



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente

Espressione genica della glutathione perossidasi 1 in *Trematomus bernacchii* come risposta fisiologica alle variazioni della temperatura ambientale

Relatore: Prof.ssa Paola Irato
Dipartimento di Biologia

Correlatrice: Dott.ssa Elisabetta Piva
Dipartimento di Biologia

Laureando/a: Letizia Frison
N° di matricola: 1224184

Anno Accademico 2021/2022

| INDICE | Pag. |
|---|-------------|
| 1. INTRODUZIONE | 1 |
| 1.1. L'Antartide | 1 |
| 1.2. I cambiamenti climatici | 3 |
| 1.3. I pesci antartici | 5 |
| 1.4. Lo stress ossidativo | 8 |
| 1.5. Le glutazione perossidasi | 9 |
| 1.5.1. Glutazione perossidasi - 1 | 10 |
| 2. SCOPO DELLA TESI | 11 |
| 3. MATERIALI E METODI | 12 |
| 3.1. Organismi utilizzati | 12 |
| 3.2. Estrazione dell'RNA totale | 13 |
| 3.3. Purificazione e precipitazione dell'RNA con LiCl | 14 |
| 3.4. Analisi della purezza dell'RNA | 14 |
| 3.5. Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA | 15 |
| 3.6. Verifica dell'efficienza di appaiamento dei primer | 16 |
| 3.7. PCR quantitativa (qRT-PCR) | 17 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE | 20 |
| 4.1. Confronto tra temperature | 20 |
| 4.2. Confronto tra tessuti | 21 |
| 5. CONCLUSIONI | 23 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | I |

1. INTRODUZIONE

1.1 L'ANTARTIDE

L'Antartide è un continente ubicato nell'emisfero australe della Terra, composto da una zona continentale e una oceanica che la circonda.

Opposto all'Artide, al suo centro è stato individuato il polo Sud geografico del pianeta, ovvero il punto di intersezione della superficie terrestre con il suo asse di rotazione; per questo motivo, la regione antartica riceve la radiazione solare principalmente per soli sei mesi all'anno.

Il continente è diviso in due dai Monti Transantartici, che permettono di distinguere l'Antartide Orientale da quello Occidentale. La temperatura continentale raramente supera gli 0°C e ciò, insieme al clima ventoso e arido, preclude la presenza di fauna ittica in questa zona, rilegandola esclusivamente all'ambiente marino. Il 98% della superficie è ricoperta da una calotta di ghiaccio, formata dalla neve accumulata nel corso dei millenni, che si estende ininterrotta anche al di sopra delle acque marine e che subisce fluttuazioni stagionali nel suo spessore (**PNRA**); con 30 milioni di km², i ghiacci dell'Antartide costituiscono il 90% della criosfera terrestre (**Frezzotti, 1995**).

L'ambiente marino, che prende il nome di Oceano Antartico od Oceano Australe, è costituito dalla fusione delle estremità meridionali degli Oceani Pacifico, Atlantico e Indiano ed è delimitato a Nord dalla Convergenza Antartica (Figura 1).



Figura 1. Mappa del continente antartico. (British Antarctic Survey)

La Zona di Convergenza Antartica (ACZ) è un anello circumpolare individuabile tra i -60° e i -50° di latitudine, determinato da un fronte tra due masse d'acqua (quella antartica e quella subantartica) con flusso potenziale superficiale diverso (Hall, 2005), quindi macroscopicamente non miscibili e con caratteristiche chimico-fisiche differenti. Dal punto di vista della circolazione termoalina, acqua profonda, più calda e salata proveniente dalla zona subantartica, sale in superficie raffreddandosi e arricchendosi di ossigeno, dando origine all'acqua antartica, più fredda e meno salata. Questa fascia, spesso tra i 30 e i 50 km, è determinata dalla presenza della Corrente Circumpolare Antartica (ACC) (Figura 2), una corrente oceanica che circonda l'Antartide con flusso in senso orario, tra le più forti e influenti a livello globale e che isola il continente antartico, permettendo la costanza e la peculiarità delle sue caratteristiche climatiche ed ecologiche. Essa costituisce inoltre una barriera oceanografica naturale per la migrazione sia in entrata che in uscita, diventando nel tempo un punto chiave per l'evoluzione della fauna che abita questa regione (Di Prisco et al., 2012).

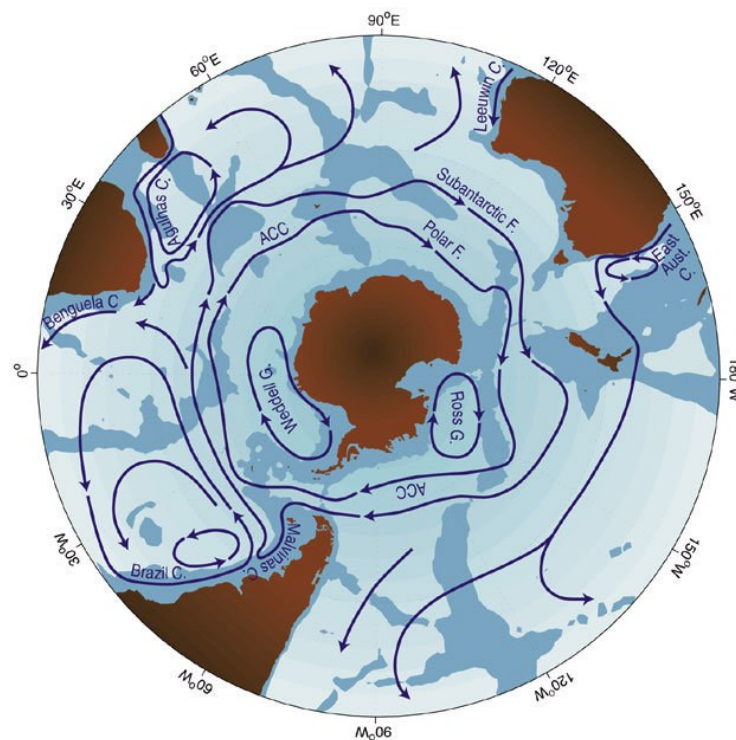


Figura 2. Rappresentazione dell'andamento della Corrente Circumpolare Antartica (ACC) con i suoi due fronti (polare e subantartico). (Albertella e Rummel, 2014)

A Sud di questo anello, ovvero nel vero e proprio Oceano Antartico, l'acqua ha una temperatura pressoché costante da superficie a fondale, con variazioni massime di $4-5^\circ\text{C}$; le acque superficiali subiscono oscillamenti termici stagionali di meno di 2°C tra inverno ed estate australi. Anche le acque in prossimità delle coste hanno queste caratteristiche, con temperature sempre inferiori al punto di congelamento e che si mantengono stabili attorno ai $-1,86^\circ\text{C}$ per tutta la durata dell'anno, senza variazioni verticali e stratificazione termica.

Le caratteristiche termiche descritte influenzano naturalmente alcune proprietà di queste acque, come ad esempio densità e viscosità, ma di particolare interesse è la solubilità dei gas. Essendo questo parametro inversamente proporzionale alla temperatura, la concentrazione dei gas in queste acque è elevata, con concentrazioni di O₂ che variano dal 74% al 105% nel Canale McMurdo, circa 1,6 volte la quantità presente in acque a 20°C. In relazione alla temperatura, un elemento che influenza in maniera rilevante l'ambiente marino è il ghiaccio, in quanto il suo ciclo stagionale di formazione e scioglimento è determinante per la concentrazione dei sali, che si aggira in media attorno al 34-35‰, per l'apporto di luce e dunque per la produzione primaria (**Eastman, 2013**).

In questo contesto ambientale, stabile e costante, sono rilevabili ricche quantità di biomassa ed elevata biodiversità.

1.2 I CAMBIAMENTI CLIMATICI

Dalla formazione della Terra, le sue condizioni climatiche e i fattori che la influenzano hanno subito variazioni continue, con esempi che vanno dall'iniziale debole radiazione che proveniva dal Sole, al successivo incremento dell'azione dei gas serra, alle ere glaciali, fino a circa 100 milioni di anni fa, l'epoca in cui vissero i dinosauri, in cui la temperatura media del pianeta era di 14°C superiore a quella odierna. Successivamente, tra i 50 e i 10 milioni di anni fa le temperature si sono abbassate nuovamente e hanno permesso la formazione delle calotte polari, prima quella antartica e in seguito quella artica. Le bolle di aria presenti nei ghiacciai hanno permesso agli scienziati di ricostruire come la composizione atmosferica è variata nei millenni e l'analisi isotopica del ghiaccio stesso ha consentito di identificare le fluttuazioni termiche avvenute nel contesto della sua formazione, in quanto temperature minori hanno come conseguenza la presenza di una frazione maggiore di isotopi dell'acqua più leggeri.

Alle variazioni termiche identificate sono state attribuite tre cause principali:

1. La variazione nei parametri orbitali della Terra attorno al Sole ("Cicli di Milanković")
2. La composizione chimica dell'atmosfera (in particolare la concentrazione di CO₂ e di altri gas serra) (Figura 3)
3. L'azione di assorbimento chimico e termico degli oceani

Gli elementi 2 e 3 sono strettamente correlati tra loro e si influenzano vicendevolmente in modo continuo.

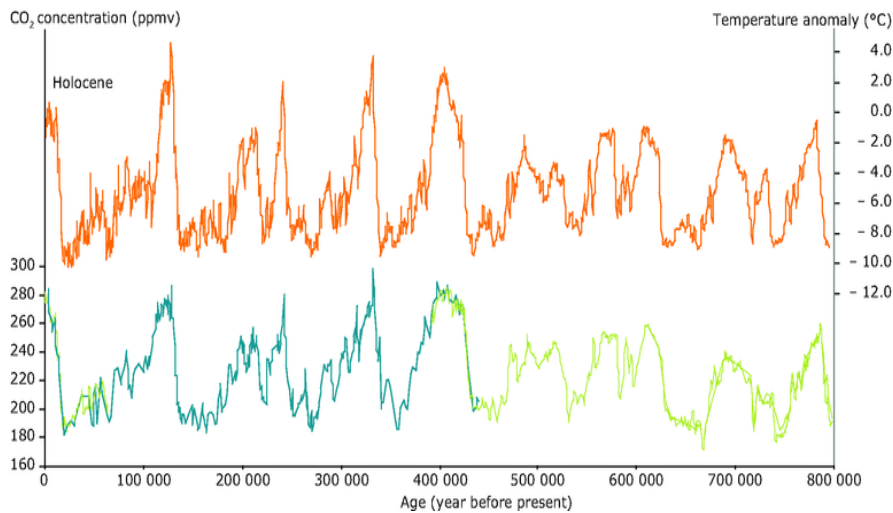


Figura 3.
Andamento della
concentrazione
atmosferica di
CO₂ e della
temperatura in
Antartide negli
ultimi 800000
anni. (European
Environment
Agency, 2009)

I cambiamenti climatici sono dunque sempre avvenuti nel corso della storia del pianeta, con periodi caratterizzati da temperature elevate che si sono susseguiti ad ere in cui queste si sono abbassate a livelli glaciali. Nelle epoche intermedie a questi estremi, le condizioni climatiche rimasero stabili ed è in questo contesto che si sono evolute e sviluppate le civiltà umane. Nel corso della storia dell'uomo, variazioni termiche e ambientali si sono verificate localmente, comportando la scomparsa regionale di diverse culture, ma la situazione odierna risulta essere su un altro livello. Quello che distingue il fenomeno attuale dalle epoche intermedie precedenti è il fatto che per la prima volta il cambiamento climatico sta avendo effetti a livello globale, con una magnitudine senza precedenti nella storia umana.

Per comprenderne in modo generale la causa, è importante considerare che strettamente legata alla temperatura terrestre è la concentrazione atmosferica di CO₂. Entrambi questi fattori nell'ultimo secolo sono aumentati in maniera continua e molto più rapida rispetto a quanto è avvenuto in passato nei diversi cicli verificatisi in modo naturale (Figura 4). Questo fenomeno mette in risalto la necessità di capire di come e se gli ecosistemi riusciranno ad adattarsi a cambiamenti così repentini e quali saranno gli esiti che questi avranno sul futuro della Terra.

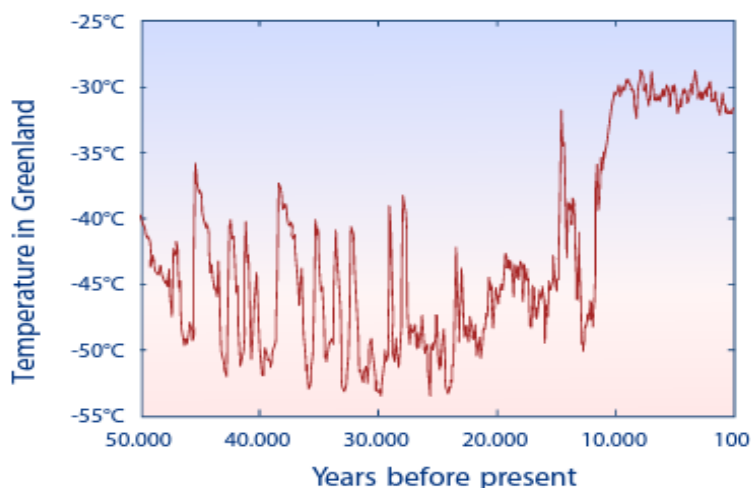


Figura 4.
Fluttuazioni della
temperatura in
Groenlandia negli
ultimi 50000 anni.
(Notz, 2020)

La certezza della correlazione tra l'attività umana e l'attuale cambiamento climatico e della causalità della prima rispetto al secondo si ha grazie ai dati raccolti negli ultimi secoli, che mostrano una coincidenza tra l'industrializzazione, l'aumento della concentrazione di CO₂ atmosferica che ne deriva e l'innalzamento delle temperature. Inoltre, grazie agli esistenti modelli climatici, si è potuto concludere che, anche considerando driver naturali come l'attività solare e le eruzioni vulcaniche, in assenza dell'azione umana degli ultimi secoli non ci sarebbero stati fenomeni di riscaldamento rilevanti rispetto alle condizioni ad essa precedenti. È stato stimato che le emissioni antropogeniche abbiano causato un riscaldamento di circa 1°C rispetto ai livelli preindustriali, un trend che sta attualmente continuando, con un aumento previsto di 0,2°C per decennio, con effetti che persisteranno per secoli o addirittura millenni (**Notz, 2020**).

Le previsioni climatiche riguardanti il prossimo secolo vedono un aumento della temperatura tra i 2°C e i 5°C entro il 2100, e la gravità di questa prospettiva risulta chiara se la si paragona agli effetti che variazioni anche minori hanno avuto a livello globale in passato, basti pensare al Periodo Caldo Medievale (+0,5°C) o alla Piccola Era Glaciale (-1°C) (**Archer, 2011**). L'obiettivo posto dalle nazioni è quello di mantenerlo al di sotto di +1,5°C, valore il cui raggiungimento è stimato tra il 2030 e il 2052. Le conseguenze per i sistemi naturali e umani sono naturalmente peggiori per un riscaldamento globale di 1,5° a confronto con la situazione attuale, ma rimangono minori rispetto a un aumento fino a 2°C (valore minimo previsto in assenza di azioni di mitigazione) (**IPCC, 2018**).

L'influenza del cambiamento climatico sulla fenologia e sulla fisiologia delle specie è un ambito già molto studiato e documentato, ma previsioni sul rischio di estinzione di alcune specie basate sugli effetti osservati del fenomeno climatico sono molto più complesse da fare. Molti dei modelli utilizzati finora considerano solo i cambiamenti a livello regionale e la qualità e quantità di habitat adeguati, mentre l'integrazione di fattori come la distribuzione delle specie, la loro persistenza o la loro abbondanza è ancora insufficiente o non abbastanza approfondita, rendendo poco chiara l'affidabilità delle predizioni per quanto riguarda la probabilità di estinzione (**Fordham et al., 2012**). È comunque evidente che il fenomeno del riscaldamento globale è reale e in continua crescita e, per quanto i suoi effetti sul futuro degli organismi che abitano il pianeta non siano di immediata deducibilità, le informazioni e i dati già ora disponibili rendono la visione dell'avvenire tutt'altro che ottimistica.

1.3 I PESCI ANTARTICI

Al momento sono 322 le specie di pesci antartici riconosciuti, appartenenti a 50 famiglie, un numero apparentemente piccolo a confronto con la diversità di questi organismi a livello globale, ma in questo contesto risulta assai più rilevante soffermarsi sulla quantità assoluta più che su quella relativa. Tra

tutte queste specie risultano infatti dominare, per numerosità (Figura 5) e per diversità ecologica e morfologica, quelle appartenenti al sottordine dei Notothenioidei. I pesci appartenenti a questo sottordine di Perciformi sembrano essersi sviluppati nella regione antartica tramite una radiazione adattativa definita “species flock”, ovvero un assemblamento di un numero elevato di specie con relazione filogenetica molto stretta, evolutesi in modo rapido in un’area circoscritta in cui la maggior parte delle specie sono endemiche, tipica solitamente di ambienti considerati hotspot ecologici. Questo permette di classificare l’ambiente marino antartico, in particolare quello più prossimo alle coste, come un sito evolutivo unico.

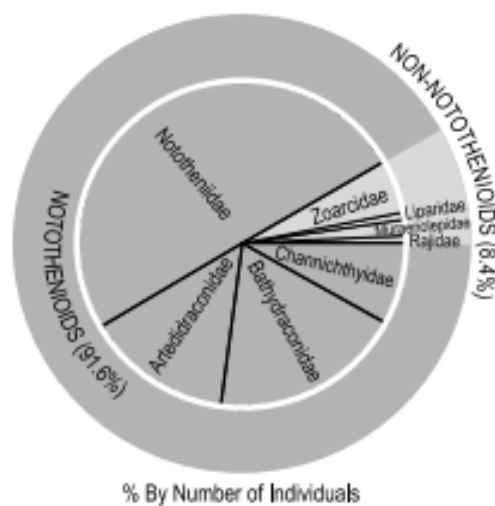


Figura 5. Grafico a torta che rappresenta la suddivisione tassonomica della fauna ittica nei banchi di ghiaccio antartici, riportata in percentuale del numero di individui. (Eastman, 2005)

Per comprendere il motivo della presenza così prevalente di pesci appartenenti al sottordine dei Notothenioidei, bisogna considerare la storia evolutiva del continente antartico. Grazie a fossili ritrovati *in situ*, è stato possibile studiare la fauna presente in Antartide durante le diverse ere geologiche e si è notato che le specie che abitavano questo territorio durante l’Eocene (40 milioni di anni fa), erano diverse da quelle che vi si possono trovare al giorno d’oggi. Grazie ai ritrovamenti nella formazione Meseta sull’Isola di Seymour, prossima alla punta della Penisola Antartica, è stato possibile constatare che i pesci che vi vivevano allora avevano caratteristiche tipiche di climi più temperati, con temperature paragonabili a quelle che oggi si trovano a meridione del Sud America e non antenati dei moderni Notothenioidei. Successivamente, agli inizi del Miocene (tra i 25 e i 22 milioni di anni fa), il territorio antartico subì una serie di eventi tettonici e oceanografici che ne comportarono un maggiore isolamento e raffreddamento, con un accrescimento importante della calotta di ghiaccio e una conseguente alterazione della fauna. A causa della perdita di habitat e di cambiamenti nella struttura trofica dell’ecosistema, la diversità delle specie venne ridotta e molte specie presenti dall’Eocene si estinsero, liberando nuove nicchie trofiche e rendendole disponibili a gruppi che si stavano sviluppando o che erano recentemente immigrate nel sito. Tra queste, spiccarono le specie appartenenti ai Notothenioidei, pesci bentonici di fascia costiera e quindi appartenenti a un habitat generalmente più

stabile e meno soggetto a cambiamenti drastici. La Convergenza Antartica, sviluppatasi attorno allo stesso periodo, definì ulteriormente questo fenomeno, contribuendo all'isolamento dell'ambiente marino antartico da quello circostante e di conseguenza all'estinzione degli organismi che non poterono più emigrare al di fuori di essa e non furono in grado di adattarsi al nuovo habitat (**Eastman, 2005**).

Per poter sopravvivere in questi ambienti freddi, i Notothenioidei sono andati incontro a numerosi adattamenti. Un esempio è la riduzione dell'ematokrito e dell'ossificazione nello scheletro e nelle branchie, favorendo una maggiore composizione cartilaginea di queste strutture, in risposta alla crescente viscosità del mezzo acquatico. È stata inoltre implementata la produzione e distribuzione di glicoproteine con azione antigelo nei fluidi intra ed extracellulari. In aggiunta, lo scheletro prevalentemente cartilagineo, insieme a un aumento della quantità e dello spessore dei depositi lipidici, ha permesso loro di sopperire alla perdita della vescica natatoria nell'attività di galleggiamento. Oltre a ciò, grazie all'elevata solubilità di O₂ nelle fredde acque antartiche e di conseguenza nei fluidi corporei, la concentrazione di emoglobina nel sangue è stata ridotta, così come il tasso metabolico. Questo fenomeno è stato portato all'estremo nella famiglia dei *Channictyidae*, che ha subito la perdita totale dell'emoglobina (**Clarke e Johnston, 1996**). Infine, data la stabilità termica dell'ambiente, è stata inibita l'espressione delle *heat-shock proteins*, molecole prodotte tipicamente dagli organismi come meccanismo di risposta allo stress indotto dall'esposizione a elevate temperature, che proteggono le proteine da denaturazione termica (**Hofmann et al., 2000**).

La specie considerata nel contesto di questo studio è *Trematomus bernacchii* (Figura 6), un teleosteo appartenente alla famiglia dei Notothenioidei, epibentico, di dimensioni comprese tra 50 e 260 mm e che si nutre principalmente di uova di altri pesci, alghe, isopodi, anfipodi, molluschi, coralli e spugne (**DeWitt et al., 1990**). Si può trovare fino a 600-730 m di profondità, ma più comunemente nei primi 200 m. Gli adulti depositano le proprie uova sul fondale o in prossimità di spugne, attuando verso di essere forme di cure parentali. Essendosi evoluti in un contesto ambientale termicamente costante, essi sono stenotermi e hanno una resistenza molto bassa all'aumento della temperatura; infatti, è stato osservato che in questa specie la morte per shock termico avviene all'incirca attorno ai 6°C (**Brueggeman, 2022**).



Figura 6. Esempari di *T. bernacchii*. Foto di Piva, E. 2022

1.4 LO STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo è una condizione a cui vanno incontro gli organismi quando sono esposti a specie reattive dell'ossigeno (ROS), che possono causare il danneggiamento di proteine, acidi nucleici e membrane cellulari con cui entrano in contatto. Per contrastare l'effetto di queste interazioni, gli organismi producono a livello cellulare enzimi antiossidanti che eliminano le molecole dannose e riparano i danni da esse causati, come ad esempio superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutatione perossidasi (GPx) e perossiredosine (Prx).

Le specie reattive dell'ossigeno (Tabella 1) comprendono specie radicaliche (radicali superossido $O_2^{\bullet-}$, idrossile $\bullet OH$, perossile RO_2^{\bullet} , idroperossile HO_2^{\bullet} e alcossile RO^{\bullet}) e non radicaliche (idroperossidi organici $ROOH$, perossido di idrogeno H_2O_2 , acido ipocloroso $HOCl$, ozono O_3 e ossigeno singoletto 1O_2) (Bayr, 2005).

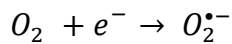
| ROS | Formula |
|-------------------------------|------------------|
| Specie radicaliche | |
| Superossido | $O_2^{\bullet-}$ |
| Idrossile | $\bullet OH$ |
| Perossile | RO_2^{\bullet} |
| Idroperossile | HO_2^{\bullet} |
| Alcossile | RO^{\bullet} |
| Specie non radicaliche | |
| Idroperossidi organici | $ROOH$ |
| Perossido di idrogeno | H_2O_2 |
| Acido ipocloroso | $HOCl$ |
| Ozono | O_3 |
| Ossigeno singoletto | 1O_2 |

Tabella 1. Specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Per gli organismi con metabolismo aerobico, è impossibile evitare la formazione di ROS, in quanto alcune di queste dannose specie chimiche sono intermedi reattivi prodotti, in modo diretto o indiretto, in reazioni in cui l'ossigeno molecolare agisce da ossidante nella catena di trasporto degli elettroni a livello mitocondriale. Inoltre, le ROS sono talvolta prodotte perché utili in processi come reazioni enzimatiche, trasduzione dei segnali, espressione genica e azione antimicrobica di neutrofili e macrofagi.

Queste specie sono altamente instabili e reattive, il che rende la loro durata di vita molto breve, e tendono a rubare un elettrone da altre molecole, ossidandole (**Storz e Imlay, 1999**).

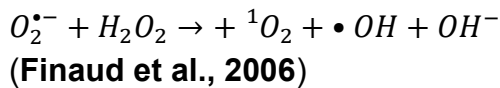
Il radicale superossido si forma durante la reazione che avviene nei mitocondri in cui la molecola di O_2 sottrae due elettroni da quella che la precede nella catena. Essa però tende a riceverne uno alla volta, trasformandosi temporaneamente in $O_2^{\bullet-}$; come conseguenza, una quantità compresa tra il 2-5% dell'ossigeno consumato rimane in questa forma.



La reazione di Fenton è all'origine della formazione del radicale idrossido e del perossido di idrogeno. Essa è suddivisa in quattro fasi:

1. $O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow O_2^{\bullet}H$
2. $O_2^{\bullet}H + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
3. $Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$
4. $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$

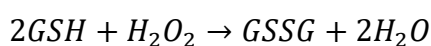
Un'altra reazione rilevante per la formazione e deplezione di ROS è quella di Haber-Weiss:



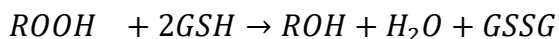
In condizioni normali, gli enzimi antiossidanti vengono prodotti con un tasso basso, in quantità sufficienti da contrastare la consueta produzione di ROS, ma in risposta ad elevate concentrazioni delle specie reattive, potenziale conseguenza di stress meccanico e termico, radiazioni ionizzanti ed elevate pressioni parziali di O_2 , può essere indotta una maggiore produzione di queste proteine.

1.5 LE GLUTATIONE PEROSSIDASI

Le glutatione perossidasi sono una famiglia di enzimi appartenenti al gruppo delle ossidoreduttasi. Ne esistono 8 isoforme, ma solo 5 di queste contengono un residuo di selenocisteina, cofattore che permette loro di esplicare la loro azione catalizzatrice (**Colangelo, 2015**). La loro funzione principale è quella di catalizzare la decomposizione del perossido di idrogeno, con consumo di glutatione (GSH) come co-substrato e produzione di glutatione disolfuro (GSSG):



Oltre a questa reazione, le GPx catalizzano anche la deplezione degli idroperossidi, con consumo di glutatione e produzione di alcoli e glutatione disolfuro, secondo la generale reazione



Questi enzimi svolgono quindi un'importante funzione antiossidante e l'isoforma GPx-1 è la più rilevante dal punto di vista quantitativo sotto questo aspetto. La loro presenza è particolarmente importante nelle cellule o nei compartimenti cellulari carenti di catalasi o di altre attività che svolgono la stessa funzione, come il compartimento citosolico e i mitocondri (Flohé, 1988). In aggiunta, le GPx contribuiscono a proteggere l'integrità delle membrane biologiche da perossidazione lipidica, eliminando idroperossidi lipidici ivi presenti.

1.5.1 GLUTATIONE PEROSSIDASI – 1

Studi precedenti hanno dimostrato che la storia evolutiva dei geni codificanti le GPx è molto complessa, in quanto è il risultato di eventi evolutivisti indipendenti, con caratteristiche di convergenza funzionale. È stato ipotizzato che GPx-1, -2, -3, -5 e -6 abbiano un gene antenato comune, diversamente da GPx-4.

In *T. bernacchii* l'espressione della GPx-1 (Figura 7) presenta un'elevata variabilità nei vari tessuti ed è più abbondante nel fegato, nel miocardio e negli eritrociti, rispetto ad altri tessuti come branchie e muscolo. Considerando in primo luogo l'elevata presenza di accumuli lipidici in questi organismi e il fatto che gli acidi grassi insaturi sono facilmente soggetti ad attacchi da parte di specie radicaliche dell'ossigeno, e secondariamente il fatto che nei Notothenioidei il metabolismo energetico aerobico dipende in modo prevalente dall'ossidazione di lipidi insaturi presenti nel cuore e nel fegato, si può ipotizzare che la maggiore presenza e attività della GPx-1 nei tessuti epatico e cardiaco sia legata ai suddetti fattori (Sattin et al., 2015).



Figura 7. Rappresentazione 3D della struttura di GPx-1 in *O. macrolepis*. (Yu et al., 2021)

2. SCOPO DELLA TESI

In questa tesi è stata analizzata l'espressione genica dell'enzima glutatione perossidasi-1 (GPx-1) nei tessuti di fegato e muscolo di alcuni esemplari di *Trematomus bernacchii*. In particolare, sono stati studiati 4 individui acclimatati ad una temperatura di +1°C e 4 attlimatati a +3°C.

Questo studio risulta particolarmente interessante perché la specie di Notothenioidei presa in considerazione vive in un contesto ambientale particolare, ovvero quello marino antartico. Qui le temperature sono costanti e si aggirano attorno ai -2°C, dunque le specie che ci vivono hanno dovuto affrontare adattamenti fisiologici di carattere stenotermico per poter sopravvivere in questo habitat. Nello specifico, in queste acque la solubilità dei gas è elevata e, per il nostro studio, di particolare interesse è l'ossigeno. Una maggiore concentrazione di O₂ nei fluidi corporei degli organismi ha come conseguenza una maggiore probabilità di formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), dunque l'ottimizzazione della risposta fisiologica allo stress ossidativo è stata chiave per la sopravvivenza degli individui.

In previsione dell'aumento delle temperature dovuto al riscaldamento globale e ai cambiamenti climatici, è importante considerare come questi fenomeni potranno influenzare le risposte fisiologiche e comportamentali delle specie viventi, e dunque la loro sopravvivenza, soprattutto in contesti ambientali unici e particolari come quello antartico. Lo studio è stato effettuato sulla specie *T. bernacchii* in quanto è ampiamente diffusa sulle zone costiere antartiche e può essere sfruttata come organismo bioindicatore. Come specie stenoterma, la simulazione delle variazioni termiche che subirà l'ambiente in cui vive negli anni a venire può dare indicazioni particolarmente rilevanti sull'adattabilità di questi organismi e sul loro futuro dal punto di vista evolutivo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 ORGANISMI UTILIZZATI

Gli organismi utilizzati per questo studio sono esemplari di *T. bernacchii*, appartenenti all'ordine dei Perciformi, sottordine Notothenioidei. Gli individui sono stati catturati a Baia Terra Nova nel mare di Ross (74° 42' S, 164° 7' E) su cui si affaccia la stazione "Mario Zucchelli" (Figura 8), base dell'ENEA (agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo) per il PNRA (Progetto Nazionale di Ricerche in Antartide).

Il campionamento degli esemplari studiati è avvenuto durante la XVII spedizione italiana in Antartide nel contesto della Campagna Antartica Estate Australe 2001-2002. I campioni studiati fanno parte di quelli raccolti dal Prof. G. Santovito (Università di Padova) per un esperimento a lungo termine che riguardava la valutazione degli effetti dei cambiamenti di temperatura sulla specie. Gli individui sono stati inseriti in vasche termostate (Figura 9) in cui la temperatura è stata portata da -2°C a 5°C in 25 giorni, con incrementi di 0,1°C ogni 2 ore. Ogni volta che veniva raggiunto un incremento di 1°C, gli animali venivano mantenuti in questa condizione per un giorno, dopodiché venivano sacrificati 4 esemplari e con gli altri si procedeva, come prima, agli incrementi graduali ogni due ore. Dagli individui sacrificati sono stati prelevati sangue, cervello, cuore, fegato, gonadi, reni, branchie e muscolo scheletrico, tessuti che sono poi stati congelati in azoto liquido e stoccati a -80°C per poi essere inviati in Italia (**PNRA, 2002**).

Per questa tesi sono stati utilizzati campioni di muscolo e fegato prelevati dagli individui acclimatati a temperature di +1°C e +3°C.



Figura 8. Stazione "Mario Zucchelli". Foto di Lo Giudice, A. (CNR-ISP)



Figura 9. Vasche con campioni di *T. bernacchii* esposti a variazioni della temperatura ambientale. Foto di Santovito, G. 2001

3.2 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

L'RNA totale è stato estratto mediante il metodo TRIzol con l'uso del reagente PRImeZOL, contenente una miscela di fenolo, guanidina tiocianato e altri reagenti che permettono la rottura delle cellule e la separazione dell'RNA totale dalle altre componenti cellulari.

Il primo step è stato l'omogenizzazione, in cui 100 mg di ogni tessuto sono stati inseriti in microprovette Eppendorf da 1,5 ml insieme a 1ml di PRImeZOL e poi sminuzzati con l'uso di un pestello.

A seguire, i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente e ad essi sono stati aggiunti 0,2 ml di cloroformio 99%. Le microprovette sono state poi centrifugate a 4°C per 15 minuti a 13000 rcf. L'aggiunta di questo reagente ha permesso che avvenisse una separazione di 3 fasi: una superiore acquosa contenente RNA, una intermedia con proteine denaturate e DNA e una inferiore contenente PRImeZOL e la restante fase organica (Figura 10.a).

Prelevata la fase acquosa sovrastante e trasferita in un'altra microprovetta, si sono aggiunti 0,5 ml di isopropanolo ed è stata fatta una centrifugazione con parametri e durata uguali alla prima. Questo passaggio ha avuto come risultato la precipitazione dell'RNA sotto forma di *pellet* (Figura 10.b), sottoposto poi a due lavaggi con 1 ml di una soluzione di etanolo 75% in acqua. Il pellet è stato poi asciugato sotto cappa a flusso laminare.

Successivamente l'RNA estratto è stato risospeso in acqua *RNAsi-free* in quantità proporzionale al volume di pellet ottenuto e fatto incubare a temperatura ambiente per 2 ore.

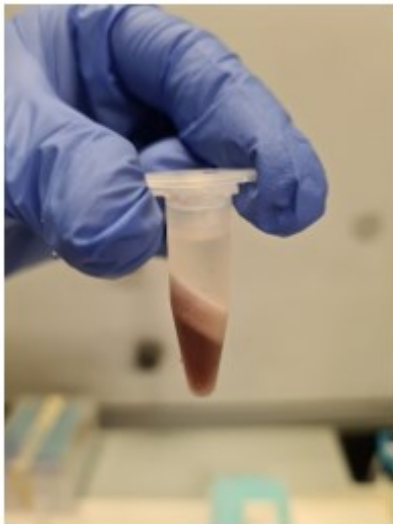


Figura 10.a Separazione delle 3 fasi in seguito all'aggiunta di cloroformio. Foto di Pacchini, S. 2022



Figura 10.b. RNA precipitato sotto forma di pellet. Foto di Pacchini, S. 2022

3.3 PURIFICAZIONE E PRECIPITAZIONE DELL'RNA CON LiCl

L'RNA risospeso è stato incubato in bagnetto d'acqua calda (40°C) per 5 minuti e poi centrifugato. Il supernatante ottenuto è stato poi fatto precipitare con una soluzione di LiCl 8M, in un volume corrispondente a 1/3 dell'*H₂O RNAsi-free* utilizzata in precedenza, e incubato *overnight* in ghiaccio a 4°C. Questa procedura è stata svolta con lo scopo di eliminare la possibile presenza di carboidrati residui.

Il giorno seguente il campione è stato centrifugato per 20 minuti a 13000 rcf e il *pellet* formatosi è stato separato dal supernatante e lavato 2 volte con 0,2 ml di etanolo 75%, per poi essere asciugato in cappa a flusso laminare. L'RNA è stato poi risospeso in *H₂O RNAsi-free*, in volume proporzionale a quello del *pellet*, per 2 ore e successivamente incubato in un bagnetto d'acqua calda (55°C).

3.4 ANALISI DELLA PUREZZA DELL'RNA

La stima della qualità dell'estrazione è stata fatta tramite Nanodrop (Figura 11.a), uno spettrofotometro UV-VIS, utilizzando 1 µl di campione. L'analisi è avvenuta osservando i rapporti di assorbanza $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$, i cui valori indicativi di una buona estrazione sono rispettivamente $1,8 < x < 2,2$ e 2,0. Per il rapporto $A_{260/280}$, i risultati $x > 2,2$ sono indice di contaminazione da DNA, mentre $x < 1,8$ suggerisce una contaminazione da proteine; per quanto riguarda il parametro $A_{260/230}$, valori $x < 2$ indicano una contaminazione da peptidi, carboidrati, fenolo o altri componenti aromatici.

L'integrità delle molecole estratte è stata poi verificata mediante elettroforesi in gel d'agarosio all'1% (Figura 11.b).

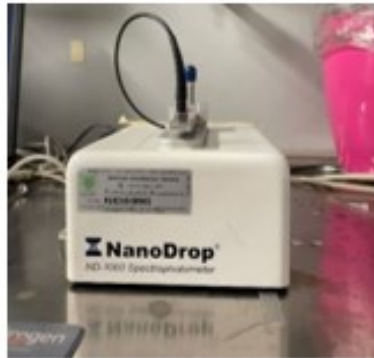


Figura 11.a Strumento utilizzato per la spettrofotometria UV-VIS

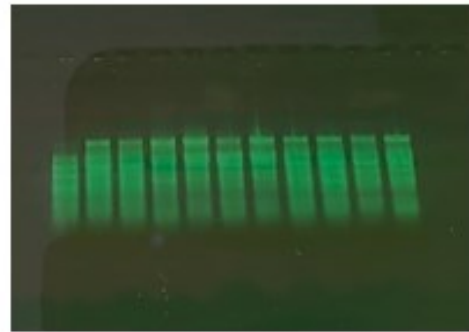


Figura 11.b. Elettroforesi in gel d'agarosio 1%. La struttura e la lunghezza delle bande indicano le dimensioni e l'integrità delle molecole di RNA.

3.5 RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA in cDNA

L'RNA estratto è stato retrotrascritto in cDNA mediante il kit "cDNA synthesis kit" di *Biotechrabbit*, allestendo una mix dei componenti:

- 2,0 μ l dNTP Mix
- 0,5 μ l RNase Inhibitor
- 0,5 μ l Oligo (dT)
- 4,0 μ l 5X cDNA Synthesis Buffer
- 1,0 μ l RNA tot (campione)
- 1,0 μ l Reverse Transcriptase
- 11,0 μ l PCR Grade Water

Per un volume totale di 20,0 μ l.

Le mix così prodotte sono poi state incubate in termociclatore per 1 ora a 50°C perché avvenisse la retrotrascrizione e per 5 minuti a 99°C per inattivare gli enzimi (Figura 12).



Figura 12. Termociclatore. Parametri del ciclo per la retrotrascrizione.

3.6 VERIFICA DELL'EFFICIENZA DI APPAIAMENTO DEI PRIMER

Il cDNA ottenuto è stato utilizzato in un primo momento per verificare il corretto appaiamento dei primer che avremmo utilizzato in seguito. Oltre ai primer corrispondenti ai geni target analizzati, sono stati testati anche quelli per geni housekeeping, utilizzati successivamente per normalizzare i dati ottenuti. Questi erano già presenti in laboratorio poiché utilizzati in precedenza. La procedura è stata svolta inizialmente tramite una prima PCR (polymerase chain reaction) utilizzando il kit "2X YourTaq™ PCR Master Mix" di *Biotechrabbit* secondo le dosi indicate:

- 12,5 µl 2X YourTaq PCR Master Mix (contenente la DNA polimerasi, le dNTP ovvero i nucleotidi utilizzati dall'enzima per costruire le copie del cDNA durante l'amplificazione, e un buffer per la PCR)
- 0,5 µl Fw Primer
- 0,5 µl Rv Primer
- 0,5 µl cDNA (campione)
- 11,0 µl Nuclease-free water

Per un volume totale di 25,0 µl.

I campioni sono poi stati inseriti nel termociclatore che ha svolto il seguente ciclo:

- 2 minuti a 95°C per l'attivazione iniziale
- 30 secondi a 95°C per la denaturazione
- 30 secondi a 57/60/63°C (in base alla posizione nella piastra) per l'accoppiamento
- 30 secondi a 72°C per l'estensione
- 5 minuti a 72°C per l'estensione finale dei prodotti incompleti della PCR

Il ciclo, dallo step 2 al 4, è stato ripetuto per 35 volte (Figura 13).



Figura 13. Termociclatore. Parametri del ciclo per la PCR.

I prodotti di questa procedura sono stati analizzati poi tramite elettroforesi in gel d'agarosio al 2%, aggiungendo ai campioni una *loading dye* e inserendo in un pozzetto una *DNA ladder*, ovvero un marker di dimensione, come riferimento (Figura 14).

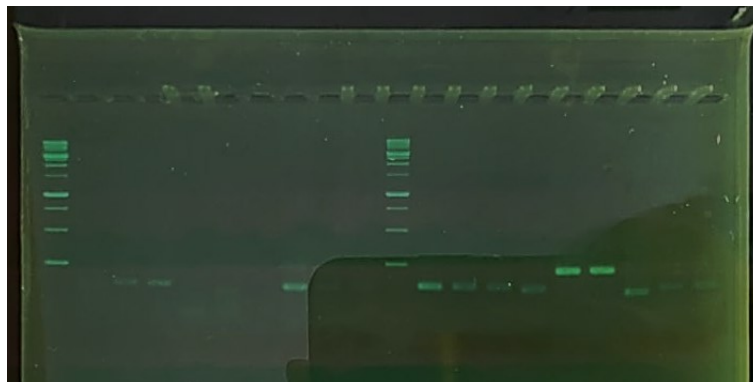


Figura 14. Elettroforesi in gel d'agarosio 2%. La colonna iniziale e quella centrale rappresentano le *ladder*. Le bande singole rappresentano i prodotti della PCR; esse rivelano la quantità di prodotto (intensità della banda) e la correttezza dell'accoppiamento dei primer (numero di bande per colonna).

Un ulteriore test per verificare l'efficienza di appaiamento dei primer è stato fatto tramite qRT-PCR, in cui sono stati inseriti i primer e i cDNA diluiti a diverse concentrazioni per ottenere una retta di taratura. Tra i dati ottenuti dall'amplificazione, di particolare interesse sono i numeri di cicli soglia (Ct). Questo valore è indice della quantità assoluta di analita all'interno della soluzione analizzata e rappresenta il numero di cicli necessari perché lo strumento sia in grado di rilevare un segnale che indichi la presenza della sostanza nel campione. Minore è il Ct, maggiore è la concentrazione rilevata.

3.7 PCR QUANTITATIVA (qRT-PCR)

Una volta confermato il corretto appaiamento dei primer, è stata effettuata un'ulteriore qRT-PCR per l'analisi effettiva dei campioni.

Il kit utilizzato è stato il "2x qPCR SyGreen Mix Separate ROX" di *PCRBIO SYSTEMS*. Le dosi utilizzate sono state le seguenti:

- 5,0 µl di Mix (2x qPCRBIO SyGreen Mix No-ROX + ROX Additive)
- 1,0 µl Fw Primer
- 1,0 µl Rv Primer
- 1,0 µl cDNA (campione)
- 2,0 µl PCR grade water

Per un volume totale di 10 µl.

Con questo procedimento è stata analizzata l'espressione di GPx-1 nei campioni di fegato e muscolo di individui di *T. bernacchi* acclimatati a

temperature di +1°C e +3°C. I dati ottenuti sono stati normalizzati utilizzando il gene *housekeeping* Gapdh. Un gene *housekeeping* codifica proteine coinvolte in processi fondamentali per la vita della cellula, normalmente viene sempre espresso indipendentemente dalle condizioni a cui è sottoposto l'organismo, risulta dunque ideale per normalizzare l'espressione di geni che vengono espressi diversamente in relazione alle diverse condizioni ambientali.

Per ogni campione si sono ottenute una curva di amplificazione e una di dissociazione.

La curva di amplificazione (Figura 15) descrive la quantità di segnale ricevuta dallo strumento in funzione del numero di cicli di PCR. Essa ha andamento sigmoideale, in cui la sezione centrale rappresenta il momento di amplificazione esponenziale della PCR. La pendenza (slope) della curva è indice dell'efficienza dell'amplificazione. Minore è il numero di cicli necessari per il raggiungimento della fase di crescita della curva, maggiore è la concentrazione di analita all'interno del campione.

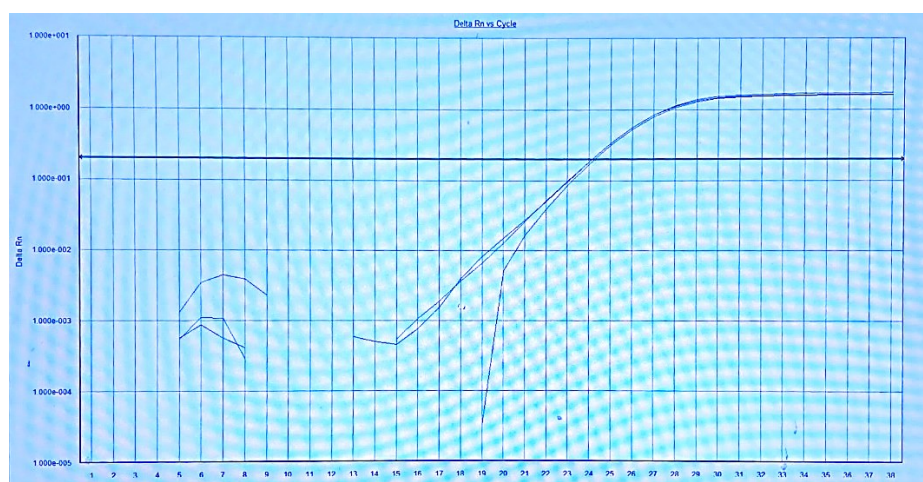


Figura 15. Esempio di curva di amplificazione

La curva di dissociazione (Figura 16) serve per verificare la specificità di amplificazione della qRT-PCR. Essa viene a formarsi in seguito all'aumento incrementale della temperatura al termine dell'amplificazione, il quale causa la denaturazione del cDNA. I reagenti presenti nel campione emettono un segnale solo quando sono legati a un doppio filamento di cDNA, dunque mano a mano che la temperatura aumenta, il segnale prodotto dal campione e registrato dal macchinario tenderà a diminuire. La diminuzione di tale feedback consente di determinare la curva di dissociazione, di cui viene poi plottata la derivata negativa per ottenere un grafico a picco. Il punto di massimo (temperatura di melting, T_m) rappresenta la temperatura a cui il 50% del cDNA è stato denaturato. La T_m è specifica del prodotto di amplificazione, quindi, se la curva presenta più picchi, significa che sono state amplificate altre sequenze oltre a quella target.

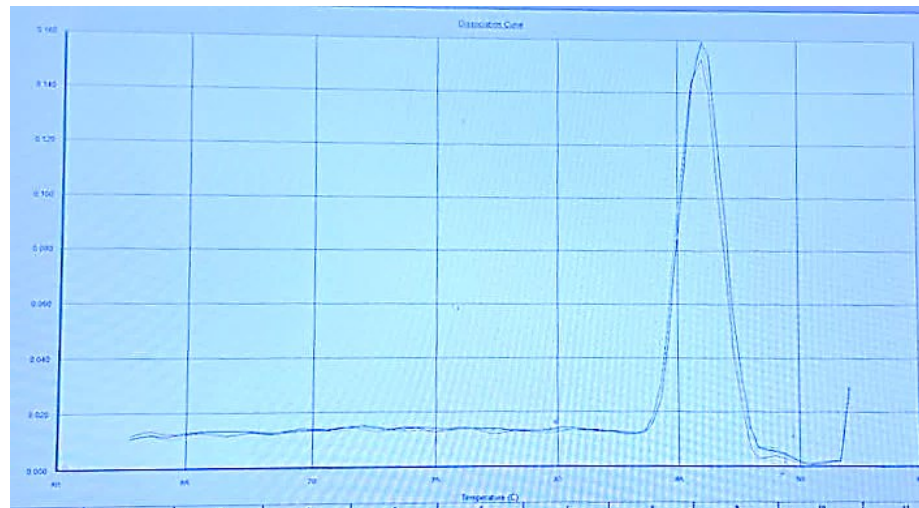


Figura 16. Esempio di curva di dissociazione.

Per analizzare i dati è stato usato il metodo $\Delta\Delta Ct$ (o “metodo Livak”). Questo è un metodo di quantificazione relativa e la procedura consiste in più step. Si calcola inizialmente la differenza di espressione tra il gene di interesse (GPx-1) e quello di *housekeeping* (Gapdh) ($\Delta Ct = Ct_{GPx-1} - Ct_{Gapdh}$) per ogni campione dei due tessuti per ogni individuo alle due diverse temperature. Successivamente, per calcolare il $\Delta\Delta Ct$, si confronta il ΔCt del campione incognito con uno di riferimento (la media tra ΔCt) ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{campione} - \Delta Ct_{rif}$). Infine, si applica la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ per ottenere il rapporto di espressione, che quantifica l’incremento (o decremento) del gene target rispetto al riferimento e normalizzato rispetto al gene *housekeeping*.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nei grafici riportati qui di seguito vengono mostrati i dati risultanti dalla comparazione tra i valori dell'espressione genica del messaggero di GPx-1 nei due tessuti e alle due differenti temperature di esposizione (+1°C, +3°C).

4.1 CONFRONTO TRA TEMPERATURE

In primo luogo, sono stati paragonati i campioni dello stesso tessuto alle due temperature (Figura 17). Dal confronto dell'espressione del messaggero di GPx-1 nel fegato emerge una diminuzione statisticamente significativa ($p=0,000$) di circa il 31% all'aumentare della temperatura da +1°C a +3°C. La diminuzione nei livelli di mRNA a livello del fegato è compatibile con diverse ipotesi. L'aumento della temperatura potrebbe portare all'inattivazione della proteina attiva e dunque ad una minore necessità di espressione del gene che la codifica. Dai dati in letteratura, tuttavia, emerge che l'aumento della temperatura porta a un decremento reversibile della quantità di proteina attiva di GPx-1 fino ai 4-5°C, mentre, superata questa soglia, i livelli di questo enzima aumentano nuovamente fino a superare i livelli di partenza anche del 10% (**Mantoan, 2005**). Ciò che si è visto da studi passati risulta quindi essere in linea con il presente lavoro di tesi. È dunque ipotizzabile che, ripetendo l'analisi anche su campioni sottoposti ad un aumento di temperatura di 4°C o 5°C, si constaterrebbe un incremento dei livelli di espressione del messaggero. Questa supposizione sarebbe sicuramente interessante da valutare in ulteriori studi futuri.

L'ipotesi più probabile riguardante le cause di questo decremento riguarda le risposte fisiologiche dell'animale. Infatti, l'aumento di qualche grado della temperatura provoca una minor solubilità dell'ossigeno in acqua e, di conseguenza, un minor rischio di formazione di ROS all'interno degli individui trattati. Pertanto, gli organismi potrebbero avere una minore necessità di avviare la trascrizione genica degli enzimi antiossidanti. Il previsto aumento successivo nei livelli di proteina attiva, e dunque si presuppone nei livelli dell'mRNA, probabilmente deriva dal fatto che gli organismi, quando sottoposti a temperature di +4/+5°C, raggiungono una condizione di ipossia, subendo uno stress fisiologico molto forte. Questa condizione è uno dei fattori che porta a un incremento della produzione di ROS, e in questi organismi è tale da richiedere un nuovo aumento del sistema di difesa antiossidante.

Per quanto riguarda il muscolo, invece, non appare alcuna differenza statisticamente significativa tra le 2 diverse temperature ($p=0,416$). La variazione non statisticamente significativa riscontrata è possibilmente imputabile ad una scarsa numerosità dei campioni analizzati ($n=4$), la quale andrebbe aumentata per ottenere risultati più chiari e rilevanti. Ad ogni modo, l'evidenza apportata da studi passati su un'altra specie di Notothenioidei (*Notothenia coriiceps*), porta ad aspettarsi che il comportamento dei livelli di messaggero nel muscolo sia analogo a quello del fegato. Infatti, esemplari

esposti a temperature di 0°C-2°C-4°C per 1 giorno presentavano inizialmente un aumento nei livelli di proteina attiva nel muscolo, seguito poi da un decremento nella sua espressione. Oltre alle condizioni termiche, in questa analisi sono stati usati come variabili anche i tempi di esposizione alle diverse temperature, confrontando durate di 1 e 6 giorni (Klein et al., 2017). Lo studio potrebbe essere riprodotto in futuro su *T. bernacchi*, in modo da poter paragonare i risultati.

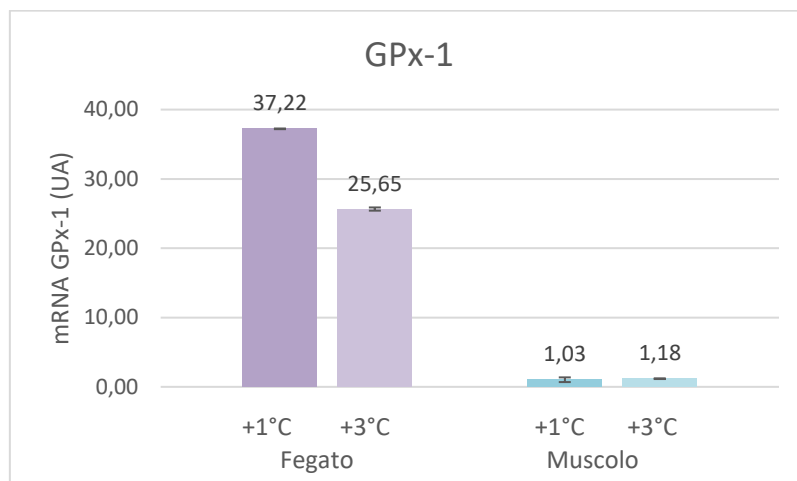


Figura 17. Confronto dell'espressione genica della GPx-1 nello stesso tessuto esposto a temperature diverse.

4.2 CONFRONTO TRA TESSUTI

Confrontando in secondo luogo i due tessuti alla medesima temperatura (Figura 18) emerge che i livelli di espressione genica sono sempre maggiori nel fegato rispetto al muscolo, sia a +1°C che a +3°C. Nel caso della variazione a +1°C, la differenza tra fegato e muscolo è approssimativamente in rapporto 36:1, mentre negli organismi esposti a 3°C il divario tra fegato e muscolo è in rapporto 21:1 circa. Entrambi i confronti sono statisticamente significativi ($p=0,000$). Si nota che, in generale, il fegato presenta dei livelli di espressione di mRNA che sono molto più alti rispetto a quelli espressi nel muscolo. Questi risultati possono essere spiegati facendo riferimento al ruolo fisiologico differente che i due organi hanno. Innanzitutto, il fegato svolge un'attività metabolica molto più elevata e consistente rispetto al muscolo ed è dunque sottoposto a maggior rischio di stress ossidativo. Inoltre, il fegato svolge primariamente un'attività detossificante con azione anche nei confronti dello stress ossidativo, producendo molecole antiossidanti enzimatiche e non enzimatiche, con azione scavenger. Contrariamente al tessuto epatico, quello muscolare nella specie *T. bernacchii* ha un'attività e un metabolismo molto ridotti. Questi pesci infatti, come noto, sono organismi bentonici che vivono addossati al fondale e non presentano elevata motilità. Per questo motivo, il muscolo è sottoposto a una minore probabilità di produzione di ROS e dunque a minor rischio di stress ossidativo, mantenendo contenuti i livelli di espressione del messaggero per le molecole antiossidanti e quindi per la GPx-1 e comunque molto minori rispetto a quelli

del fegato. Queste considerazioni sono possibili spiegazioni per i risultati ottenuti.

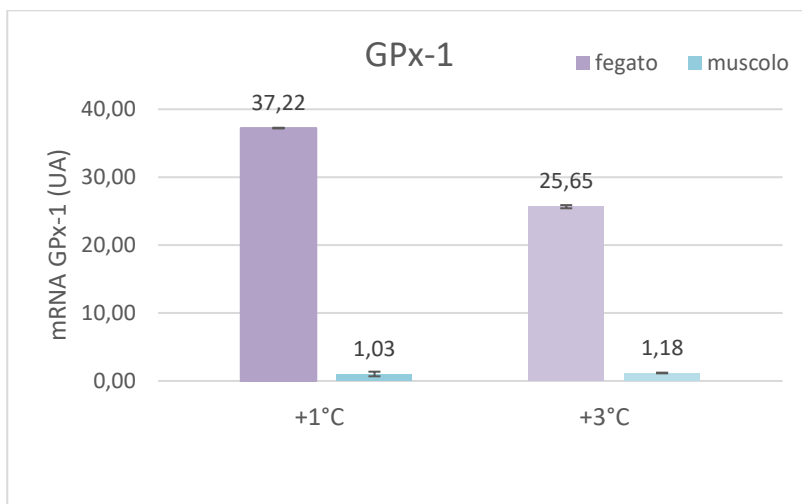


Figura 18. Confronto dell'espressione genica della GPx-1 tra i due tessuti esposti alla stessa temperatura.

5. CONCLUSIONI

Gli organismi analizzati nel presente studio sono esemplari di *T. bernacchii*, teleostei epibentonici diffusi nell'Oceano Antartico. Data la presenza della Corrente Circumpolare Antartica, la regione risulta essere isolata dalle altre masse d'acqua con cui confina, sia dal punto di vista biologico che da quello chimico-fisico. Questa segregazione garantisce la costanza delle temperature delle acque antartiche, che si aggirano in media attorno ai -2°C .

Il regime termico stabile che caratterizza questo ambiente ha reso gli organismi che lo abitano stenotermi, ovvero adattati a vivere in un range ristretto di temperature e incapaci di tollerare variazioni rilevanti al di fuori di questo. Uno degli adattamenti affrontati dalle specie in questione è in risposta all'elevata concentrazione di O_2 nel mezzo acquatico, conseguente all'elevata solubilità del gas a basse temperature: esse hanno dovuto sviluppare efficienti meccanismi antiossidanti per contrastare la cospicua formazione di specie reattive dell'ossigeno all'interno dell'organismo.

Tra le molecole antiossidanti prodotte da *T. bernacchii*, in questo lavoro di tesi è stata analizzata la glutatione perossidasi-1 (GPx-1), enzima che catalizza l'eliminazione di H_2O_2 e idroperossidi organici. In particolare, in previsione dell'aumento delle temperature a livello globale a causa dei cambiamenti climatici, in questo studio si è voluta analizzare l'espressione genica della GPx-1 in risposta a variazioni termiche ambientali. I campioni utilizzati provengono da muscolo e fegato di individui esposti a temperature di $+1^{\circ}\text{C}$ e $+3^{\circ}\text{C}$.

Dai dati raccolti ed esposti in precedenza, è emerso che all'aumentare della temperatura da $+1^{\circ}\text{C}$ a $+3^{\circ}\text{C}$, i livelli del messaggero della GPx-1 nel tessuto epatico hanno subito un decremento statisticamente significativo e una variazione non statisticamente significativa in quello muscolare.

È importante sottolineare che le variazioni termiche a cui sono stati sottoposti gli esemplari durante la sperimentazione non sono risultate letali. Per quanto alcune specie di Notothenioidei risultino estremamente sensibili a sbalzi termici, è stato osservato che esistono specie in grado di potersi adattare in modo rapido agli incrementi di temperatura. Ad esempio, un'acclimatazione a 4°C di *T. pennellii* ha portato ad un aumento della sua tolleranza all'esposizione a 14°C , passando da 25 minuti a quasi 150 minuti. In *T. bernacchii*, lo stesso esperimento ha portato ad una tolleranza di quasi 68 minuti, a confronto con i 10 minuti di sopravvivenza iniziali (**Podrabsky e Somero, 2006**). La validità di questo studio è confermata dall'evidenza che, in alcuni Notothenioidei catturati nel Canale McMurdo, dove la temperatura è di $-1,8^{\circ}\text{C}$ per tutta la durata dell'anno, il limite critico superiore di temperatura tollerata è significativamente inferiore rispetto a quella di esemplari catturati nella regione occidentale della penisola antartica, in cui le temperature variano dai $-1,8^{\circ}\text{C}$ ai 2°C in base alla stagione (**Mueller et al., 2012**).

In conclusione, ulteriori studi su *T. bernacchii* sarebbero interessanti se svolti con un range di temperature più ampio, prendendo in considerazione più tessuti e molecole antiossidanti diverse, in modo da poter avere una visione d'insieme più precisa riguardo la fisiologia dell'animale. Inoltre, aggiungere la variabile del

tempo di esposizione permetterebbe una stima più accurata della risposta degli organismi ai cambiamenti climatici. Il numero di individui campionati dovrebbe idealmente essere maggiore, per ottenere risultati più sicuri. Questa però non è una modifica facilmente apportabile allo studio, in quanto l'Antartide è un ambiente protetto dove va salvaguardata la biodiversità, dunque ci sono dei vincoli da rispettare riguardanti il numero di individui sacrificabili. Infine, lo stesso tipo di analisi potrebbe essere attuata su esemplari di specie diverse appartenenti allo stesso habitat, per avere un quadro più ampio e dettagliato di quali conseguenze potrebbero avere sull'intero ecosistema gli aumenti di temperatura previsti per il futuro.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALBERTELLA, A. E RUMMEL R. (2014).** «GOCE geoid, mean dynamic ocean topography and geostrophic velocities».
- ARCHER, D. (2011).** «Global Warming: Understanding the Forecast». In *Global Warming: Understanding the Forecast*, 3–5.
- BAYR, H. (2005).** «Reactive Oxygen Species». In *Critical Care Medicine* 33, fasc. 12.
- BRUEGGEMAN, P. (2022).** «Underwater Field Guide to Ross Island & McMurdo Sound, Antarctica», *Volume 6: Chordata*.
- CLARKE, A. E JOHNSTON I. A. (1996).** «Evolution and Adaptive Radiation of Antarctic Fishes». In *Trends in Ecology & Evolution* 11, fasc. 5, 212–18.
- COLANGELO, V. (2015).** «Biochimica del selenio e della selenocisteina e loro ruolo nella fisiologia e fisiopatologia umana». Università degli Studi di Pisa.
- DEWITT H. H., HEEMSTRA, P. C., GON, O. (1990).** «Fishes of the Southern Ocean». 279-331.
- DI PRISCO, G., PISANO, E., E CLARK, A. (2012).** «Fishes of Antarctica: A Biological Overview». In *Fishes of Antarctica: A Biological Overview*.
- EASTMAN, J. T. (2005).** «The nature of biodiversity of Antarctic fishes», 94–107.
- EASTMAN, J. T. (2013).** «Antarctic Fish Biology: Evolution in a Unique Environment». In *Antarctic Fish Biology: Evolution in a Unique Environment*, 3–10.
- FINAUD, J., LAC, G., E FILAIRE, E. (2006).** «Oxidative stress: Relationship with exercise and training». In *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 327–58.
- FLOHÉ, L. (1988).** «Glutathione Peroxidase». In *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*.
- FORDHAM, D. A., AKÇAKAYA, H. R., ARAÚJO, M. B., ELITH, J., KEITH, D. A., PEARSON, R., AULD, T. D. ET AL.,(2012).** «Plant Extinction Risk under Climate Change: Are Forecast Range Shifts Alone a Good Indicator of Species Vulnerability to Global Warming?». In *Global Change Biology* 18, fasc. 4, 1357–71.
- FREZZOTTI, M. (1995).** «Fluttuazioni delle fronti dei ghiacciai galleggianti durante il XX secolo in Antartide: evidenze di cambiamenti ambientali». In *Geografia Fisica e Dinamica Quaternaria*, 18, 271–75.
- HALL, M. (2005).** «Sound propagation through the Antarctic Convergence Zone and comments on three major experiments. In Proceedings of acoustics.», 475-479.
- HOFMANN, G.E., BUCKLEY, B.A., AIRAKSINEN, S., KEEN, J.E., E SOMERO, G.N. (2000).** «Heat-shock protein expression is absent in the antarctic fish *Trematomus*

bernacchii (family Nototheniidae)». In *Journal of Experimental Biology* 203, fasc. 15, 2331–39.

IPCC (2018). «Riscaldamento globale di 1,5°C Un rapporto speciale dell'IPCC sugli impatti del riscaldamento globale di 1,5°C rispetto ai livelli preindustriali e sugli andamenti correlati delle emissioni globali di gas serra, nel contesto di un rafforzamento della risposta globale alla minaccia dei cambiamenti climatici, dello sviluppo sostenibile e degli sforzi per debellare la povertà». In *IPCC – Focal Point Italia*.

KLEIN, R. D., DIAS BORGES, V., ROSA, C. E., PINTO COLARES, E., BERTEAUX ROBALDO, R., MARTINEZ, P. E. E BIANCHINI, A. (2017). «Effects of Increasing Temperature on Antioxidant Defense System and Oxidative Stress Parameters in the Antarctic Fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*». In *Journal of Thermal Biology*, SI:Ectotherms: Performance. 110–18.

MANTOAN, M. (2005). «Induzione di enzimi antiossidanti in risposta a variazioni di temperature in teleostei antartici». Università degli studi di Padova.

MUELLER, I. A., DEVOR, D. P., GRIM, J. M., BEERS, J. M., CROCKETT, E. L., E O'BRIEN, K. M. (2012). «Exposure to critical thermal maxima increases oxidative stress in hearts of white- but not red-blooded Antarctic notothenioid fishes». In *Journal of Experimental Biology* 215, fasc. 20, 3655–64.

NOTZ, D. (2020). «A Short History of Climate Change». In *EPJ Web of Conferences* 246.

PNRA (2002). «Rapporto sulla Campagna Antartica Estate Australe 2001-2002. Diciassettesima spedizione.».

PODRABSKY, J. E., E SOMERO, G. N. (2006). «Inducible Heat Tolerance in Antarctic Notothenioid Fishes». In *Polar Biology* 30, fasc. 1, 39–43.

SATTIN, G., BAKIU, R., TOLOMEO, A. M., CARRARO, A., COPPOLA, D., FERRO, D., PATARNELLO, T. E SANTOVITO, G. (2015). «Characterization and Expression of a New Cytoplasmic Glutathione Peroxidase 1 Gene in the Antarctic Fish *Trematomus bernacchii*». In *Hydrobiologia* 761, fasc. 1, 363–72.

STORZ, G., E IMLAYT, J. A. (1999). «Oxidative Stress». In *Current Opinion in Microbiology* 2, fasc. 2, 188–94.

YU, HAIBO, CHI WANG, WEI DENG, GUOHAO LIU, E SHA LIU (2021).

«Characterization and Expression Profiling of Glutathione Peroxidase 1 gene (GPX1) and Activity of GPX in *Onychostoma macrolepis* suffered from Thermal Stress». In *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 21, 541–51.