *Ecotoxicol Environ Saf* 30: 259–68.

Earley R.L., Edwards J.T., Aseem O., Felton K., Blumer L.S., Karom M., Grober M.S. (2006). Social interactions tune aggression and stress responsiveness in a territorial cichlid fish (*Archocentrus nigrofasciatus*). *Physiology & Behavior* 88, 353–363.

Ebran N, Julien S, Orange N, Auperin B, Molle G. (2000). Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities. *Biochim Biophys Acta* 1467, 271–80.

Edeline E, Haugen TO, Weltzien FA, Claessen D, Winfield IJ, Stenseth NC, Vøllestad LA (2010). Body downsizing caused by non-consumptive social stress severely depresses population growth rate. *P Roy Soc Lond B Bio* 277, 843–851.

El-Boshy M.E., El-Ashram A. M., AbdelHamid F. M., Gadalla H. A. (2010). Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 802-808.

Ellis A. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol* 1999:291–308.

Esteban M.A., Cuesta A., Ortuno J. & Meseguer J. (2001) Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish & Shellfish Immunology* 11, 303–315.

Esteban M.A., Rodrigues A., Ajala A.G., Mesenguer J. (2004). Effects of high doses of cortisol on innate cellular immune response of seabream (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology* 137, 89-98.

Esteban MA. An overview of the immunological defences in fish skin. *ISRN Immunol* 2012:1–29.

Estensoro I, Jung-Schroers V, Álvarez-Pellitero P, Steinhagen D, Sitjà-Bobadilla A. (2013). Effects of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infection on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) (Teleostei) intestinal mucus: glycoprotein profile and bacterial adhesion. *Parasitol Res* 112, 567–76.

Faisal M, Weeks BA, Vogelbein WK, Huggett RJ. (1991). Evidence of aberration of the natural cytotoxic cell activity in *Fundulus heteroclitus* (Pisces: Cyprinodontidae) from the Elizabeth River, Virginia. *Vet Immunol Immunopathol* 29:339–51.

Faisal M., Chiappelli F., Ahmed I.I., Cooper E.L., Weiner H. (1989). Social confrontation “stress” in aggressive fish is associated with an endogenous opioid-mediated suppression of proliferative response to mitogens and nonspecific cytotoxicity. *Brain Behav Immun* 3, 223–233.

Falco, A., Frost, P., Miest, J., Pionnier, N., Irnazarow, I., Hoole, D. (2012). Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. *Fish and Shellfish Immunology* 32, 1051–1057.

Fange R. (1982). A comparative study of lymphomyeloid tissue in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 2: 23.

Farrell AP, Gamper K, Birthwell IK (1998). Prolonged swimming, recovery and repeat swimming performance of mature sockeye salmon *Onchorhynchus nerka* exposed to moderate hypoxia and pentachlorophenol. *J Exp Biol* 201:2183–2193.

Fast MD, Ross NW, Mustafa A, Sims DE, Stewart C, Conboy GA, et al. (2002). Susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Atlantic salmon *Salmo salar* and coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to experimental infection with sea lice *Lepeophtheirus salmonis*; 52:57–68.

Fast MD, Hosoya S, Johnson SC, Afonso LOB (2008). Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) subjected to short- and long-term stress. *Fish Shellfish Immunol* 24, 600-609.

Fernandes-de-Castilho M., Pottinger T.G., Volpato G.L. (2008). Chronic social stress in rainbow trout: does it promote physiological habituation? *Gen Comp Endocrinol.* 155, 141-147.

Fernandez-Trujillo, A., Ferro, P., Garcia-Rosado, E., Infante, C., Alonso, M.C., Bejar, J., Borrego, J.J., Manchado, M. (2008). Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Fish and Shellfish Immunology* 24, 279–285.

Fletcher T. (1978). Defense mechanisms in fish. Malins D, Sargent J (Eds.). *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*, Acad Press London: 189–222.

Fletcher TC. (1982). Non-specific defence mechanisms of fish. *Dev Comp Immunol*; 2:123-32.

Fraser A.F., Broom D. M., (1990). *Farm Animal Behaviour and Welfare*". 3Edition Wallingford: C.A.B. International.

Fraser, D. (1995). Science, values and animal welfare: exploring the inextricable connection. *Animal welfare* 4, 103-117.

Frederick JR, Petri WA. (2005). Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology* 15:53R–59R.

Frick L. R., Arcos M. L., Rapanelli M., Zappia M. P., Brocco M., Mongini C. (2009). Impacts of chronic stress and social status on various physiological and performance measures in pigs of different breeds. *Journal of Animal Science*, 84, 588-596.

FSBI (2002). *Fish welfare*, Briefing paper 2. Cambridge: Fisheries Society of the British Isles, Granta Information Systems, 2002.

Fuchs E, Flugge G. (2002). Social stress in tree shrew effects on physiology, brain function and behavior of subordinate individuals. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 247–258.

Fujimoto, R.Y., Santos, R.F.B., Carneiro, D.J. (2013). Morphological deformities in the osseous structure in spotted sorubim *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz & Spix, 1829) with vitamin c deficiency. *An Acad Bras Cienc* 85, 379-384.

Furevik D.M., Bjordal J., Huse I., Ferno A. (1993). Surface activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in net pens. *Aquaculture* 110, 119-128.

Galhardo L., Oliveira R.F. (2009). Psychological stress and welfare in fish. *Annual Review of Biomedical Sciences* 11, 1-20.

Gannam, A.L., Schrock, R.M. (2008). Immunostimulants in fish diets. *J App Aquac* 9, 53-89.

Georgalas V., Malavasi S., Franzoi P., Torricelli P. (2006). Analisi della velocità di nuoto in larve di spigola allevate nei grandi volumi: effetto dell'ontogenesi e della densità di prede, «*Biologia Marina Mediterranea*», 13, pp. 507-509.

- Gilmour K. M., J.D. DiBattista, J. B. Thomas. (2005).** Physiological Causes and Consequences of Social Status in Salmonid Fish. *Integrative and Comparative Biology* 45, 263-273.
- Gheorghiu C, Marcogliese DJ, Scott ME. (2012).** Waterborne zinc alters temporal dynamics of guppy *Poecilia reticulata* epidermal response to *Gyrodactylus turnbulli* (Monogenea). *Dis Aquat Organ* 98:143–53.
- Gomez D, Sunyer JO, Salinas I. (2013).** The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol* 35:1729–39.
- Gratzek J.B., Reinert R. (1984).** Physiological responses of experimental fish to stressful conditions. *Natl Cancer Inst Monogr* 65, 169-189.
- Gregory T. R. & Wood C. M. (1999).** The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol Biochem Zool*; 72, 286-295.
- Gregory T.R., Wood C.M. (1998).** Individual variation and interrelationships between swimming performance, growth rate, and feeding in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), «*Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*», 55, pp. 1583- 1590.
- Guardiola F. A., Cuesta, A., Abellán, E., Meseguer, J., Esteban, M.A (2014).** Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* 40, 24-31.
- Gupta S.K., Pal, A.K., Sahu, N.P., Dalvi, R., Kumar, V., Mukherjee, S.C. (2008).** Microbial levan in the diet of *Labeo rohita* Hamilton juveniles: effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases* 31, 649–657.
- Hale M.E. (1999).** Locomotor mechanics during early life history: effects of size and ontogeny on fast-start performance of salmonid fishes. *J Exp Biol.* 202 (Pt 11):1465-79.
- Hammer C. (1995).** Fatigue and exercise test with fish. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)*, 112, pp. 1-20.
- Handy RD, Eddy FB. (1990).** The interactions between the surface of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and waterborne metal toxicants. *Funct Ecol*; 4:385– 92.
- Hanif A., Bakopoulos V., Dimitriadis G.J. (2004).** Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish & Shellfish Immunology* 17, 411-435.
- Harikrishnan R., Balasundaram C Heo M.S. (2010).** Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317, 1-15.
- Harikrishnan R., Balasundaram C., Dharaneedharan S., Moon Y.B., Kim J.S., Heo M.S. (2009).** Effect of plant active compounds on immune response and disease resistance in *Cirrhina mrigala* infected with fungal fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Aquaculture Res.*, 40, 1170-1181.

- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M. S. (2010a).** Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 28, 354–361.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M. S. (2010b).** *Lactobacillus sakei* BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to streptococcosis infection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 1037–1043.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.-S. (2011).** Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317, 1–15.
- Hendricks S.B. (1952).** In “Metabolic Interrelations” (E.C. Reifenshtein, Jr. ed), vol 4, pp 185-212. Josiah Macy, Jr Found, New York.
- Hernández, P., (2005).** Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture, in: FAO (Ed.), FAO Fisheries Technical Paper No 469. Rome, pp. 1–97.
- Hjelmeland K, Christie M, Raa J. (1983).** Skin mucus protease from rainbow-trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *J Fish Biol* 13–22.
- Höglund E., Kolm N., Winberg S. (2001).** Stress-induced changes in brain serotonergic activity, plasma cortisol and aggressive behaviour in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is counteracted by L-DOPA. *Physiol Behav.* 74, 381-389.
- Holick MF. (2004).** Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis, *Am J Clin Nutr* 79:362-71.
- Hsieh, J.C., Pan, C.Y., Chen, J.Y. (2010).** Tilapia hepcidin (TH) 2-3 as a transgene in transgenic fish enhances resistance to *Vibrio vulnificus* infection and causes variations in immune-related genes after infection by different bacterial species. *Fish Shellfish Immunol* 30, 1-10.
- Huang ZH, Ma AJ, Wang X. (2011).** The immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), skin to high water temperature. *J Fish Dis* 34:619–27.
- Hughes B.O. (1976).** Behaviour as an index of welfare. Proc. V. Europ. Poultry Conference Malta, 1005-1018.
- Huntingford F. A., Adams C., Braithwaite V. A., Kadri S., Pottinger T. G., Sandoe P. & Turnbull J. F. (2006).** Current issues in fish welfare. *J Fish Biol* 68, 332-372.
- Ibrahim, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S., Abd El-Aty, A.M. (2010).** Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology* 29, 241–246.
- Imberty A, Varrot A. (2008).** Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* 18:567–76.

- Immanuel, G., Uma, R.P., Iyapparaj, P., Citarasu, T., Peter, S.M.P., Babu, M.M., Palavesam, A. (2009).** Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* 74, 1462–1475.
- Ingram G. (1980).** Substances involved in the natural resistance of fish to infection. *J Fish Biol* 16:23–60.
- Ironson G., LaPerriere A., Antoni M., O'Hearn P., Schneiderman N., Klimas N. (1990).** Changes in immune and psychological measures as a function of anticipation and reaction to news of HIV-1 antibody status. *Psychosomatic Medicine*, 52, 247-270.
- Irwin M., Daniels M., Risch S. C., Bloom E., Weiner H. (1988a).** Plasma cortisol and natural killer cell activity during bereavement. *Biological Psychiatry* 24, 173-178.
- Isowa T., Ohira H., Murashima S. (2004).** Reactivity of immune, endocrine and cardiovascular parameters to active and passive acute stress. *Biological Psychology* 65, 101-120.
- Jain K.E., Birtwell I.K., Farrell A.P. (1998).** Repeat swimming performance of mature sockeye salmon following a brief recovery period: a proposed measure of fish health and water quality, «*Canadian Journal of Zoology*», 76, pp. 1488-1496.
- Jain K.E., Farrell A.P. (2003).** Influence of seasonal temperature on the repeat swimming performance of rainbow trout *Onchorynchus mykiss*, «*Journal of Experimental Biology* », 206, pp. 3569-3579.
- Jamner L. D., Schwartz G. E., Leigh H. (1988).** The relationship between repressive and defensive coping styles and monocyte, eosinophile, and serum glucose levels: support for the opioid peptide hypothesis of repression. *Psychosomatic Medicine*, 50, 567-575.
- Jepsen N., Koed A., Thorstad E.B., Baras E. (2002).** Surgical implantation of telemetry transmitters in fish: how much we have learned?, «*Hydrobiologia*», 483, pp. 239-248.
- Juell J. E. & Fosseidengen J. E. (2004).** Use of artificial light to control swimming depth and fish density of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in production cages. *Aquaculture*; 233, 269-282.
- Julie L. Morrow-Tesch, McGlone J.J., Janeen L.S.J. (1994).** Heat and social stress effects on pig immune measures. *J. Anim. Sci.* 72, 2599–2609.
- Kaattari S. L. Tripp R. A. (1987).** Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmon. *J Fish Biol*; 31, 129-132.
- Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M. (1990).** The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol* 25, 93-98.
- Karami A, Christianus A, Ishak Z, Shamsuddin ZH, Masoumian M, Courtenay SC. (2012).** Use of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* in fish to detect the environmental pollutant benzo[a]pyrene. *J Hazard Mater* 215-216:108–14.
- Kaufmann I., Eisner C., Richter P., Hüge V., Beyer A., Chouker A. (2007).** Lymphocyte subsets and the role of TH1/TH2 balance in stressed chronic pain patients. *Neuroimmunomodulation*, 14, 272-280.

Keles, O., Candan, A., Bakirel, T., Karatas, S. (2002). The investigation of the anabolic efficiency and effect on the non-specific immune system of zeranol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turk J Vet Anim Sci* 26, 925–931.

Kelly KA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. (1998). Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ Health Perspect* 106:375–84.

Khong H-K, Kuah M-K, Jaya-Ram A, Shu-Chien AC. (2009). Prolactin receptor mRNAs are upregulated in discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) skin during parental phase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 153:18–28.

Kiecolt-Glaser J. K., Preacher K. J., MacCallum R. C., Atkinson C., Malarkey W. B., & Glaser, R. (2003). Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9090–9095.

Kinsey S.G., Bailey M.T., Sheridan J.F., D.A. Padgett, Avitsur R. (2007). Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 21, 458–466.

Kirchhoff, N.T., D'Antignana, T., Leef, M.J., Hayward, C.J., Wilkinson, R.J., Nowak, B.F. (2011). Effects of immunostimulants on ranch-reared southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*: immune response, health and performance. *Journal of Fish Biology* 79, 331–355.

Kiron, V. (2012). Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology* 173, 111–133.

Kitao, T., Yoshida, T., Anderson, D.P., Dixon, O.W., Blanch, A. (1987). Immunostimulation of antibody-producing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier. *J Fish Biol* 31, 87–91.

Kolok A.S. (1999). Interindividual variation in the prolonged locomotor performance of ectothermic vertebrates: a comparison of fish and invertebrate methodologies and a brief review of the recent fish literature, «*Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*», 56, pp. 700–710.

Koolhaas J.M., De Boer S.F., De Rutter A.J., Meerlo P., Sgoifo A. (1997). Social stress in rats and mice. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 640, 69–72.

Koolhaas J. M., Korte S. M., De Boer S. F., Van der Vegt B. J., Van Reenen C. G., Hopster H., De Jong I. C., Ruis M. A. W., Blokhuis H. J. (1999). Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23: 925–935.

Korzan WJ, Höglund E, Watt MJ, Forster GL, Øverli Ø, Lukkes J L, Summers CH (2007). Memory of opponents is more potent than visual sign stimuli after social hierarchy has been established. *Behav Brain Res* 183, 31–42.

Koumoundouros G., Sfakianakis D.G., Divanach P., Kentouri M. (2002). Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles, «*Journal of Fish Biology*», 60, pp. 923–932.

Kramer M., Hiemke C., Fuchs E. (1999). Chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in tree shrews: Time-dependent behavioural and endocrine effects. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 937-947.

Kudrenko, B., Snape, N., Barnes, A.C. (2009). Linear and branched beta (1-3) D-glucans activate but do not prime teleost macrophages in vitro and are inactivated by dilute acid: implications for dietary immunostimulation. *Fish and Shellfish Immunology* 26, 443–450.

Labudzyn's'kyi, D.O., Shymans'kyi, I.O., Riasnyi, V.M. Velykyi, M.M. (2014). Vitamin D3 availability and functional activity of peripheral blood phagocytes in experimental type 1 diabetes. *Ukr Biokhim Zh* 86(2), 107-118.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lamers C H J. (1985). The reaction of the immune system of fish to vaccination. PhD thesis, Agricultural University Wageningen Olanda.

Lankford S. E., Adams T. E., & Cech J. J. Jr. (2003). Time of day and water temperature modify the physiological stress response in green sturgeon, *Acipenser medirostris*. *Comp Biochem Physiol*, 135, 291-302.

Lauve A., Dannevig B.H. (1993). Fluid-phase endocytosis by rainbow trout head kidney macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 3, 79-87.

Lembo G., Carbonara P., Scolamacchia M., Spedicato M. T., Bjørnsen J. E., Holland B., McKinley R. S. (2008). Introduction of a new physiological acoustic electromyogram transmitter, «Fisheries Management and Ecology», 15, pp. 333-338.

Lembo G., Carbonara P., Scolamacchia M., Spedicato M.T., McKinley R.S. (2007). Use of muscle activity indices as a relative measure of well-being in cultured sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), «Hydrobiologia», 582, pp. 271-280.

Li C, Wang R, Su B, Luo Y, Terhune J, Beck B, et al. (2013). Evasion of mucosal defenses during *Aeromonas hydrophila* infection of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Dev Comp Immunol* 39: 447–55.

Li M.H., Wise D.J., Johnson M.R. & Robinson E.H. (1994). Dietary menhaden oil reduced resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture* 128,335–344.

Lima S.L., Zollner P. A., Bedneko P. A. (1998). Predation, scramble competition, and the vigilance group size effect in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *Behav Ecol Sociobiol* 46: 110-116.

Lin, S., Pan, Y., Luo, L., Luo, L. (2011). Effects of dietary β -1, 3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish and Shellfish Immunology* 31, 788– 794.

Loganathan K, Muniyan M, Prakash AA, Raja PS, Prakash M. (2011). Studies on the role

of mucus from *Clarias batrachus* (linn) against selected microbes *Fish Physiol Biochem* 2, 202–6.

Luebke RW, Hodson P V, Faisal M, Ross PS, Grasman KA, Zelikoff J. (1997). Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. *Fundam Appl Toxicol* 37:1–15.

Ma AJ, Huang Z, Wang XA. (2013). Changes in protein composition of epidermal mucin in turbot *Scophthalmus maximus* (L.) under high water temperature. *Fish Physiol Biochem* 39:1411-8.

Magnadottir B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnol New York NY* 12:361–79.

Magnhagen C., Borcharding J. (2008). Risk-taking behaviour in foraging perch: Does predation pressure influence age-specific boldness? *Anim Behav* 75, 509–517.

Male D, Roitt I. (2001). Introduction to the immune system. In: Roitt I, Brostoff J, Male D (Eds.). *Immunology*, Mosby, London: p. 1–12.

Marel, M. van der, Adamek, M., Gonzalez, S.F., Frost, P., Rombout, J.H.W.M., Wiegertjes, G.F., Savelkoul, H.F.J., Steinhagen, D. (2012). Molecular cloning and expression of two β -defensin and two mucin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their up-regulation after β -glucan feeding. *Fish and Shellfish Immunology* 32, 494–501.

Marshall G. D., Agarwal S. K., Lloyd C., Cohen L., Henninger E. M., Morris G. J. (1998). Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain, Behavior, and Immunity*, 12, 297-307.

Martins C.I.M., Trenovski M., Schrama J.W., Verreth J.A.J. (2006). Comparison of feed intake behaviour and stress response in isolated and non-isolated African catfish. *Journal of Fish Biology* 629–636.

Mathieu, C., Adorini, L. (2002). The coming of age of 1, 25-dihydroxyvitamin D (3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 8,174–179.

Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., Mizuochi, T.A. (1996). Novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen like domains that functions as an opsonin. *J Biol Chem* 271, 2448-2454.

Maule A.G., Tripp R.A., Kaattari S.L., Schreck C.B. (1989). Stress alters immune function and disease resistance in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Endocrinology* 120, 135-142.

Mayer L. (2003). Mucosal immunity. *Pediatrics* 111, 1595–600.

Mazeaud M.M., Mazeaud F. (1981). Adrenergic responses to stress in fish. In: Pickering, A.D. (Ed.), *Stress and Fish*. Academic Press, London, pp. 49–75.

McCarthy, I.D., Gair, D.J. & Houlihan, D.F. (1999). Feeding rank and dominance in *Tilapia rendalli* under defensible and indefensible patterns of food distribution. *Journal of Fish Biology* 55, 854–867.

McEwen B.S., Stellar E. (1993). Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch IntPhysiol Bio* 153(18), 2093-2101

McFarlane W.J., Cubitt K. F., Williams H., Rowsell D., Moccia R., Gosine R., McKinley R.S. (2004). Can feeding status and stress level be assessed by analyzing pattern of muscle activity in free swimming rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)? «*Aquaculture*», 239, pp. 467-484.

McKenzie D.J., Higgs D.A., Dosanjh B., Deacon G., Randall D.J. (1998). Dietary lipid composition influences swimming performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in sea water, «*Comparative Physiology and Biochemistry*», 19, pp. 111-122.

McKim J, Lien G. (2001). Toxic responses of the skin. In: Schlenk D, Benson W (Eds.). *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts: organs*, Taylor & Francis, New York, p. 203–204.

McKinnon W., Weisse C. S., Reynolds C. P., Bowles C. A., Baum A. (1989). Chronic stress, leukocyte subpopulations, and humoral response to latent viruses. *Health Psychology*, 8, 389-402.

Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K. (2013). Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol Biochem* 39, 431-457.

Meerlo P., Overkamp G.J.F., Koolhass J.M. (1997). Behavioural and physiological consequences of a single social defeat in Roman high-and low-avoidance rats. *Psyconeuroendocrinology* 22, 155-168.

Merrifield, D.L., Harper, G.M., Mustafa, S., Carnevali, O., Picchietti, S., Davies, S.J. (2011). Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. *Cell and Tissue Research* 344, 135–146.

Miller J, Gallo RL. (2010). Vitamin D and innate immunity, *Dermatol. Therapy*, 23, 13-22.

Milligan C.L. (2003). A regulatory role of cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, «*Journal of Experimental Biology*», 206, pp. 3167-3173.

Miyashita T., Yamaguchi T., Motoyama K., Unno K., Nakano Y., Shimoi K. (2006). Social stress increases biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in mouse urine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349, 775-780.

Moos R. H. (1964). Personality Factors Associated with Rheumatoid Arthritis: A Review. *Journal of Chronic Diseases*, 17, 41-55.

Morrissey J. Coagulation factor VIIa. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (Eds.). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Acad Press, London, UK; 1998, p. 161–163.

Nayak, S.K. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 2–14.

Nelson J.A., Tang Y., Boutilier R.G. (1996). The effects of salinity change on the exercise performance of two atlantic cod (*Gadus morhua*) populations inhabiting different environments, «*The Journal of Experimental Biology*», 199, pp. 1295-1309.

Neuhaus H, Van der Marel M, Caspari N, Meyer W, Enss ML, Steinhagen D. (2007). Biochemical and histochemical study on the intestinal mucosa of the common carp *Cyprinus carpio* L., with special consideration of mucin glycoproteins. *J Fish Biol* 70, 1523–34.

Newton R.A., Raftos D.A., Raison R.L., Geczy C.L. (1994). Chemotactic responses of hagfish (Vertebrata, Agnatha) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 295-303.

Nigam AK, Kumari U, Mittal S, Mittal AK. (2012). Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches. *Fish Physiol Biochem* 38:1245–56.

Nobuo Sugo MD., Huru P. D., Morahan M. B., Hattori K., Traystman R. J., De Vries A.C. (2001). Social stress exacerbates focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 33, 1660-1664.

Nya E.J., Austin, B. (2010). Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 108, 686–694.

O’Connell J P, Gatlin D M. (1994). Effects of dietary calcium and vitamin D3 on weight gain and mineral composition of the blue tilapia (*Oreochromis aureus*) in low-calcium water. *Aquaculture* 125 (1-2): 107-117.

O’Connor KI, Metcalfe NB, Taylor AC (1999). Does darkening signal submission in territorial contests between juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*? *Anim Behav* 58: 1269–1276.

Oliva-Teles A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases* 35, 83-108.

Oliveira R.F., Hirschenhauser K., Carneiro L.A., Adelino V.M., Canario A. (2002). Social modulation of androgen levels in male teleost fish. *Comp Biochem Phys B* 132: 203–215.

Ortuno J., Esteban M.A., Meseguer J. (2000). Kinetics of hydrogen peroxide production during in vitro respiratory burst of seabream (*Sparus aurata* L.) head kidney leucocytes, as measured by a flow cytometric method. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 725-729.

Ortuno J., Esteban, M.A., Mulero, V., Meseguer, J. (1998). Methods for studying the haemolytic, chemoattractant and opsonic activities of seabream (*Sparus aurata* L.). In: Barnes, A.C., Davidson, G.A., Hiney, M., McIntosh, D. (Eds.), *Methodology in Fish Diseases Research*. Albion Press, pp. 97–100.

Øverli Ø., Winberg S., Damsgard B., and Jobling M. (1998). Food intake and spontaneous swimming activity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): Role of brain serotonergic activity and social interactions. *Can. J. Zool.* 76, 1366-1370.

Øverli Ø., Winberg S., Pottinger T.G. (2005). Behavioral and Neuroendocrine Correlates of Selection for Stress Responsiveness in Rainbow Trout—a Review. *Integrative and Comparative Biology* 45, 463-474.

Palaksha KJ, Shin GW, Kim YR, Jung TS. (2008). Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology* 24, 479–567.

Parry R. (1965). A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc Society Exp Biol Med* 119, 1340–1342.

Paull GC, Filby AL, Giddins HG, Coe TS, Hamilton PB, Tyler CR (2010). Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success. *Zebrafish* 7(1): 109-126.

Perez-Vilar J, Hill R. The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem* 1999; 274:31751–4.

Perret M. (1992). Environmental and social determinants of sexual function in the male lesser mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Folia Primatol.* 59, 1-25.

Perrier H, Delcroix JP, Perrier C, Gras J. (1974). Disc electrophoresis of plasma proteins of fish. Physical and chemical characters; localization of fibrinogen, transferrin and ceruloplasmin in the plasma of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson). *Comp Biochem Physiol, B* 49:679– 685.

Picchietti S, Terribili FR, Mastrolia L, Scapigliati G., Abelli L.(1997). Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat. Embriol.* 196(6), 457-463.

Pickering R, Rediske JJ. (1984). Arachidonic acid-mediated and serum-opsonized-zymosan-mediated inhibition of complement production by macrophages. Lack of requirement for endogenous arachidonic acid metabolites. *Cell Immunol.* 88, 241-250.

Pickering R., Chong JP, Chongtrakul P, Neufeld VR, Tugwell P, Chambers LW, Oates MJ. (1989). Setting educational priorities for learning the concepts of population health. *Med. Educ.* 23, 429-439.

Piemonti L., Monti P., Allavena P., Sironi M., Soldini L., Leone B. E.(1999). Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *Journal of Immunology*, 162, 6473-6481.

Plata-Salaman C. R., Ilyin S. E., Turrin N. P., Gayle D., Flynn M. C., Bedard T.(2000). Neither acute nor chronic exposure to a naturalistic (predator) stressor influences the interleukin-1beta system, tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Brain Research Bulletin*, 51, 187-193.

Plaut I. (2001). Critical swimming performance: its ecological relevance, «*Comparative Biochemistry and Physiology (A)*», 131, pp. 41-50.

Poli B.M. (2009). Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality, «Italian Journal of Animal Sciences», 8, pp. 137-160.

Pottinger T.G., Carrick T.R. (2001). Stress responsiveness affects dominant-subordinate relationships in rainbow trout. *Horm. Behav.* 40, 419-427.

Provvedini, D.M., Tsoukas, C.D., Deftos, L.J., Manolagas, S.C., 1983. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. *Science* 221,1181–1183.

Pulsford A., Koros A.M. (1994). Neuroendocrine markers expressed on sea urchin coelomocytes and other immunoregulatory parameters may be used to monitor environmental changes. *Ann. N Y Acad.Sci.*712, 350-353.

Quade, M.J., Roth, J.A. (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58, 239–248.

Quin, C., Zhang, Y., Liu, W., Xu, L., Yang, Y., Zhou, Z. (2014). Effects of chito-oligosaccharides supplementation on growth performance, intestinal cytokine expression, autochthonous gut bacteria and disease resistance in hybrid tilapia *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*. *Fish Shellfish Immunol* 40, 267-274.

Quintella B.R., Andrade N.O., Koed A., Almeida P.R. (2004). Behavioural patterns of sea lampreys' spawning migration through difficult passage areas, studied by electromyogram telemetry, «*Journal of Fish Biology*», 65, pp. 961-972.

Qureshi F., Alam J., Khan M. A., Sheraz G. (2002). Effect of examination stress on blood cell parameters of students in a Pakistani medical college. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 14, 20-22.

Raeder ILU, Paulsen SM, Smalås AO, Willassen NP. (2007). Effect of fish skin mucus on the soluble proteome of *Vibrio salmonicida* analysed by 2-D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Microb Pathog* 42:36–45.

Rai AK, Mittal AK. (1991). On the activity of acid phosphatase during skin regeneration in *Heteropneustes fossilis*. *Bull Life Sci* 39:33–9.

Rairakhwada, D., Pal, A.K., Bhatena Z.P., Sahu, N.P., Jha, A., Mukherjee, S.C. (2007). Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology* 22, 477–486.

Raj VS, Fournier G, Rakus K, Ronsmans M, Ouyang P, Michel B, et al. (2011). Skinmucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells. *Vet Res* 42:92.

Randall D. J. & Perry S. F. (1992). Catecholamine in fish physiology. *XII B*, 255-300.

Redondo MJ, Alvarez-Pellitero P. (2010). Carbohydrate patterns in the digestive tract of *Sparus aurata* L. and *Psetta maxima* (L.) (Teleostei) parasitized by *Enteromyxum leei* and *E. scophthalmi* (Myxozoa). *Parasitol Int*;59:445–53.

Redwine L., Snow S., Mills P., Irwi M. (2003). Acute psychological stress: effects on chemotaxis and cellular adhesion molecule expression. *Psychosomatic Medicine*,65,598-603.

- Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. (1989).** The role of the vitamin D endocrine system in health and disease, *New England J Med*, 320:981-91.
- Reid S. G., Vijayan M. M. & Perry S. F. (1996).** Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Endocrinol*; 120, 135-142.
- Reschly, E.J., Bainy, A.C., Mattos, J.J., Hagey, L.R., Bahary, N., Mado, S.R., et al. (2007).** Functional evolution of the vitamin D and pregnane X receptors. *BMC Evol Biol* 7,222.
- Ringø, E., Erik Olsen, R., Gonzalez Vecino, J.L., Wadsworth, S. (2011).** Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: A review. *Journal of Marine Science: Research and Development* 02, 1–22.
- Ritter M. A, Crispe I. N. (1992).** The thymus. (Richwood D and Male D, eds), pp 1-85. Oxford Univ. Press, Oxford (UK).
- Robohm RA, Brown C, Murchelano RA. (1979).** Comparison of antibodies in marine fish from clean and polluted waters of the New York Bight: relative levels against 36 bacteria. *Appl Environ Microbiol* 38:248–57.
- Rodrigues P. N. S., Vazquez-Dorado S., Neves J. V., Wilson J. M. (2006).** Dual function of fish hepcidin: Response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Developmental & Comparative Immunology* 30:1156-1167.
- Romano N., Picchietti S., Taverne-Thiele J.J., Abelli L., Mastrolia L., Verburg-van Kemenade B.M.L. and J.H.W.M. Rombout. (1998).** Distribution of macrophages during fish development: an immunohistochemical study in carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Anatomy and Embryology* 198, 31-41.
- Romano N., Ciaccia E., Piergentili R., Rossi F., Ficca A. G., Ceccariglia S., Mastrolia L. (2011).** Antigen-dependent T lymphocytes (tcR β +) are primarily differentiated in the thymus rather than in other lymphoid tissues in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Fish & Shellfish Immunology* 30, 773-782.
- Rombout J.H., Taverne N, Van De Kamp M, Taverne-Thiele AJ. (1993).** Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev Comp Immunol* 17:309–17.p. 729–50.
- Rombout J.H.W.M., Abelli L., Picchietti S., Scapigliati G., Kiron V. (2011).** Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology* 31, 616-626.
- Rosenthal GG, Flores Martinez T.Y., Garcia de Leon F.J., Ryan MJ (2001).** Shared preferences by predators and female for male ornaments in swordtails. *The American Naturalist*, 158
- Ross NW, Firth KJ, Wang A, Burka JF, Johnson SC. (2000).** Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Dis Aquat Organ* 41, 43–51.

- Rowley A, Hunt T, Page M, Mainwaring G. (1988).** Fish. In: Rowley, AF, Ratcliffe N (Eds.). Vertebrate Blood Cells, Cambridge University Press, Cambridge: p. 19–28.
- Rozkova D., Horvath R., Bartunkova J., Spisek R. (2006).** Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clinical Immunology*, 120, 260-271.
- Rutte C., Taborsky M. & Brinkhof M. W. G. (2006).** What sets the odds of winning and losing? *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 16-21.
- Sado, R.Y., Bicudo, A.J.A., Cyrino, J.E.P. (2013).** Growth and hematology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) fed with increasing levels of vitamin E (DL- α -tocopheryl acetate). *An Acad Bras Cienc* 85, 385-393.
- Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C. (2003).** Immunomodulation by vitamin C in healthy and aflatoxin B1 induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita*). *Comp Immunol, Microbiol Infs Dis* 26, 65-76.
- Saint-Mezard P., Chavagnac C., Bosset S., Ionescu M., Peyron E., Kaiserlian D (2003).** Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *Journal of Immunology*, 171, 4073-4080.
- Sakai M. (1999.)** Current research status of fish immunostimulants [Review]. *Aquaculture* 172, 63–92.
- Sakai, M., Otubo, T., Atsuta, S., Kobayashi, M. (1993).** Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum by oral administration of bovine lactoferrin. *J Fish Dis* 16, 239–247.
- Salerno G, Parisi MG, Parrinello D, Benenati G, Vizzini A, Vazzana M, et al. (2009).** F-type lectin from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): purification, cDNA cloning, tissue expression and localization, and opsonic activity. *Fish Shellfish Immunol* 27, 143–53.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munk, A.U., (2000).** How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocr Rev* 21, 55–89.
- Saurabh S, Sahoo PK. (2008).** Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac Res* 39:223–39.
- Scapigliati G., Romano N., Abelli L. (1999).** Monoclonal antibodies in teleost fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B- lymphocytes. *Aquaculture* 172, 3-28.
- Schjolden J., Stoskhus A., Winberg S. (2005).** Does individual variation in stress responses and agonistic behavior reflect divergent stress coping strategies in juvenile rainbow trout? *Physiol Biochem Zool* 78, 715–723.
- Schreck C.B. (2010).** Stress and fish reproduction. The roles of allostasis and hormesis, «General Comparative Endocrinology», 165 (3), pp. 549-556.

- Secombes C.J. and Fletcher T.C. (1992).** The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual review of Fish Disease* 2, 53-71.
- Secombes C.J (1994).** Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 421-436.
- Secombes C.J. (1990).** Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *Techniques in fish immunology* 1, 137-152.
- Segal A.W., Wientjes F.B., Hsuan J.J. (1993).** p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem. J.* 296, 557-561.
- Segerstrom S. C., Miller G. E. (2004).** Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychological Bulletin*, 130, 601-630.
- Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. (2006).** Adjuvant and immunostimulatory effects of beta glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet Immunol Immunopathol*; 114:15–24.
- Seyle H. (1936).** A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*; 138, 32-33.
- Sharp GJE, Secombes CJ. (1993).** The role of reactive oxygen species in the killing the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish. Shellfish. Immunol.* 3, 119-129.
- Sheikhzadeh N, Heidarieh M, Pashaki AK, Nofouzi K, Farshbafi MA, Akbari M. (2012).** Hilyses®, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 32:1083–7.
- Sheikhzadeh N, Karimi Pashaki A, Nofouzi K, Heidarieh M, Tayefi-Nasrabadi H. (2012).** Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 32:407–10.
- Shephard KL.(1994).** Functions for fish mucus. *Rev Fish Biol Fish* 4:401–29.
- Shiibashi T., Iida T. (2001).** NADPH and NADH serve as electron donor for the superoxide-generating enzyme in tilapia (*Oreochromis niloticus*) neutrophils. *Development and Comparative Immunology* 25, 461-465.
- Shved, N., Berishvili, G., Mazel, P., Baroiller, J.F., Eppler, E. (2011).** Growth hormone (GH) treatment acts on the endocrine and autocrine/paracrine GH/IGF-axis and on TNF- α expression in bony fish pituitary and immune organs. *Fish Shellfish Immunol* 31,944-952.
- Siegfried, B., Frishknecht, H.R., Waser, P.G (1984).** Defeat, learned submissiveness, and analgesia in mice: effect of genotype. *Behav. Neural Biol.* 421, 91-97.
- Sinyakov MS, Dror M, Zhevelev HM, Margel S, Avtalion RR. (2002).** Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. *Vaccine* 20:3668–74.

- Siwicki A, Studnicka M. (1986).** Ceruloplasmin activity in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bamidgeh* 38:126– 129.
- Sloman K. A., Motherwell G., O'Connor K.I., Taylor A.C. (2000).** The effect of social stress on the standard metabolic rate (SMR) brown trout, *Salmo trutta*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23: 49- 53.
- Sloman K.A., Armstrong, J.D. (2002).** Physiological effects of dominance hierarchies: laboratory artefacts or natural phenomena? *Journal of Fish Biology* 61, 1–23.
- Smith P.D., McCarthy D.H., Pterson W.D. (1980).** Further studies on furunculosis in fish. In “Fish Diseases”, 3 113-119.
- Smith, C. J., Shaw B. J., Handy, R. D. (2007).** Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 82, 94-109.
- Snieszko SF. (1974).** The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J Fish Biol* 6:197–208.
- Sommerhoff C. P., Avrutina O., Schmoldt H. U., Gabrijelcic-Geiger D., Diederichsen U., & Kolmar H. (2010).** Engineered cystine knot miniproteins as potent inhibitors of human mast cell tryptase beta. *Journal of Molecular Biology*, 395, 167-175.
- Spitzer R, Koch E. (1998).** Hagfish skin and slime glands. In: Jorgensen JM, Lomholt JP, Weber RE, Malte H (Eds.). *The Biology of Hagfish*; Chapman Hall, London p. 109–132.
- Spruijt B.M., Bos R., Pijlman F.T.A. (2001).** A Concept of welfare based on reward evaluating mechanisms in the brain: anticipatory behaviour as an indicator for the state of reward systems. *Appl Anim Behav Sci* 72, 145–171.
- Stabili L, Pagliara P. (2009).** Effect of zinc on lysozyme-like activity of the seastar *Marthasterias glacialis* (Echinodermata, Asteroidea) mucus. *J Invertebr Pathol* 100:189–92.
- Stefanski V. (2001).** Social stress in laboratory rats: Behavior, immune function, and tumor metastasis. *Physiology and Behavior*, 73, 385-391.
- Stefanski, V., & Ben-Eliyahu, S. (1996).** Social confrontation and tumor metastasis in rats: defeat and beta-adrenergic mechanisms. *Physiology and Behavior*, Vol.60, No.1, pp. 277-282.
- Subramanian S, Ross NW, Mackinnon SL. (2008).** Comparison of the biochemical composition of normal epidermal mucus and extruded slime of hagfish (*Myxineglutinosus* L.). *Fish Shellfish Immunol* 25:625–32.
- Sunyer J.O, Tort L. (1995).** Natural hemolytic and bactericidal activities of seabream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Vet Immunol Immunopathol* 45, 333–378.
- Suter H. C. & Huntingford F. A. (2002).** Eye colour in juvenile Atlantic salmon: effects of social status, aggression and foraging success. *J Fish Biol*; 61, 606-614.
- Sutherland W.J. (2006).** Predicting the ecological consequences of environmental change: a review of the methods. *Journal of Applied Ecology* 43, 617-627.

- Sutton MA1, Ito HT, Cressy P, Kempf C, Woo JC, Schuman EM. (2006).** Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell*.19; 125(4):785-99.
- Tannenbaum, J. (1991).** Ethics and animal welfare: the inextricable connection. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198, 1360-1376.
- Tassakka, A.C.M.A.R., Sakai, M., 2005.** Current research on the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides in fish. *Aquaculture* 246, 25–36.
- Tasumi S, Ohira T, Kawazoe I, Suetake H, Suzuki Y, Aida K.(2002).** Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *J Biol Chem* 277:27305–11.
- Tavera-Mendoza, Luz E, White, John H. (2007).** Cell Defenses and the Sunshine Vitamin, *Scientific American*, 297(5):62-72.
- Thorstad E.B., Næsje T.F., Fiske P., Finstad B. (2003).** Effect of hook and release on Atlantic salmon in the river Alta, northern Norway, «*Fisheries Research*», 60, pp. 293-307.
- Thorstad E.B., Økland F., Finstad B. (2000).** Effects of telemetry transmitters on swimming performance of adult Atlantic salmon, «*Journal of Fish Biology*», 57, pp. 531-535.
- Tort L, Balasch JC, Mackenzie S. (2003).** Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Trends Immunol* 22:277–86.
- Trede NS, Zon LI. (1998).**Development of T-cells during fish embryogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 253-263.
- Trichet V.V. (2010).**Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research* 41, 356–372.
- Van Muiswinkel W. (1995).** The piscine immune system: Innate and acquired immunity. In: PTK Who (Ed.). *Fish Diseases and Disorders*, CAB International Oxon.
- Van Muiswinkel WB, Lamers CHJ & Rombout JHW. (1991).**Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Research Immunol.* 142, 362-366.
- Vasta GR, Ahmed H, Odom EW. (2004).** Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates. *Curr Opin Struct Biol* 14:617–30.
- Vasta, G.R. (2009).** Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol* 7, 424-438.
- Vazzana M., Cammarata M., Parrinello D. (2003).** Chemiluminescence response of β -glucan stimulated leukocytes isolated from different tissues and peritoneal cavity of *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology* 14,423-434.
- Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E.L., Parrinello N. (2002).** Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture* 210, 231–243.

- Vazzana, M., Vizzini, A., Salerno, G., Di Bella, M.L., Celi, M., Parrinello, N. (2008).** Expression of a glucocorticoid receptor (DlGR1) in several tissues of the teleost fish *Dicentrarchus labrax*. *Tissue Cell* 40, 89–94.
- Vazzana, M., Vizzini, A., Sanfratello, M.A., Celi, M., Salerno, G., Parrinello, N. (2010).** Differential expression of two glucocorticoid receptors in seabass (teleost fish) head kidney after exogenous cortisol inoculation. *CompBiochemPhysiol A MolIntegrPhysiol* 157, 49–54.
- Verdugo P. (1990).** Goblet cells secretion and mucogenesis. *Annu Rev Physiol* 52:157–76.
- Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W., Hole, R. (1996).** Influence of dietary glu can and vitamin Con non-specific and specific immune responses of rainbow trout *Oncorhynch us mykiss*. *Aquaculture* 143,123–133.
- Vijayan M. M. & Moon T. W. (1994).** The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost: the sea raven. *Can J Zool* 72, 379-386.
- Viswanathan K., Daugherty C., Dhabhar F. S. (2005).** Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. *International Immunology*, 17, 1059-1069.
- Vizzini A., Vazzana M., Cammarata M., Parrinello N. (2007).** Peritoneal cavity phagocytes from the teleost sea bass express a glucocorticoid receptor (cloned and sequenced) involved in genomic modulation of the in vitro chemiluminescence response to zymosan. *Gen Comp Endocrinol*. 150, 114-123.
- Wagner G.N., Balfry S.K., Higgs D.A., Lall S.P., Farrell A.P. (2004).** Dietary fatty acids composition affects the repeat swimming performance of Atlantic salmon in seawater, «*Comparative Biochemistry and Physiology (A)*», 137, pp. 567-576.
- Wang K.J., Cai J.J., CaiL., Qu H.D., Yang M., Zhang M. (2009).**Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide. *Peptides*
- Wardle C.S., Videler J.J., Altringham J.D. (1995).** Tuning in to fish swimming waves: body form, swimming mode and muscle function, «*The Journal of Experimental Biology* », 198, pp. 1629-1636.
- Webb P.W. (1984).** Body form, locomotion and foraging in aquatic vertebrates, «*American Zoologist*», 24, pp. 107-120.
- Weeks B. A., Keisler A.S., Warinner J.E., Matthews E.S. (1988).** Preliminary evaluation of macrophage pinocytosis as a technique to monitor fish health. *Mar. Environ. Res.* 22, 205-231.
- Wendelaar Bonga S.E. (1997).** The stress response in fish. *Physiol Rev*; 77. 591-625.
- Weyts F. A. A., Flink G., Rombout J. H. W. M. & Verburg-van Kemenade B. M. L. (1998).** Cortisol induces apoptosis in activated B cells, not in other lymphoid cells of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev Comp Immunol* 22, 551-562.
- Whyte SK. (2007).** The innate immune response of finfish: a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol* 23:1127–51.

Wingfield J. C. (2003). Control of behavioural strategies for capricious environments. *Anim. Behav.* 66:807–815.

Wolter C, Arlinghaus R (2004). Burst and critical swimming speed of fish and their ecological relevance in waterways. In: Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei (IGB) (ed) Annual report 2003, pp 77–93

Wood A.W., Johnston B.D., Farrell A.P., Kennedy C.J. (1996). Effects of didecyltrimethylammonium chloride (DDAC) on the swimming performance, gill morphology, disease resistance, and biochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), «Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences», 53, pp. 2424-2432.

Yamamoto, N. (2004). Vitamin D and the immune system. In: Roitt IM, Delves PJ, editors. *Encyclopedia of immunology*. London: Academic Press, 2494–2499.

Yin G., Ardó, L., Thompson, K.D., Adams, A., Jeney, Z., Jeney, G. (2009). Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 26, 140–145.

Yoshida T., Sakai, M., Kitao, T., Khlil, S.M., Araki, S., Saitoh, R., Ineno, T., Inglis, V. (1993). Immunomodulatory effects of the fermented products of chicken egg, EF203, on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 109, 207–214.

Yoshikawa T, Imada T, Nakakubo H, Nakamura N, Naito K. (2001). Rat mast cell protease-I enhances immunoglobulin E production by mouse B cells stimulated with interleukin-4. *Immunology*, 104:333–40.

Zapata A., Chibá A., Varas A. (1996). Cells and tissues of the immune system of fish. In: Iwama G, Nakanishi T (Eds.). *The Fish Immune System Organism Pathogen and Environment*, Academic Press, San Diego p. 1–62.

Zayan R. (1991). The specificity of social stress. *Behav Process* 25: 81-93

Zelikoff JT, Raymond A, Carlson E, Li Y, Beaman JR, Anderson M.(2000). Biomarkers of immunotoxicity in fish: from the lab to the ocean. *Toxicol Lett* 112-113:325–31.

Zelikoff JT. (1994). Fish immunotoxicology. In: Dean JH, Luster MI, Munson AE, Kimber I (Eds.). *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, New York: p. 71–89.

Zelikoff JT. (1993). Metal pollution-induced immunomodulation in fish. *Annu Rev* 3:305–25

Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G. (2008). Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta* 606:135–50.