



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra

Scuola di Dottorato: “**Life sciences**”

Indirizzo: **Biologia Animale**

Settore strategico Polo di Innovazione regionale:

“Tecnologie per la gestione Sostenibile delle Risorse Ambientali”

Con il contributo di POR CALABRIA FSE 2007/2013

CICLO XXVII

Alterazioni morfo-funzionali indotte da contaminanti ambientali in due specie di Teleostei

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/05

Dottorando

Dott. Giuseppe Madeo

Direttore

Prof. Marcello Canonaco

Docente Tutor

Prof.ssa Elvira Brunelli

Co-Tutor

Dott.ssa Ilaria Bernabò

INDICE

INTRODUZIONE	pag.	1
CAPITOLO 1		
L'inquinamento	»	6
1.1. Premessa	»	6
1.2. Inquinamento degli ecosistemi acquatici	»	7
1.3. I metalli pesanti	»	7
1.3.1. Il piombo	»	8
1.4. I pesticidi	»	13
1.4.1. Il chlorpyrifos	»	14
CAPITOLO 2		
La respirazione nei vertebrati acquatici	»	20
2.1. Premessa	»	20
2.2. Le branchie dei pesci	»	22
2.2.1. Condroitti	»	23
2.2.2. Osteitti	»	23
2.3. L'epitelio del filamento: organizzazione e componenti cellulari nei Teleostei	»	25
2.3.1. Cellula pavimentosa	»	26
2.3.2. Cellula mucosa o goblet cell	»	26
2.3.3. Chloride cell	»	27
2.4. L'epitelio lamellare: organizzazione e componenti cellulari nei Teleostei	»	28
CAPITOLO 3		
Specie studiate	»	30
3.1. <i>Thalassoma pavo</i>	»	30
3.1.1. Geonemia	»	30
3.1.2. Morfologia	»	30
3.1.3. Habitat e biologia	»	32
3.1.4. Riproduzione e sviluppo	»	32
3.2. <i>Carassius auratus</i>	»	33
3.2.1. Geonemia	»	34
3.2.2. Morfologia	»	34
3.2.3. Habitat e biologia	»	35
3.2.4. Riproduzione e sviluppo	»	36

CAPITOLO 4

Materiali e metodi	pag.	37
4.1. Provenienza delle specie studiate e mantenimento in laboratorio	»	37
4.2. Piombo: esperimenti su <i>Thalassoma pavo</i>	»	39
4.3. Chlorpyrifos: esperimenti su <i>Thalassoma pavo</i>	»	40
4.4. Chlorpyrifos: esperimenti su <i>Carassius auratus</i>	»	40
4.5. Allestimento dei preparati per MO e TEM	»	41
4.5.1. Prelievo	»	42
4.5.2. Fissazione	»	42
4.5.3. Disidratazione	»	43
4.5.4. Infiltrazione o inclusione	»	43
4.5.5. Sezionamento e colorazione	»	44
4.6. Allestimento dei preparati per immunoistochimica	»	45
4.6.1. Fissazione	»	45
4.6.2. Disidratazione	»	46
4.6.3. Infiltrazione o inclusione	»	46
4.6.4. Sezionamento	»	47
4.6.5. Sparaffinatura	»	47
4.7. Tecniche di immunomarcatura	»	48
4.7.1. Na ⁺ /K ⁺ -ATPasi	»	49
4.7.2. Acquaporina 3	»	50
4.7.3. Metallothioneine	»	51
4.7.4. Ossido nitrico sintasi inducibile	»	51
4.8. Dosaggio dei lipoperossidi nei tessuti	»	52
4.8.1. Analisi statistica	»	53

CAPITOLO 5

Risultati	»	54
5.1. Apparato branchiale degli esemplari di controllo di <i>Thalassoma pavo</i>	»	54
5.2. Struttura ed ultrastruttura delle branchie di <i>Thalassoma pavo</i> esposte a piombo	»	55
5.2.1. Esposizione a 800 µg/L di Pb(NO ₃) ₂	»	55
5.2.2. Esposizione a 2000 µg/L di Pb(NO ₃) ₂	»	55
5.2.3. Esposizione a 1200 µg/L di Pb(NO ₃) ₂	»	56
5.3. Espressione di proteine target nelle branchie di <i>Thalassoma pavo</i> esposte a piombo	»	56
5.3.1. Na ⁺ /K ⁺ -ATPasi	»	56
5.3.2. Acquaporina 3	»	57
5.3.3. Metallothioneine	»	58
5.4. Struttura ed ultrastruttura delle branchie di <i>Thalassoma pavo</i> esposte a chlorpyrifos	»	59

5.4.1. Esposizione 3.5 µg/L di CPF	pag.	59
5.4.2. Esposizione 7 µg/L di CPF	»	59
5.5. Espressione della Na ⁺ /K ⁺ -ATPasi nelle branchie di <i>Thalassoma pavo</i> esposte a chlorpyrifos	»	60
5.6. Apparto branchiale degli esemplari di controllo di <i>Carassius auratus</i>	»	60
5.7. Struttura ed ultrastruttura delle branchie di <i>Carassius auratus</i> dopo esposizione a chlorpyrifos e post esposizione	»	61
5.7.1. Apparato branchiale dopo 96h di esposizione acuta	»	61
5.7.2. Apparato branchiale dopo 7 giorni di recupero	»	61
5.8. Espressione di proteine target nelle branchie di <i>Carassius auratus</i> dopo esposizione a chlorpyrifos e post esposizione	»	62
5.8.1. Na ⁺ /K ⁺ -ATPasi	»	62
5.8.2. Ossido nitrico sintasi inducibile	»	63
5.9. Dosaggio dei lipoperossidi nei tessuti branchiali di <i>Carassius auratus</i> esposti a chlorpyrifos	»	63
Tavole	»	65
Legenda	»	95

CAPITOLO 6

Discussioni	»	101
6.1. Tossicità del piombo	»	101
6.1.1. Analisi morfologica degli effetti del piombo sulle branchie di <i>Thalassoma pavo</i>	»	103
6.1.2. Analisi funzionale degli effetti del piombo sulle branchie di <i>Thalassoma pavo</i>	»	106
6.2. Tossicità del chlorpyrifos	»	109
6.2.1. Analisi morfologica degli effetti del chlorpyrifos sulle branchie di <i>Thalassoma pavo</i>	»	110
6.2.2. Analisi funzionale degli effetti del chlorpyrifos sulle branchie di <i>Thalassoma pavo</i>	»	113
6.2.3. Analisi morfologica degli effetti del chlorpyrifos sulle branchie di <i>Carassius auratus</i>	»	114
6.2.4. Analisi funzionale degli effetti del chlorpyrifos sulle branchie di <i>Carassius auratus</i>	»	117
6.3. Considerazioni conclusive	»	120
BIBLIOGRAFIA	»	122

INTRODUZIONE

L'inquinamento idrico è un fenomeno ampiamente diffuso che interessa sia gli ecosistemi di acqua dolce che quelli marini (Kaya et al., 2002). Lo sfruttamento indiscriminato di laghi, fiumi e acque costiere, negli ultimi decenni, ha assunto proporzioni critiche che rappresentano una seria minaccia per la fauna acquatica; gli indicatori usati per la valutazione della qualità delle acque, fissati dal decreto legislativo 152/99, descrivono infatti un quadro molto preoccupante.

Il più importante fattore di rischio è rappresentato dalle sostanze tossiche, in quanto, ogni anno, enormi quantità di prodotti chimici provenienti dalle industrie, dalle aree urbane o da quelle agricole vengono riversati nei corpi idrici (Yarsan & Yipel, 2013). La Comunità europea ha indicato i metalli pesanti e i pesticidi come sostanze prioritarie da monitorare al fine di preservare la qualità degli ambienti acquatici, sia marini che di acqua dolce (Directive, 2008/105/EC).

Nel presente lavoro pertanto l'attenzione è stata diretta verso due sostanze che contribuiscono in maniera considerevole all'inquinamento idrico: il piombo ed il chlorpyrifos. Entrambe sono ampiamente utilizzate in diverse attività antropiche ed una volta rilasciate nell'ambiente, possono raggiungere i compartimenti idrici minacciando gli ecosistemi (Larsson, 1976; Riise et al., 2004; Barbosa et al., 2005; Rabiet et al., 2010; Ezhilmathy et al., 2014; Perugini et al., 2014; Pritz et al., 2014).

Il piombo è un metallo non essenziale e, sebbene sia presente in tracce nell'ambiente, deriva soprattutto dalle attività umane; infatti, per le sue caratteristiche chimico-fisiche, viene utilizzato in diversi processi industriali, quali produzione di munizioni, esplosivi, batterie, vernici e leghe metalliche (Thornton et al., 2001). Come tutti i metalli pesanti, il piombo è estremamente stabile e persistente nell'ambiente (Ramesh et al., 2009) ed è inoltre molto tossico e bioaccumulabile (Wast et al., 2012); esso riesce, infatti, ad accumularsi in vari tessuti animali, quali branchie, ossa, fegato e reni (Javid et al., 2007). La correlazione tra concentrazione di tale metallo nell'acqua e concentrazione nei tessuti animali rappresenta un serio problema per l'uomo come consumatore finale

di molte specie ittiche (Wast et al., 2012). In letteratura sono riportati diversi lavori sulla tossicità del piombo nei pesci, soprattutto teleostei di acqua dolce; tra gli effetti che esso induce sono descritti alterazioni istologiche a livello delle branchie e del fegato, effetti neurologici e comportamentali, ritardi nella crescita, alterazione della regolazione osmotica e ionica, compromissione dell'attività di alcuni enzimi e modificazioni delle risposte immunitarie (Katti & Sathyanesan, 1986; Sorensen, 1991; Alados & Weber, 1999; Rademacher et al., 2001, 2003; Rogers et al., 2003, 2005; Patel et al., 2006; Rodrigo et al., 2006).

Il chlorpyrifos è un insetticida organofosfato ad ampio spettro, tra i più utilizzati in tutto il mondo in campo agricolo, veterinario e sanitario. Il meccanismo d'azione maggiormente studiato è l'inibizione irreversibile dell'enzima acetilcolina esterasi, che causa la paralisi per iperstimolazione in quanto tale enzima non riesce più a degradare l'acetilcolina a livello delle sinapsi (Colborn, 2006; Watts, 2013). L'introduzione, accidentale o intenzionale, del chlorpyrifos in diversi ecosistemi acquatici, rappresenta un serio problema per gli animali selvatici non target. I tempi di degradazione piuttosto lunghi fanno sì che venga classificato come molto tossico per gli organismi acquatici (US EPA, 2009, 2013). In Italia, in particolare, è uno dei pesticidi più rilevati nelle acque superficiali come segnalato recentemente dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA, 2013). In letteratura sono presenti diversi lavori che descrivono gli effetti causati dalla presenza del chlorpyrifos sui pesci, soprattutto teleostei di acqua dolce; in particolare è ben noto che la presenza di tale contaminante nel mezzo acquatico causa alterazioni neuro-comportamentali, aumento dello stress ossidativo, riduzione della crescita, mutagenicità, interferenze con il sistema endocrino (Sandahl et al., 2005; Ali et al., 2008; Oruc, 2010, 2012; Wu et al.; 2011; Xing et al., 2012a, b; Ma et al., 2013; Nwani et al., 2013).

Per affermare che una sostanza è pericolosa per gli ecosistemi acquatici e per le catene alimentari bisogna verificare la sua tossicità acuta su mammiferi, batteri e pesci (US EPA, 2004). I pesci sono spesso usati come modello sperimentale per valutare lo stato di salute degli ecosistemi acquatici (Garcia-Santos et al., 2005). Infatti, essi possono venire in contatto diretto con gli xenobionti presenti nel loro ambiente attraverso le branchie, la superficie corporea, o per ingestione diretta.

Nei pesci, la valutazione degli effetti indotti da una sostanza a concentrazioni sub-letali, permette di quantificare le concentrazioni tollerate ed effettuare considerazioni che abbiano valore predittivo sull'entità del rischio derivante dalla presenza di quell'inquinante nel mezzo acquatico (Stegeman et al., 1992; van der Oost et al., 2003). In particolare, l'analisi morfologica di precoci alterazioni istopatologiche nei pesci, in conseguenza dell'esposizione ad inquinanti presenti nel loro ambiente, può essere un efficace strumento per indagare gli effetti degli xenobionti (Bernet et al., 1999; Dezfuli et al., 2006) e per stabilire, quindi, criteri sulla qualità delle acque (FAO, 1981; EIFAC, 1983; Murty, 1986; Tripepi et al., 2006).

Le branchie rappresentano un organo particolarmente importante in quanto svolgono molteplici funzioni quali: respirazione, osmoregolazione, escrezione, bilancio idrico ed ionico (Evans et al., 1999). Le branchie sono sensibili a diverse classi di contaminanti e le alterazioni dell'apparato branchiale rappresentano, quindi, un ottimo marker di esposizione per valutare gli effetti delle sostanze tossiche che si accumulano nelle acque (Hinton et al., 1992).

I modelli sperimentali scelti nel presente studio sono due specie di teleostei: uno marino ed uno di acqua dolce. Il primo è *Thalassoma pavo* un labride ampiamente diffuso nel mar Mediterraneo meridionale che può essere potenzialmente soggetto agli agenti inquinanti in quanto vive lungo le scogliere frangiflutti prossime alla riva che facilmente possono essere contaminate. La sua ampia distribuzione lungo le coste calabresi riduce al minimo il rischio di incidere negativamente sull'andamento numerico delle popolazioni locali ed inoltre, possiede dimensioni idonee al mantenimento in laboratorio (Brunelli et al., 2011; Zizza et al., 2013). Il secondo è *Carassius auratus*, un ciprinide ritenuto un buon modello sperimentale negli studi di ecotossicologia, in quanto economico, ampiamente diffuso e facile da mantenere in condizioni di laboratorio (Wang et al., 2010; Ma et al., 2013).

In ecotossicologia, una vasta gamma di risposte biologiche, dal livello molecolare fino alla struttura di una comunità, può essere impiegata come biomarker (Peakall, 1992). Come sottolineato da Au (2004), le risposte istocitologiche sono relativamente facili da determinare, e possono essere correlate alla

salute ed alla fitness degli individui, consentendo un'ulteriore valutazione degli effetti a livello di popolazione/comunità.

Su questa base, l'obiettivo di tale lavoro è quello di valutare gli effetti del piombo e del chlorpyrifos sull'apparato respiratorio dei due modelli di teleostei da noi scelti per i diversi compartimenti idrici. In particolare, abbiamo condotto un'indagine sugli effetti di una esposizione a piombo sulle branchie di *Thalassoma pavo*, dal momento che in letteratura i dati su pesci non d'acqua dolce risultano piuttosto scarsi. Il set-up sperimentale ha previsto un'esposizione di tipo acuto a tre concentrazioni (800, 2000 e 12000 µg/L) sub-letali di piombo per 192 ore.

Per quanto riguarda il chlorpyrifos, abbiamo esaminato per la prima volta gli effetti di una esposizione acuta sull'apparato branchiale sia in *Thalassoma pavo* che in *Carassius auratus*. Con lo scopo di validare ulteriormente il ruolo degli studi morfologici nel dimostrare gli effetti di contaminanti ambientali, abbiamo analizzato per entrambi i teleostei le alterazioni istopatologiche e funzionali indotte sull'apparato branchiale dopo una esposizione acuta a questo pesticida. A tale fine il set-up sperimentale usato per *Thalassoma pavo* ha previsto un'esposizione di tipo acuta a due concentrazioni (3.5 e 7 µg/L) sub-letali di chlorpyrifos per 96 ore. In *Carassius auratus*, invece, oltre a valutare gli effetti che emergono dopo 96 ore di esposizione a tre concentrazioni (1, 4 e 8 µg/L) sub-letali di chlorpyrifos, abbiamo voluto investigare gli effetti tossici che persistono o appaiono dopo l'esposizione al pesticida (carryover effects) (Rohr et al., 2006) al fine di individuare l'eventuale capacità di recupero (Berrill et al., 1998; Lajmanovich et al., 2009; Robles-Mendoza et al., 2009), che risulta fondamentale in natura.

Le analisi sono state condotte attraverso l'integrazione di risultati provenienti dall'applicazione di diverse metodiche di indagine microscopica. Sono state applicate tecniche di microscopia ottica e microscopia elettronica a trasmissione al fine di valutare le alterazioni morfologiche ed ultrastrutturali, e tecniche di immunofluorescenza per la valutazione di alcuni parametri funzionali. In particolare, abbiamo scelto come marker la Na⁺/K⁺-ATPasi e l'acquaporina 3 (AQP-3) per valutare le eventuali alterazioni dell'equilibrio ionico ed osmotico nelle branchie in seguito ad esposizione a piombo e chlorpyrifos; abbiamo inoltre valutato l'espressione dell'isoforma inducibile della NOS (iNOS) in quanto è noto il suo coinvolgimento in diversi processi patofisiologici, quali presenza di patogeni,

tumori e xenobionti; infine abbiamo considerato le metallotioneine (MTs) per indagare l'instaurarsi di meccanismi di detossificazione dopo esposizione al piombo. In aggiunta, abbiamo misurato i livelli di lipoperossidi nei tessuti branchiali di *Carassius auratus* per valutare variazioni dello stato ossidativo dopo esposizione diretta al chlorpyrifos e dopo un periodo di recupero in acqua priva di pesticida.

I dati da noi ottenuti possono rappresentare un importante strumento per l'individuazione di misure di sicurezza al fine di prevenire l'inquinamento idrico e per la messa a punto di metodi per il monitoraggio dell'inquinamento causato da metalli pesanti e pesticidi, al fine di stabilire limiti per l'utilizzo e l'emissione di tali sostanze nell'ambiente acquatico.

Capitolo 1

L'inquinamento

1.1. Premessa

Per inquinamento si intende la perturbazione degli equilibri di un ecosistema causata dall'immissione nell'aria, nell'acqua e nel suolo di materia e/o energia tali da provocare un'alterazione persistente e talvolta irreversibile delle caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche dell'ecosistema (Manahan, 2000; Della Croce et al., 2001). L'inquinamento può essere di origine naturale (incendi, anossie di corpi idrici in conseguenza di esplosioni algali, eruzioni vulcaniche, ecc.) o antropica: guerre (ad esempio l'uso di armi all'uranio impoverito), trasporti (versamenti accidentali in mare da petroliere), ed uso di tecnologie industriali obsolete (Provini et al., 1998). La maggior parte delle sostanze inquinanti generati dall'uomo deriva da scarti o rifiuti che possono presentarsi allo stato solido, liquido o gassoso, durante le attività di estrazione e trasformazione o durante l'utilizzo di una determinata risorsa. Anche la produzione di calore, rumore e radiazioni è fonte di fenomeni di inquinamento.

L'inquinamento, inoltre, si distingue in due grandi categorie: acuto e cronico. Per inquinamento acuto si intende un fenomeno massivo che avviene in tempi e spazi ristretti creando danni di tipo catastrofico e, generalmente, ad opera di eventi imprevedibili e accidentali. L'inquinamento cronico, invece, è un fenomeno che si protrae in modo più o meno costante nel tempo, a causa della presenza di agenti che alterano l'ecosistema ambientale non generando un effetto immediato sulla mortalità. Questa forma di inquinamento deriva prevalentemente dall'uso continuo delle acque fluviali e costiere per lo smaltimento di sostanze o di energia di rifiuto (Della Croce et al., 2001).

1.2. Inquinamento degli ecosistemi acquatici

Gli effetti delle sostanze inquinanti su un ecosistema acquatico dipendono essenzialmente da tre fattori: la natura chimica, la persistenza e la concentrazione.

Una esaustiva definizione di inquinamento idrico è quella espressa dal Decreto L.vo 15 Maggio 1999 n. 152: “Lo scarico effettuato direttamente o indirettamente dall'uomo nell'ambiente idrico di sostanze o di energia le cui conseguenze siano tali da mettere in pericolo la salute umana, nuocere alle risorse viventi e al sistema ecologico idrico, compromettere le attrattive o ostacolare altri usi legittimi delle acque”.

I fiumi sono tra i principali vettori dell'inquinamento idrico in quanto rappresentano l'ambiente in cui vengono maggiormente riversate diverse sostanze nocive di rifiuto delle città e delle attività industriali, provocando non solo un'alterazione delle biocenosi fluviali ma anche cambiamenti radicali nelle caratteristiche ambientali della fascia costiera. Fortunatamente gran parte degli inquinanti vengono rapidamente smaltiti dai corsi d'acqua per via di fenomeni di diluizione e degradazione ad opera di decomposizione batterica. Anche i laghi rappresentano un ambiente acquatico fortemente utilizzato per lo smaltimento di sostanze di rifiuto, ma in questo caso i processi di depurazione spontanea sono molto meno efficaci.

I pesticidi insieme ai metalli pesanti sono tra le sostanze inquinanti più frequentemente rilevabili negli ecosistemi acquatici e pertanto indicate come prioritarie dalle istituzioni europee (European Water Framework Directive for the protection of aquatic ecosystems, Directive, 2008/105/EC). La contaminazione da metalli pesanti e pesticidi dei compartimenti idrici è aumentata negli ultimi decenni, a causa di un uso estensivo in agricoltura, nei processi chimici ed industriali ed in conseguenza della loro elevata persistenza, attirando pertanto l'attenzione del mondo scientifico (Ezhilmathy et al., 2014).

1.3. I metalli pesanti

I metalli pesanti, come altri elementi chimici, possono esistere allo stato elementare (o metallico), come ioni liberi o come parte di molecole più complesse e avere quindi effetti profondamente diversi. Allo stato elementare, o metallico di

norma nessun metallo è tossico. Numerosi processi chimici e biochimici sono in grado di trasformare un elemento in ioni, che invece hanno attività biologiche; lo stesso elemento quindi può essere presente come catione o come anione, e con attività biologiche anche diversissime (Atkins, 2000).

I metalli pesanti possono essere distinti qualitativamente in essenziali e non essenziali. I primi comprendono Fe, Cu, Zn, Cr, Mn, Ni, Co e sono richiesti dall'organismo in quantità minime, essendo coinvolti in molteplici funzioni biologiche come costituenti indispensabili di molti enzimi; esistono dei valori di concentrazione intracellulare ottimali al di sotto dei quali l'organismo entra in sofferenza. I metalli definiti non essenziali sono Hg, Cd, Sn e Pb che non presentano alcuna funzione o ruolo biologico. Tutti i metalli, essenziali o non, ad elevate concentrazioni possono avere effetti tossici importanti interferendo nel metabolismo cellulare (Della Croce et al., 2001). Essi possono essere tollerati dall'organismo solo entro determinate concentrazioni altrimenti diventano tossici.

I metalli sono naturalmente presenti negli ecosistemi acquatici, maggiormente in quelli marini rispetto alle acque interne, e molti di essi sono indispensabili per le attività biologiche (Thornton et al., 2001). In condizioni naturali, una buona parte, proviene per lo più dalle attività vulcaniche, dall'erosione di terreni e rocce, mentre i fiumi provvedono al contributo di metalli nell'ambiente marino. Tuttavia, nella maggior parte degli ecosistemi acquatici la concentrazione dei metalli disciolti è superiore ai livelli considerati accettabili a causa soprattutto dell'attività antropica (estrazioni minerarie, continue emissioni gassose dovute all'industria e all'agricoltura, produzione di rifiuti solidi e di reflui contenenti metalli pesanti) (Perugini et al., 2014). I metalli pesanti non sono biodegradabili e pertanto possono facilmente bioaccumulare lungo le catene alimentari, per cui i predatori che si inseriscono ai vari livelli della piramide alimentare sono soggetti ad accumulare le sostanze tossiche in una quantità sempre maggiore quanto più alto è il livello che essi occupano (Anderson et al., 1997; Cicik et al., 2004).

1.3.1. Il piombo

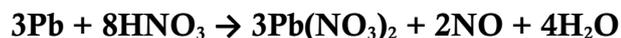
Il piombo è un metallo duttile, malleabile e resistente alla corrosione; essendo uno dei metalli pesanti più tossici e maggiormente diffusi sulla Terra è di grande interesse ambientale (Martinez et al., 2004).

Il punto di fusione, pari a 327 °C, è piuttosto basso per un metallo. Questa caratteristica conferisce al piombo una facile lavorabilità che gli consente di essere modellato in varie forme e ne ha permesso l'impiego, ad esempio per creare utensili, da millenni.

Il piombo reagisce con composti e altri elementi portando alla formazione di una vasta gamma di prodotti. Esempi tipici sono: l'acetato di piombo, il carbonato di piombo, il clorato di piombo, il cloruro di piombo, il cromato di piombo, l'idrossido di piombo, lo ioduro di piombo, il nitrato di piombo, l'ossalato di piombo, il piombo ossido (litargirio), il solfato di piombo, il solfuro di piombo (galena, il minerale di piombo più comune) e piombo tetra-etile (usato come un composto antidetonante nella benzina, oggi non più usato) (Thornton et al., 2001).

La maggior parte dei composti del piombo è poco solubile in acqua, fatta eccezione per i tre composti: acetato di piombo, clorato di piombo e nitrato di piombo. Tra questi, il piombo clorato, essendo altamente reattivo, non consente una manipolazione sicura, l'acetato di piombo è molto costoso, mentre il nitrato di piombo (con un più alto contenuto di piombo) ha una maggiore solubilità ed è più economico (Sedlavec, 1986).

Il nitrato di piombo non è un composto naturale e, solitamente, si ottiene mediante la seguente reazione chimica:



In questa reazione il piombo metallico (Pb^{2+}) reagisce con l'acido nitrico (HNO_3), acido forte che porta alla formazione dello ione nitrato NO_3^- in acqua. L'acido nitrico si rileva in natura sotto forma di sali (nitrati) ma può anche essere prodotto tramite processo di Ostwald (Blaskett & Boxall, 1990).

Nome chimico (IUPAC)	Ditriossonitrato(V) di piombo
Formula chimica	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
CAS No.	10099-74-8
Peso molecolare (g/mol)	331.21
Densità (g/cm ³) (20°C)	4.53
Solubilità in acqua (g/L) (20°C)	525
Temperatura di fusione (°C)	470

Tab. 1.1 Proprietà fisico-chimiche del nitrato di piombo

Come detto in precedenza per gli altri metalli pesanti, tracce di piombo sono presenti naturalmente nell'ambiente e soprattutto negli ambienti acquatici. Tale presenza è dovuta in parte a cause naturali, come i fenomeni meteorologici e l'attività vulcanica, e in maniera più significativa ai fenomeni d'inquinamento originati dalle innumerevoli attività umane. Il piombo, infatti, è uno dei metalli più utilizzati in diverse attività lavorative, quali fabbriche di munizioni ed esplosivi, di batterie e di accumulatori per autotrazione, di vernici e smalti, di vetri e ceramiche; esso è presente, inoltre, nei combustibili e può derivare dall'utilizzo del carbone e dalle industrie che lavorano bronzo e cemento (Ahmed & Jhung, 2014). Negli ultimi due decenni, in molti Paesi dell'Occidente è stato notevolmente limitato qualsiasi impiego di tale metallo che comporti una dispersione ambientale incontrollata. Una percentuale elevata del piombo ambientale, infatti, proveniente dagli scarichi dei veicoli a motore, consisteva soprattutto di piombo in forma inorganica: il passaggio alla benzina senza piombo ha consentito l'eliminazione del metallo dai gas di scarico ed ha ridotto, di conseguenza, la frazione di piombo ambientale dovuta alla combustione della benzina tradizionale.

La presenza del piombo negli ecosistemi varia a seconda dell'area geografica: le zone rurali risentono meno della sua presenza rispetto alle aree urbane soggette, invece, alle emissioni da parte delle industrie. Nell'intervallo di concentrazione di piombo, comunemente osservato nei suoli, viene evidenziata una correlazione lineare tra la concentrazione dell'elemento nel suolo e quella nei tessuti dei vegetali

(Pourrut et al., 2011). Il piombo raggiunge la sua massima concentrazione nelle radici delle piante. Il principale fattore che sembra controllare la biodisponibilità del piombo nel suolo è la presenza di cationi, che competono nell'assorbimento del metallo sulle argille (Thornton et al., 2001).

Gli organismi animali mostrano una diversa tolleranza al piombo. L'esposizione a questo inquinante può avvenire attraverso l'acqua, il cibo, l'aria, il terreno e le polveri (Cognetti et al., 2004). Così come per altri metalli, anche il piombo può entrare nella catena alimentare accumulandosi negli organismi acquatici e risalendo fino all'uomo come consumatore finale (Wast et al., 2012). Gli effetti del piombo sull'uomo sono molteplici e studi isotopici finalizzati a valutarne la presenza nel sangue umano indicano che questo metallo può avere origini molto diverse (Barbosa et al., 2005). In aree poco contaminate, la principale fonte di piombo nel sangue è rappresentata dal consumo di alimenti e dall'ingestione di particelle di suolo. Per valori di piombo nel sangue compresi tra 20 e 40 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ si osserva anemia, mentre al di sopra di tale soglia si riscontrano effetti neurotossici ed una correlazione negativa tra la concentrazione di piombo ematico e quoziente intellettuale (Schwartz, 1994).

Numerosi sono gli studi sugli effetti del piombo sui pesci per i quali tale metallo può essere altamente tossico. Infatti, il piombo può interrompere il pathways metabolico inibendo la deidratazione dell'acido δ -aminolevulinico che catalizza la condensazione di due molecole di δ -aminolevulinico per formare porfobilinogeno, precursore dell'eme, citocromi e altre emoproteine (Rodrigues et al., 1989). Il piombo è coinvolto nell'inibizione dell'enzima Na^+/K^+ -ATPasi, che ha il compito di generare un gradiente di ioni a cavallo della membrana cellulare spingendo continuamente ioni sodio fuori dalla cellula e ioni potassio dentro la cellula azionata dall'idrolisi dell'ATP; inibisce, inoltre, l'anidrasi carbonica che catalizza la rapida interconversione di anidride carbonica e acqua in acido carbonico, protoni e ioni bicarbonato. Nei globuli rossi, l'anidrasi carbonica converte la maggior parte della CO_2 , proveniente dal metabolismo cellulare, a bicarbonato facilitandone, così, il trasporto e la sua eliminazione per via polmonare (Rogers et al., 2005). È stato, inoltre, osservato che il piombo è in grado di compromettere il riassorbimento di calcio (Rogers & Wood, 2004) causando danni alla regolazione ionica (Rogers et al., 2003).

È stato osservato che nei pesci il piombo agisce come potente neurotossina interferendo con i neurotrasmettitori, e riduce l'attività dell'enzima monoamino ossidasi cerebrale coinvolto nella degradazione della serotonina (neurotrasmettitore monoamico sintetizzato dai neuroni serotoninergici nel sistema nervoso centrale), la quale a sua volta regola l'umore e, a livello del sistema cardiovascolare, agisce sulla contrazione delle arterie contribuendo al controllo della pressione sanguigna e stimolando, inoltre, la contrazione della muscolatura liscia dei bronchi, della vescica e dei grossi vasi (Rademacher et al., 2001, 2003).

Il piombo è implicato nella riduzione dell'azione della acetilcolinesterasi (AChE) (Katti & Sathyanesan, 1986) che sintetizza l'acetilcolina (ACh), nella parte pre-sinaptica dei neuroni, a partire dalla colina e dall'acetil-CoA inducendo, così, iperattività (Weber et al., 1991); inoltre, si è osservato che altera il comportamento riproduttivo nei pesci (Weber, 1993; Alados & Weber, 1999).

Studi effettuati sul sistema nervoso centrale di *Rhamdia quelen* (pesce gatto) hanno dimostrato che ERK1/2, l'enzima coinvolto nella mitogenesi, nella plasticità sinaptica e nella regolazione del comportamento, e p38MAPK, l'enzima coinvolto nella risposta allo stress e nell'apoptosi, sono bersagli molecolari del piombo (Rodrigo et al., 2006).

Il piombo esercita un effetto tossico sui pesci interferendo anche nella ionoregolazione ed alterando l'equilibrio degli ioni Na^+ e Cl^- (Sorensen, 1991; Rogers et al., 2003; Rogers & Wood, 2004).

In un recente studio (Patel et al., 2006), condotto sulla trota d'acqua dolce *Oncorhynchus mykiss*, è stato osservato un effetto del piombo (dal nitrato di piombo) sui processi di osmoregolazione e ionoregolazione. In particolare, il piombo può provocare l'interruzione dei processi di riassorbimento renali (Ca^{2+} , Mg^{2+} , glucosio e acqua), oltretutto interferire nell'assorbimento di ioni attraverso le branchie (Rogers & Wood, 2004; Rogers et al., 2003, 2005). La maggiore escrezione urinaria di Ca^{2+} spiega gli effetti di ipocalcemia connessi con l'avvelenamento da piombo (Sorensen, 1991).

Il piombo è risultato essere responsabile dell'induzione di anomalie del comportamento sia alimentare che di nuoto; infatti, nel teleosteo marino *Thalassoma pavo*, l'esposizione ad una concentrazione nominale di 1.6 mg PbNO_3/L è in grado di indurre una riduzione del comportamento alimentare con

l'aumentare dei tempi di esposizione. Le alterazioni osservate a livello dell'attività di nuoto, quali movimenti rapidi e improvvisi, sono state strettamente correlate alla up-regolazione dell'espressione dell'mRNA dei recettori orexina (ORXR); l'esposizione al piombo, ha inoltre causato un processo neurodegenerativo delle varie aree del cervello (Zizza et al., 2012).

1.4. I pesticidi

I pesticidi sono una vasta categoria di sostanze chimiche, naturali o di sintesi, usate per controllare, limitare e distruggere alcuni organismi viventi considerati nocivi ed infestanti. Ad oggi più di 1400 pesticidi con diverse formulazioni vengono utilizzati in tutto il mondo. I pesticidi trovano largo impiego in campo agricolo per la difesa delle colture, in campo domestico nella lotta contro gli animali infestanti, in campo industriale per la conservazione delle materie prime e dei manufatti più diversi, infine, in campo medico e veterinario per la lotta contro i parassiti patogeni e i vettori delle malattie infettive. L'agricoltura è l'attività che registra un maggiore uso di tali sostanze; negli ultimi 50 anni, infatti, il notevole aumento della quantità e della qualità del cibo è stato possibile grazie all'utilizzo massiccio di diverse tipologie di pesticidi (Pritz et al., 2014).

L'uso intensivo di pesticidi comporta la diffusione di queste sostanze nei diversi compartimenti ambientali (suolo, acqua ed aria). Un importante effetto collaterale del loro ampio utilizzo è, ad esempio, la contaminazione e il potenziale rischio per gli ecosistemi acquatici anche lontano dai siti di applicazione, oltre che per i corsi d'acqua drenanti direttamente le aree agricole (Rabiet et al., 2010). Numerosi autori hanno studiato il trasporto dei pesticidi dai terreni agricoli ai fiumi (Du Preez et al., 2005; Claver et al., 2006; Blanchoud et al., 2007). Studi compiuti su larga scala inerenti i pesticidi presenti nelle acque superficiali hanno dimostrato che il trasporto di questi contaminanti è largamente influenzato dalle proprietà intrinseche di ciascun composto, ma anche dalle condizioni meteorologiche, dal tipo di suolo e dall'uso del terreno (Capel et al., 2001; Riise et al., 2004). Diversi autori hanno inoltre sottolineato l'importanza del deflusso superficiale indotto dalla pioggia come una fonte importante di contaminazione dei corsi d'acqua. Un rapido processo di deflusso riduce drasticamente il tempo disponibile per le reazioni, come

l'assorbimento o la degradazione, e può causare un trasferimento diretto dei pesticidi verso le acque superficiali (Rabiet et al., 2010).

I pesticidi si suddividono in varie categorie in base alla classe chimica cui appartengono, lo spettro di attività antiparassitaria e le specifiche applicazioni.

- INSETTICIDI: organofosfati, organoclorurati, carbammati e piretroidi;
- ERBICIDI: derivati dell'acido fenossiacetico, derivati del dipiridilium, triazine e dinitrofenoli;
- FUNGICIDI: ditiocarbammati, triazoli, anilinopirimidine e strobilurine;
- MOLLUSCHICIDI: solfato di rame, metaldeide, arseniato di calcio;
- RODENTICIDI: anticoagulanti, fluoro acetati, stricnina;
- ACARICIDI: solfororganici, azotorganici e stannorganici;
- FERTLIZZANTI: azotati, fosfatici e potassici.

Tra i gli insetticidi, una classe importante è quella degli organofosfati (OP), ampiamente utilizzati in agricoltura a livello mondiale e ritenuti un'alternativa meno pericolosa rispetto ai più persistenti organoclorurati (Phillips et al., 1985; Smith et al., 2008). Proprio a causa del loro recente e massiccio utilizzo, negli ultimi anni una considerevole attenzione è stata rivolta ai pesticidi organofosfati ad ampio spettro, che, oltre a rappresentare un grave problema di salute pubblica globale necessitano di studi che valutino le ripercussioni a livello ecologico (Chamarthi et al., 2014, Tiwar & Ansari, 2014).

1.4.1. Il chlorpyrifos

Il chlorpyrifos (CPF) è un pesticida organofosfato usato come insetticida, acaricida e nematocida; la sua formula chimica è $C_9H_{11}NO_3PSCl_3$ (nome chimico O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate; peso molecolare 350.6 g/mol), può avere colore dal bianco all'ambrato e si aggrega a formare piccoli cristalli (US-EPA, 1997; Mackay et al., 1999). È stato introdotto in commercio nel 1965, e originariamente usato su prati, ambienti coperti e piante ornamentali sia per prevenire che per combattere le infestazioni di insetti parassiti, successivamente il suo utilizzo si è esteso nelle grandi colture, come cereali, mais, tabacco, frutta, noci, verdura (PMRA, 2000), ma anche in silvicoltura, e come prodotto anti-muffa per il legno (Watts, 2013). In agricoltura il chlorpyrifos è comunemente usato su foglie, cortecce, semi o sul suolo anche prima della semina (US-EPA, 2009). Viene

applicato disciolto nell'acqua di irrigazione, somministrato attraverso aspersione spray, o direttamente sparso sul terreno (US-EPA, 2006).

Nome chimico (IUPAC)	O,O-diethylO-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate
Formula chimica	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
CAS No.	2921-88-2
Peso molecolare (g/mol)	350.6
Solubilità in acqua (mg/L) (25°C)	7.3E-01
Tensione di vapore (Pa) (25°C)	2.50E-03
Log Kow	5.26
Coefficiente di ripartizione su carbonio organico (log Koc)	4.13
Costante di Henry (Pa m ³ /moli)	4.06E-03

Tab. 1.2 Proprietà fisico-chimiche del chlorpyrifos

La degradazione del chlorpyrifos può avvenire per idrolisi, fotolisi o per azione microbica (Racke, 1993). Nell'acqua fattori che condizionano l'emivita del chlorpyrifos sono idrolisi, biodegradazione, assorbimento nel sedimento, volatilizzazione e fotodegradazione (Giesy et al., 1999). Variazioni di temperatura e pH modificano la velocità di idrolisi in acqua; infatti, la vita media del chlorpyrifos a pH 5 e 7 è, rispettivamente, di 73 e 77 giorni, mentre a pH 9 diviene di 16 giorni (PMRA, 2000).

Il chlorpyrifos è uno degli insetticidi più usati a livello mondiale, soprattutto in Thailandia (Panuwet et al., 2009), Filippine (Lu, 2011), Vietnam (Phung et al., 2012), Argentina (Jergentz et al., 2005), Brasile (Meire et al., 2012) e USA (Alavanja et al., 2013). Il suo utilizzo è drasticamente cambiato negli ultimi dieci anni. In Yemen è stato limitato l'utilizzo dal 2006 (El-Zaemey et al., 2013). In USA è vietato l'utilizzo in zone residenziali, scuole, parchi e in ambienti interni frequentati dai bambini (US-EPA, 2006). In Sud Africa l'uso domestico è stato interrotto nel 2010 (DAFF, 2010). Il Europa è stato approvato l'utilizzo negli stati membri fino a giugno 2016, ad eccezione di Danimarca, Finlandia, Lituania,

Lettonia e Svezia (IUPAC, 2012). Nonostante ciò, si sta rivalutando il suo utilizzo in diversi paesi come in Unione europea, Nuova Zelanda e Stati Uniti.

Residui di chlorpyrifos sono stati trovati nel suolo, sedimenti, acque sotterranee e superficiali, acque di scarico, sedimenti marini, aria, pioggia, neve e nebbia (Watts, 2013). L'EPA (2006) dichiara che il 15% dei corsi d'acqua degli USA risultano contaminati; in Canada è stato individuato ad alti livelli nelle acque superficiali in zone rurali e urbane (Woudneh et al., 2009), così come in Cina (Zhong et al., 2012), Bangladesh (Bhattacharjee et al., 2012); Argentina (Bonansea et al., 2013), Spagna (Claver et al., 2006) e nelle acque costiere mediterranee in Turchia (Tuncel et al., 2008). In Italia sono stati misurati livelli di chlorpyrifos in acque superficiali pari a 0.275 µg/L (EC, 2005). Più di recente l'ISPRA (2013) (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) ha indicato che il chlorpyrifos è uno dei pesticidi più rilevati nelle acque superficiali in Italia.

La direttiva europea 2000/60/CE lo inserisce nell'elenco delle sostanze prioritarie da sottoporre a valutazione per preservare la qualità delle acque. Tale pesticida, infatti, rientra tra i criteri della Convenzione di Stoccolma del 2001 sugli inquinanti organici capaci di persistere nell'ambiente per lunghi periodi. Inoltre, è stato inserito nella PAN International list dei pesticidi altamente pericolosi (PAN Int, 2011).

Il chlorpyrifos agisce interferendo con il sistema nervoso a livello del legame del sito attivo dell'acetilcolinesterasi (AChE), come tutti gli organofosfati. L'AChE degrada il neurotrasmettitore acetilcolina che a sua volta attiva i neuroni colinergici e le cellule nervose che controllano i segnali nel sistema nervoso periferico, cervello e midollo spinale. Se l'acetilcolina non viene inattivata subito dopo aver legato il suo recettore, i neuroni diventano over-stimolati, come conseguenza si registrano disturbi sensoriali e comportamentali, incoordinazione, diminuzione delle funzione motorie, depressione respiratoria, tremori, e convulsioni fino alla morte (Reigart & Roberts, 1999; Colborn, 2006; NPIC, 2009).

Una volta nell'organismo le molecole di chlorpyrifos vengono metabolizzate completamente nel fegato dal sistema citocromo P450 (CYP450) in chlorpyrifos oxon e successivamente in 3,5,6-tricloro-2-pyridinol (TCP) (Hodgson & Rose, 2008). Il metabolita chlorpirifos oxon risulta essere ancora più tossico del chlorpirifos stesso (Verma et al., 2009).

I diversi usi e le applicazioni del chlorpyrifos sul terreno, sulla vegetazione e sugli animali possono comportare l'esposizione anche di numerosi organismi non target. Nell'uomo le principali vie di esposizione al chlorpyrifos sono: contatto cutaneo diretto (anche con contatto con superfici trattate e collari anti-pulci), ingestione di polveri e cibo contaminati ed inalazione (PAN, 2007). Il chlorpyrifos ed i suoi principali metaboliti, come il TCP, vengono eliminati principalmente attraverso i reni (WHO, 2009).

I principali sintomi di un'esposizione a basse dosi al chlorpyrifos possono includere mal di testa, agitazione, incapacità di concentrazione, debolezza, stanchezza, nausea, diarrea e visione offuscata; a dosi più alte, crampi addominali, vomito, sudorazione, lacrimazione, tremori muscolari, bassa pressione sanguigna, difficoltà nella respirazione o depressione respiratoria e rallentamento del battito cardiaco (PAN, 2007). Ripetute o prolungate esposizioni potrebbero portare agli stessi effetti dati da un'esposizione acuta. Altri effetti segnalati nei lavoratori esposti ripetutamente includono difficoltà di memoria e di concentrazione, disorientamento, grave depressione, irritabilità, confusione, cefalea, difficoltà di parola, ritardo nei tempi di reazione, incubi, sonnambulismo, insonnia e sonnolenza (EXTOXNET, 1996).

Diversi studi affermano che il chlorpyrifos causa un aumento dei radicali liberi e causa stress ossidativo (Attia et al., 2012; Kalender et al., 2012; Elsharkawy et al., 2013). Lo stress ossidativo in associazione all'inibizione dell'AChE è alla base della neurotossicità del chlorpyrifos (Slotkin & Seidler, 2009); inoltre, provoca danni ai neuroni dopaminergici in quanto l'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) coinvolge i mitocondri, innescando un meccanismo che può portare a malattie neurodegenerative (Lee et al., 2012).

Di recente, il chlorpyrifos è ritenuto un possibile distruttore endocrino (EDC): agisce come potente anti-androgeno su ratti (Viswanath et al., 2010), può aumentare il rischio di cancro al seno attraverso un meccanismo estrogenico (Ventura et al., 2012), ha effetti sulla tiroide nei topi (De Angelis et al., 2009; Haviland et al., 2010) e nelle pecore (Rawlings et al., 1998). Vandenberg (2012), inoltre, ha suggerito che su animali *in vivo* esposti a chlorpyrifos gli effetti non seguano una classica curva dose-risposta, ma invece abbiano un andamento non-

monotonico, rientrando quindi tra quelle sostanze distruttrici endocrine i cui meccanismi di azione non sono ancora stati ben interpretati (Birnbaum, 2012).

Per quanto riguarda gli organismi acquatici il chlorpyrifos è moderatamente/altamente tossico negli anfibi e in invertebrati acquatici mentre è altamente tossico nei pesci. In particolare, è stato suggerito che il chlorpyrifos abbia contribuito insieme ad altri pesticidi al declino registrato in alcune popolazioni nordamericane di anfibi (Sparling et al., 2001); inoltre questo pesticida è in grado di incrementare il tempo alla metamorfosi (Sparling & Fellers, 2009), ridurre il peso corporeo (Richards & Kendall, 2003), causare degenerazione epiteliale e teratogenicità (Bernabò et al., 2011a). A concentrazioni rilevabili in natura induce anche gravi malformazioni, soprattutto scheletriche, e alterazioni comportamentali e del nuoto (Jayawardena et al., 2010). Come distruttore endocrino è stato dimostrato che il chlorpyrifos è in grado di causare alterazione della differenziazione sessuale in *Rana dalmatina* (Bernabò et al., 2011b).

Nei pesci il chlorpyrifos, come detto in precedenza, agisce inibendo la AChE (Assis et al., 2012; Oruc, 2012). Dal 1974 al 2005 il chlorpyrifos è stato ritenuto responsabile di numerosi casi di moria di popolazioni ittiche in USA (US-EPA, 2009), in Gran Bretagna (PAN UK, 2001) e in Australia (NRA, 2000). Costituisce, inoltre, una minaccia a lungo termine per i pesci in quanto può accumularsi in aree rilevanti dal punto di vista della riproduzione di molte specie (litorali, delta dei fiumi) (Gebremariam et al., 2012).

I fenomeni di bioaccumulo variano tra specie diverse, e sono influenzati dalla durata dell'esposizione e dalla dose. I fattori che possono facilitare tale fenomeno sono il tasso metabolico e di depurazione, la biodisponibilità del pesticida e la disponibilità di cibo (Eisler, 2000). Residui di chlorpyrifos sono stati riscontrati in tessuti di diverse specie di pesci in Egitto (Wang et al., 2012), USA (Sapozhnikova et al., 2004); Taiwan (Sun & Chen, 2008), India (Muddasir et al., 2012), Ghana (Essumang et al., 2009).

Huynh & Nugegoda (2012) hanno osservato che più esposizioni brevi a chlorpyrifos causano nel pesce gatto australiano (*Tandanus tandanus*) una riduzione della crescita associata alla diminuzione nell'assunzione di cibo. È noto l'effetto ossidante causato dal chlorpyrifos su diverse specie di pesci (Kavitha & Rao, 2008; Xing et al., 2012a). Concentrazioni sub-letali in *Cyprinus carpio* esposto per 40 giorni

causano una riduzione degli enzimi antiossidanti (Xing et al., 2012b); in *Oreochromis niloticus* la superossido dismutasi (SOD) e la malondialdeide (MDA) subiscono un aumento in seguito ad una esposizione a 5, 10 e 15 µg/l di chlorpyrifos per 15 e 30 giorni, al contrario, la glutatione-S-transferasi (GST) e la catalasi (CAT) vengono ridotti (Oruc, 2012). Wu e collaboratori (2011) sottolineano che gli enzimi SOD e CAT aumentano la loro attività a basse concentrazioni e, invece, la abbassano ad alte concentrazioni.

Per quanto riguarda gli effetti mutagenici, Ali e collaboratori (2008) hanno osservato in *Channa punctata* la presenza di micronuclei e danni al DNA già dopo 24 ore dopo esposizione a concentrazioni subletali di chlorpyrifos. Deformità spinali vengono riportate per *Salmo gairdneri* dopo solo 48 ore di esposizione a concentrazione di chlorpyrifos maggiori 47 µg/L (Holcombe et al., 1982).

Il chlorpyrifos, come distruttore endocrino, in *Oreochromis niloticus*, causa l'abbassamento dei livelli di cortisolo, estradiolo e testosterone, e modifica l'indice gonadosomanico (Oruc, 2010). Diversi studi riportano numerose alterazioni neurocomportamentali in seguito ad esposizione a chlorpyrifos: esposizioni sub-chroniche, infatti, causano alterazioni dell'orientamento e della localizzazione in *Pimephales promelas* (Holcombe et al., 1982); una riduzione della velocità di nuoto nel salmone argentato (*Oncorhynchus kisutch*) (Sandahl et al., 2005), e nelle larve e negli adulti di *Danio rerio* (Richendrfer et al., 2012).

Capitolo 2

La respirazione nei vertebrati acquatici

2.1. Premessa

Ogni organismo vivente deve soddisfare due passaggi basilari della respirazione cellulare: l'acquisizione di ossigeno e l'eliminazione della CO_2 . I gas respiratori vengono trasferiti passivamente attraverso la superficie corporea e dunque tale fenomeno è determinato soprattutto dalla superficie di scambio disponibile. La quantità di ossigeno richiesta e la conseguente produzione di anidride carbonica di un animale aumentano in proporzione alla sua massa ed allo stato di attività. Solo in animali molto piccoli il trasporto per diffusione sarà sufficiente a sostenere la richiesta metabolica di tali gas; infatti, il rapporto tra area di superficie e volume di un animale deve essere adeguatamente elevato: poiché l'area della superficie cresce in ragione del quadrato, mentre il volume aumenta in ragione del cubo, solo organismi delle dimensioni massime di circa 0.5 mm di raggio riescono a rispondere a questi criteri. Organismi di dimensioni maggiori non riescono a soddisfare le richieste metaboliche solo tramite un trasporto per diffusione attraverso la sua superficie esterna. È per questo che negli animali si sono evoluti diversi sistemi per facilitare lo scambio gassoso con l'ambiente (Randall et al., 1999).

Nei Vertebrati, gli organi utilizzati per la respirazione sono le branchie, i polmoni ed il tegumento. Tali strutture devono rispondere a caratteristiche ben precise: devono essere caratterizzate da superfici sufficientemente ampie e devono essere caratterizzate da epitelii sottili e riccamente vascolarizzati; questo tipo di struttura di base garantisce, infatti, una stretta associazione tra il sangue e il mezzo esterno e, grazie alla piccolissima distanza di diffusione, lo scambio dei gas può avvenire rapidamente. Bisogna sottolineare che, oltre alle caratteristiche appena citate, le strutture specializzate sono diversificate in base alle caratteristiche del

mezzo in cui tali animali vivono. Per questo motivo, gli animali a respirazione aerea e quelli a respirazione acquatica hanno apparati respiratori molto differenti, e differenti modalità di aereazione. In particolare, la respirazione nei vertebrati acquatici deve affrontare ulteriori problematiche date dalle composizione gassosa e dalle caratteristiche fisiche di acqua e aria (Martini, 1994; Kent, 1997).

Il contenuto di ossigeno dell'aria è circa 20 volte superiore a quello dell'acqua satura di aria ed inoltre il tasso di diffusione dell'ossigeno nell'acqua è molto inferiore rispetto al suo tasso di diffusione nel mezzo aereo; è dunque evidente che per estrarre una determinata quantità di ossigeno il volume di acqua che deve passare sulla superficie respiratoria di un vertebrato acquatico è maggiore del corrispondente volume di aria che deve ventilare il polmone in un animale terrestre. Inoltre, la densità dell'acqua (1000 volte superiore a quella dell'aria a pressione normale) e la sua viscosità (100 volte quella dell'aria) comportano un lavoro respiratorio più intenso. Il 20% del consumo di ossigeno di un pesce, ad esempio, viene speso proprio per sostenere la respirazione ed è una percentuale piuttosto alta se confrontata alla percentuale di ossigeno spesa per la respirazione polmonare dai Mammiferi (pari solo all'1-2%). La CO₂, al contrario, è estremamente solubile in acqua e gli ambienti acquatici hanno di solito pressioni parziali di anidride carbonica superiori a quelle dell'atmosfera (Berne & Levy, 2010).

L'ossigeno contenuto nei corpi idrici naturali è determinato da diversi fattori; una parte viene prodotta direttamente durante la fotosintesi dalle piante acquatiche, mentre la restante parte proviene dall'atmosfera, attraverso il fenomeno di diffusione. Azioni meccaniche naturali consentono ai gas atmosferici di miscelarsi nei corpi idrici. I corsi d'acqua vengono aerati quando l'acqua percorre rapide, mentre nei corpi idrici più grandi le onde aerano gli strati superficiali, ma non interessano, invece, i livelli più profondi di qualche metro. Nel caso dei corpi idrici stazionari, comprendenti i laghi, ma anche gli oceani ed i mari, i movimenti convettivi sono fenomeni rilevanti che aumentano la quantità di ossigeno disciolto. Essi sono determinati dal riscaldamento diurno ad opera dei raggi solari seguito dal raffreddamento notturno dovuto all'evaporazione e dalle variazioni stagionali della temperatura. Tuttavia, anche in questo caso, tale fenomeno non influenza gli strati profondi dei corpi idrici stazionari, soprattutto di grandi dimensioni; il contenuto di

ossigeno, infatti, può variare notevolmente procedendo dalla superficie verso il fondo.

In altri casi la quantità di ossigeno può subire una diminuzione a causa della decomposizione della sostanza organica ad opera dei microrganismi presenti nei sedimenti, con conseguente aumento dell'anidride carbonica disciolta. Lo stesso effetto è causato anche dalla prolungata oscurità o dalla copertura di neve e ghiaccio. In quest'ultimo caso, la copertura della superficie impedisce all'ossigeno atmosferico di diffondere nel mezzo acquatico e, inoltre, l'assenza di energia luminosa ostacola la fotosintesi algale; il mancato apporto di ossigeno, unitamente ad un invariato consumo da parte degli organismi, comporta un drastico abbassamento del tenore di ossigeno che spesso provoca la cosiddetta "uccisione invernale", una vasta moria di animali acquatici frequente soprattutto nei laghi e negli ambienti acquatici stagnanti di medie e piccole dimensioni.

Altri due fattori che influenzano il contenuto di ossigeno nel mezzo acquatico sono la temperatura e la salinità. Nel primo caso, la solubilità di un gas nell'acqua diminuisce con l'aumentare della temperatura. Ad esempio, un aumento di temperatura da 5° C a 35°C riduce il contenuto di ossigeno da 9 a 5 ml/L. In aggiunta, negli animali ectotermi si registra un incremento nel metabolismo, dunque un maggiore dispendio di ossigeno, causato dalla temperatura più elevata.

Nel secondo caso, la solubilità dell'ossigeno decresce in ragione dell'aumentare della concentrazione salina. Quindi, in generale, l'acqua di mare contiene meno ossigeno rispetto all'acqua dolce. Infatti, nelle identiche condizioni di temperatura e pressione parziale l'acqua al 3.6% di NaCl (approssimativamente la salinità dell'oceano) contiene 38 ml O₂/L mentre l'acqua pura contiene 49 ml O₂/L (Poli, 2006).

2.2. Le branchie nei pesci

Nelle diverse classi di Vertebrati a respirazione acquatica (Ciclostomi, Pesci e Anfibi alla stadio larvale), l'apparato branchiale è l'organo principale deputato agli scambi gassosi. Le branchie non svolgono però solo una funzione respiratoria e in alcuni casi si assiste ad una ulteriore specializzazione di tale struttura che può essere coinvolta nella regolazione osmotica e acido-base, e/o nell'alimentazione.

All'interno della superclasse *Pisces*, la struttura e l'organizzazione dell'apparato branchiale risultano estremamente variabili. Differenze caratterizzano i taxa di rango inferiore, ma possiamo generalizzare descrivendo l'organizzazione nei Condroitti e negli Osteitti.

2.2.1. Condroitti

Nella sottoclasse degli Elasmobranchi, il cranio viscerale è costituito da porzioni cartilaginee. La prima arcata cartilaginea è detta arcata mandibolare, la seconda ioidea, mentre quelle successive sono le arcate branchiali e possono essere 5 o 6. Il condotto spiracolare si colloca tra l'arcata mandibolare e ioidea, le camere branchiali sono collocate tra l'arcata ioidea e la prima arcata branchiale e tra le arcate branchiali successive. Il condotto spiracolare non contiene strutture respiratorie, mentre ciascuna arcata branchiale è costituita da setti branchiali che raggiungono la superficie. I setti branchiali risultano rivestiti dalla lamina branchiale che rappresenta la struttura respiratoria. Il setto branchiale è caratterizzato dai raggi branchiali, strutture bastoncellari cartilaginee che si inseriscono perpendicolarmente all'arcata branchiale. La lamina respiratoria risulta così suddivisa in altrettante lamelle branchiali primarie quanti sono i raggi branchiali; da ciascuna lamella si dipartono poi numerose lamelle secondarie. Le camere respiratorie sono protette da brevi processi scheletrici detti branchiostegi, che ostruendo le aperture che immettono dal faringe alle camere branchiali, costituiscono un filtro che impedisce alle particelle alimentari di entrare nelle camere respiratorie. Nel caso degli Olocefali gli spiracoli non sono presenti, e le branchie risultano costituite da un'unica e ampia piega cutanea, che, come un opercolo, riveste le 4 fenditure branchiali molto ravvicinate tra loro. Il meccanismo respiratori nei pesci cartilaginei è determinato dal flusso di acqua che entra dalla bocca. Successivamente la bocca si chiude e il pavimento della cavità orale si solleva per spingere l'acqua verso le branchie e farla poi uscire dalle fenditure branchiali (Kent, 1997).

2.2.2. Osteitti

Gli Osteitti sono caratterizzati da uno splancnocranio più complesso, rispetto ai Condroitti, formato da nuovi elementi scheletrici di natura ossea. L'arcata mandibolare e quella ioidea sono costituite da un numero di diversi elementi spesso articolati mobilmente tra loro. Anche ciascuna delle arcate branchiali, in numero di

5 per ciascun lato, è formata da più ossa denominate: faringobranchiale, epibranchiale, ceratobranchiale, ipobranchiale e basibranchiale; quest'ultimo connette tra loro le due arcate eterolaterali.

Lo spiracolo e la piega, precedentemente descritti negli Elasmobranchi e negli Olocefali, vengono sostituiti da una struttura analoga che risulta sostenuta da lamine ossee dette ossa opercolari. La comparsa degli opercoli è associata anche ad una diversa organizzazione della branchia. Le lamelle branchiali risultano direttamente inserite nell'arcata branchiale, dando una caratteristica conformazione "a pettine". Da ogni arco dipartono due serie di filamenti o lamelle, che a loro volta risultano caratterizzati da una doppia fila di lamelle secondarie. Internamente all'arco il margine è dotato invece da una serie di branchiospine, provviste di numerosi dentelli che costituiscono una sorta di filtro atto a bloccare le particelle di cibo o i corpi estranei che potrebbero danneggiare la branchia (Padoa, 1986)

La diversa conformazione della branchie è associata anche ad un diverso meccanismo respiratorio. Nei Pesci ossei si realizza in due tempi: una fase inalante, in cui gli opercoli si chiudono e la cavità boccale si dilata creando una pressione negativa che fa scorrere l'acqua sulle branchie; una fase esalante, durante la quale la cavità boccale si contrae, la bocca rimane chiusa per impedire il reflusso dell'acqua, che viene forzata sulle branchie e fuoriesce attraverso le aperture opercolari.

Per quanto riguarda i meccanismi osmotici è doveroso fare una digressione sulle differenze tra i pesci ossei di acqua dolce e quelli marini. Gli Osteitti di acqua dolce sono iperosmotici rispetto all'ambiente esterno. La loro osmolarità è compresa tra 200 e 300 mOsm/L, mentre quella dell'acqua dolce è molto inferiore ai 50 mOsm/L. Per cui si trovano nella condizione di dover fronteggiare il continuo ingresso di acqua dall'esterno e il relativo rigonfiamento, nonché la continua perdita di sali. L'accumulo di acqua viene evitato rimuovendone l'eccesso attraverso la produzione di urina molto diluita, grazie anche ad un sistema renale molto sviluppato; il sistema renale, infatti, è tale da permettere il riassorbimento di sali importanti come KCl, NaCl, CaCl₂ che altrimenti andrebbero persi. Tuttavia una minima parte è comunque perduta attraverso le urine, e quindi i sali sono integrati attraverso l'alimentazione. Attraverso le branchie possono essere assorbiti dall'esterno ioni sodio e cloro, anche quando nell'acqua la concentrazione di NaCl è molto bassa. Tale meccanismo di trasporto attivo richiede molta energia ed è

capace di operare contro un gradiente di concentrazione elevatissimo (Liem et al., 2012).

I pesci ossei marini sono iposmotici rispetto all'acqua di mare (gli elasmobranchi hanno fluidi leggermente iperosmotici rispetto all'ambiente esterno), e devono quindi fronteggiare una continua perdita di acqua e un continuo ingresso di sali che devono smaltire. Per evitare questo bevono continuamente assumendo, quindi, grandi quantità di sali. Quest'ultimi vengono eliminati in due fasi. Inizialmente circa l'80% dell'acqua ingerita è assorbita a livello intestinale, insieme a NaCl e a KCl. Ma si tratta già di acqua diluita in precedenza a livello dell'esofago, dove per diffusione vengono eliminati circa il 50% dei sali. A livello del piccolo intestino si ha invece un assorbimento attivo di ioni monovalenti, mediante un cotrasportatore $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$, mentre gli ioni bivalenti Ca^{2+} , Mg^{2+} e SO_4^{2-} sono escreti insieme all'acqua attraverso l'ano. Infine l'eccesso di Na^+ , Cl^- e parte del K^+ viene eliminato dal sangue attraverso un altro meccanismo di trasporto attivo a livello delle branchie. Il sistema renale produce urina isotonica con il sangue, ma è ricca di ioni bivalenti che non vengono secreti attraverso le branchie (Randall et al., 1999).

2.3. L'epitelio del filamento: organizzazione e componenti cellulari nei Teleostei

Il filamento branchiale rappresenta l'unità funzionale della branchia, mentre l'unità respiratoria è rappresentata dalla lamella secondaria. Il primo, infatti, è dotato di un sistema motore proprio ed è sede dei principali siti di controllo vascolare, la seconda, invece, è sede degli scambi gassosi. La branchia dei pesci, quindi, non svolge solo la funzione respiratoria, ma rappresenta anche la sede della osmoregolazione e dello scambio ionico. La diversità funzionale di tale organo si riflette sulla morfologia degli epitelii deputati alle diverse funzioni.

L'epitelio del filamento è formato da diversi strati e riveste i filamenti branchiali, con l'esclusione delle lamelle, e le superfici anteriori e laterali degli archi branchiali. Esso è costituito da 5 tipi cellulari: cellule indifferenziate (cellule basali), cellule pavimentose, cellule mucose ("goblet cells") e "chloride cells" (Laurent, 1984).

2.3.1. *Cellula pavimentosa*

È una cellula di superficie che possiede forma poligonale e un diametro compreso tra 3 e 10 μm ; essa rappresenta il tipo cellulare più comune nell'epitelio del filamento. Diversi studi, mediante osservazione al SEM (Hughes, 1979; Kendall & Dale, 1979) hanno mostrato la presenza, sulla superficie esterna della cellula pavimentosa, di un complesso sistema di microcreste.

Le microcreste possono variare leggermente in forma e dimensioni nelle diverse specie ma in genere hanno una lunghezza che varia da 5 a 15 μm ed una larghezza compresa tra 0.15 e 0.20 μm . Nella porzione superficiale il confine tra le cellule pavimentose adiacenti non è sempre chiaramente definito, ma in molti casi le microcreste che decorrono parallelamente al limite cellulare rendono tale confine piuttosto marcato. Un altro tipo di cellula pavimentosa è presente nell'epitelio del filamento: la cellula colonnare; questo secondo tipo cellulare, osservato al SEM, non è distinguibile dalle altre cellule di superficie, ma la sua ultrastruttura è invece caratteristica per la presenza di un grande numero di vescicole citoplasmatiche e per le profonde inflessioni delle membrane parietali.

2.3.2. *Cellula mucosa o goblet cell*

Le cellule mucose sono collocate principalmente lungo i margini del filamento; solo poche cellule di questo tipo vengono rinvenute nell'area interlamellare dove prendono contatto con le "chloride cells". Una lunga serie di osservazioni in differenti specie e in diverse condizioni sperimentali hanno mostrato tuttavia che il numero e la collocazione delle popolazioni di goblet cells è estremamente variabile. In particolare il numero di cellule mucose è influenzato dalla salinità del mezzo acquatico. Nei Teleostei d'acqua dolce *Gambusia* e *Catla*, le cellule mucose scompaiono completamente quando il mezzo contiene cloro, persino a basse concentrazioni (Ahuja, 1970); in *Anguilla japonica* il numero diminuisce dopo un mese di acclimatazione in acqua salata. Nel pesce eurialino *Etroplus maculatus*, durante un graduale adattamento dall'acqua dolce all'acqua salata al 100%, le cellule mucose subiscono un decremento numerico ma aumentano di dimensioni. Al 100% di acqua salata esse sono ridotte ad un numero trascurabile (Virabhadrachari, 1961).

Il ruolo delle cellule mucose non è ancora stato pienamente chiarito, ma si ritiene che esse possano essere attivamente coinvolte nell'osmoregolazione: il

numero più elevato di goblet cells rinvenuto nei pesci d'acqua dolce fa pensare ad un ruolo di controllo esercitato da questa cellula nella perdita di ioni o nell'influsso d'acqua.

2.3.3. Chloride cell

Una delle caratteristiche principali dell'epitelio branchiale dei Pesci è la presenza della chloride cells (CC). Questo tipo cellulare è attivamente coinvolto nell'osmoregolazione ed è in grado di svolgere sia la funzione di escrezione ionica che la funzione di assorbimento.

Generalmente le chloride cells si rinvengono nell'epitelio dei filamenti branchiali, ma a volte sono presenti anche nell'epitelio delle lamelle (Laurent, 1984; 1989; Pisam & Rambourg, 1991). Oltre che nelle branchie, le chloride cells sono state rinvenute anche nella pelle dei pesci (Nonnotte et al., 1979), nelle pseudobranchie (Laurent & Dunel, 1980), e nell'epitelio opercolare (Karnaky et al., 1984; Foskett & Hubbard, 1981).

La chloride cells presenta, in genere, dimensioni maggiori rispetto agli altri tipi cellulari che costituiscono l'epitelio del filamento; spesso la CC si estende per l'intero spessore del foglietto epiteliale presentando così la porzione apicale a diretto contatto con il mezzo esterno e la porzione prossimale adagiata sulla membrana basale. La membrana plasmatica apicale della chloride cell, nei pesci marini, è depressa a formare una cripta piuttosto profonda contenente muco e suddivisa da setti tra loro interconnessi o da microvilli; nei pesci d'acqua dolce, invece, la membrana apicale si presenta solo leggermente depressa (Pisam & Rambourg, 1991).

La CC è caratterizzata dalla presenza all'interno del citoplasma di un grande numero di mitocondri e di un sistema estremamente complesso di tubuli che si aprono verso la membrana basolaterale (Laurent, 1984; Pisam & Rambourg, 1991). Il sistema tubulare si estende attraverso l'intero citoplasma, eccetto che nell'area del Golgi e in una banda ristretta situata proprio sotto la superficie apicale delle chloride cells (Pisam & Rambourg, 1991). Questo complesso sistema di membrane plasmatiche basolaterali è ricco in Na^+/K^+ -ATPasi (Jürss & Bastrop, 1995); al contrario la membrana plasmatica apicale e le vescicole di secrezione mostrano una reazione istochimica debole per lo stesso enzima (Hootman & Philpott, 1979).

La chloride cell, nei Teleostei stenoalini marini e nei Teleostei eurialini acclimatati all'acqua salata, è circondata da cellule accessorie caratterizzate dalla presenza di processi citoplasmatici che penetrano nella porzione apicale delle CC (Laurent & Hebibi, 1989). Le cellule accessorie hanno forma a pera o a semiluna e presentano un sistema tubulare simile a quello delle CCs, ma meno sviluppato. Le porzioni apicali delle CC e le cellule accessorie associate formano un mosaico che crea le pareti delle cripte presenti nella membrana plasmatica apicale delle CCs (Pisam & Rambourg, 1991).

2.4. L'epitelio lamellare: organizzazione e componenti cellulari nei Teleostei

L'epitelio lamellare riveste la ramificazione terminale delle branchie e rappresenta il sito principale degli scambi respiratori. Lo spessore degli strati è infatti modesto e dunque idoneo a consentire la diffusione dei gas. L'epitelio lamellare si origina da cellule non differenziate dell'epitelio del filamento (Morgan, 1974) ed è costituito da due strati di cellule. Tra lo strato più interno (sierosale o basale) e quello più esterno (mucosale o apicale), si colloca uno spazio intercellulare, che comunica con il seno venoso centrale attraverso gli spazi intercellulari dell'epitelio del filamento. Le cellule che compongono i due strati presentano caratteristiche differenti ma in entrambi i casi è stata evidenziata, mediante studi al microscopio elettronico, la presenza nel citoplasma di numerosi organuli cellulari che sono indice dell'intensa attività di tutte le cellule (Laurent & Dunel, 1980).

Lo strato mucosale è costituito principalmente da cellule pavimentose; queste sono dotate di un apparato di Golgi molto sviluppato, di un abbondante reticolo endoplasmatico rugoso e di numerose vescicole di secrezione di differenti dimensioni. Probabilmente la funzione di questo strato epiteliale è quella di costituire una barriera impermeabile all'acqua ed agli ioni per consentire il controllo nell'efflusso o nell'influsso attraverso la superficie branchiale la quale ha dimensioni quasi doppie rispetto all'intera area di superficie del corpo dell'animale (Hughes, 1979). Le cellule superficiali sono legate tra loro tramite giunzioni strette e desmosomi; non sono state osservate giunzioni "gap". Le giunzioni strette sono

state studiate in esemplari di *Mugil capito* adattati all'acqua di mare e all'acqua dolce; in entrambi i casi sono state osservate giunzioni piuttosto lunghe, costituite da 5 a 9 microfilamenti anastomizzati tra loro. Questo modello di disposizione, che non varia in base al tipo di ambiente in cui l'animale vive, è compatibile con la classificazione delle giunzioni generalmente utilizzata e l'epitelio lamellare può essere considerato un epitelio "stretto" e, pertanto, impermeabile agli elettroliti.

La superficie delle cellule è ricoperta da un materiale lanuginoso, contenente gruppi polisaccaridici; questo strato mucoso, probabilmente, si ancora alle microcreste di superficie, evidenziate da Laurent & Dunel (1980) con studi di microscopia elettronica a scansione.

Lo strato basale o sierosale dell'epitelio lamellare è costituito, invece, da cellule poco o niente affatto differenziate, le quali sono a diretto contatto con la lamina basale. Il rapporto nucleo/citoplasma di queste cellule è molto elevato e la presenza di numerosi ribosomi liberi e di un reticolo endoplasmatico rugoso ben sviluppato suggeriscono l'inizio di un processo di differenziazione di queste cellule (Laurent & Dunel, 1980). Presumibilmente, la funzione di questo strato di cellule in differenziazione è quella di sostituire lo strato di cellule superficiali, così come si verifica con le cellule basali dell'epitelio del filamento. Solo occasionalmente le cellule basali si differenziano nelle chloride-cells (Laurent & Perry, 1991).

Capitolo 3

Specie studiate

3.1. *Thalassoma pavo*

SUBPHYLUM	Vertebrati
CLASSE	Osteitti
SOTTOCLASSE	Actinopterigi
INFRACLASSE	Teleostei
ORDINE	Perciformi
FAMIGLIA	Labridi
GENERE	<i>Thalassoma</i>
SPECIE	<i>Thalassoma pavo</i>

Tabella 3.1 Sistematica di *Thalassoma pavo* (Mitchell et al., 1991)

3.1.1. *Geonemia*

Thalassoma pavo popola la fascia tropicale e subtropicale dell'Atlantico orientale e tutto il Mediterraneo. In particolare nei mari italiani è abbastanza comune nel Basso Tirreno e nello Ionio. Poco frequente nell'Alto Adriatico e nel Mar Ligure (Costa, 2000). La presenza di questa specie nel Mar Mediterraneo è un fenomeno piuttosto recente. Negli ultimi decenni, infatti, l'innalzamento della temperatura del Mediterraneo, già caratterizzato da un'abbondantissima biodiversità, ha agevolato l'immigrazione di nuove specie prima tipicamente confinante alle fasce tropicali.

3.1.2. *Morfologia*

Thalassoma pavo ha corpo fusiforme e compresso lateralmente, testa ovale a punta con muso corto e bocca piccola con labbra carnose assai sviluppate. Di qui

appunto il nome con cui è contraddistinta la famiglia. L'occhio è piccolo e circolare, sulle mascelle sono inseriti denti appuntiti, a uncino, disposti su una sola fila. La pinna dorsale è unica con la porzione anteriore sorretta da raggi spinosi. Il profilo superiore, dal muso alla base della pinna dorsale, è convesso. La pinna caudale è tronca negli esemplari giovani, con i lobi allungati ed appuntiti negli adulti. La pinna anale è allungata ma con raggi corti mentre quelle ventrali in posizione toracica sono piccole poste sotto le pettorali di dimensioni maggiori (Brunelli et al., 2004).

Il corpo, ad eccezione della testa, è ricoperto di piccole squame il cui numero, sulla linea laterale, varia da 26 a 31. L'animale presenta scaglie cicloidi.

Si tratta senza dubbio di uno fra i pesci più colorati dei nostri mari, presenta infatti livree estremamente varie a dai colori vivaci. Le femmine (Fig. 3.1) hanno una colorazione di fondo verdastra con sei fasce verticali, che arrivano quasi al ventre, di colore violaceo con striature terminali rosse. La testa è generalmente violacea. Le pinne, dorsale e anale, presentano colori verdi, ciclamino e blu. La coda è variamente colorata con dominanza di toni violacei. All'apice delle pinne pettorali c'è una debole macchia brunastra. Caratteristica costante è la presenza sul dorso di una grossa macchia blu violetto molto intenso, a circa metà lunghezza dell'animale.

I maschi (Fig. 3.2), invece, si presentano con colori di fondo tendenti sempre al verdastro ma la testa è a chiazze rosse e blu. Una fascia azzurro, bordata da un'altra di colore rosso scarlatto circonda tutto il corpo all'altezza delle pinne pettorali. La pinna dorsale, superiormente, ha un bordo azzurro pallido seguito da una fascia longitudinale violacea, con sfumature rosse. La pinna pettorale ha all'apice una macchia nerastra. La coda ha i raggi esterni di colore rosso più o meno intenso. Da adulti gli esemplari di questa specie raggiungono una lunghezza massima di 20-25 cm (Brunelli et al., 2004).



Fig. 3.1 Esemplare femmina di *Thalassoma pavo*

3.1.3. Habitat e biologia

Thalassoma pavo vive in habitat che spaziano dai fondali rocciosi ai fondali sabbiosi di mari e oceani temperati e tropicali. Nel Mediterraneo vive in acque costiere su fondi rocciosi e praterie di Posidonia. Può spingersi fino a 150 metri di profondità. Si alimenta di molluschi gasteropodi e crostacei. Si pesca occasionalmente con nasse e tramagli. Abbonca di rado alle lenze per via sia della bocca piccola e sia perché rosicchia l'esca fino a mettere a nudo l'amo. Gli esemplari di questa specie sono molto attivi durante il giorno, mentre nelle ore notturne, restano adagiati su un fianco o affondano nel substrato molle (Mojetta & Ghisotti, 2000).

3.1.4. Riproduzione e sviluppo

Conformemente alle caratteristiche tipiche della sua famiglia, *Thalassoma pavo* è una specie ermafrodita proteroginica in cui cioè la gonade femminile si sviluppa e funziona prima di quella maschile. In un primo tempo la maggior parte degli individui si sviluppano come femmine ed in età avanzata possono mutare il loro assetto sessuale da femminile a maschile. L'inversione sessuale non è sempre contemporanea al cambiamento di livrea e dipende generalmente da fattori ambientali, sembra infatti che addirittura la temperatura dell'acqua partecipi al processo d'inversione. La strategia riproduttiva è associata al territorialismo e alla difesa da parte del maschio dominante di un harem composto da un certo numero

di femmine. In caso di morte del maschio o rimozione del maschio dominante, la femmina di maggiori dimensioni, cambia sesso nell'arco di alcuni giorni fino alla totale inversione sessuale e conseguente sostituzione del maschio.



Fig. 3.2 Esemplare maschio di *Thalassoma pavo*

La riproduzione avviene tra giugno e luglio e porta alla produzione di un numero molto elevato di uova galleggianti che favoriscono la vita pelagica. È assente quindi ogni sorta di cura parentale (Costa, 2000; Mojetta & Ghisotti, 2000).

3.2. *Carassius auratus*

SUBPHYLUM	Vertebrati
CLASSE	Osteitti
SOTTOCLASSE	Actinopterigi
INFRACLASSE	Teleostei
ORDINE	Cipriniformi
FAMIGLIA	Ciprinidi
GENERE	<i>Carassius</i>
SPECIE	<i>Carassius auratus</i>

Tabella 3.2 Sistematica di *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758)

3.2.1. *Geonemia*

Carassius auratus è una specie originaria delle regioni centrali e orientali dell'Asia, ma è da tempo introdotta in altre aree ed è estremamente difficile ricostruire il suo areale originario. Esempari si possono trovare facilmente nelle acque continentali di Europa e Asia, mentre in America settentrionale presenta una distribuzione molto discontinua. In Italia è una specie alloctona diffusa nelle acque naturali in seguito a immissioni accidentali o volontarie, in particolare nella Pianura Padana. È una delle specie ornamentali più popolari negli acquari di tutti il mondo (Lever, 1996).

3.2.2. *Morfologia*

Carassius auratus presenta una struttura anatomica proporzionata, con corpo piuttosto affusolato, ma robusto. La taglia media si aggira intorno ai 15-20 cm di lunghezza con un peso di 100-300 g. Gli esemplari possono raggiungere dimensione massima di circa 60 cm di lunghezza e fino a 3 kg di peso. Tutte le pinne sono mediamente proporzionate, con la caudale leggermente bilobata. La bocca, piuttosto piccola, è priva di barbigli, a differenza di quella presente nella carpa, specie a cui assomiglia nella forma generale del corpo. La linea laterale è praticamente dritta e conta mediamente 30 squame.

La colorazione degli avannotti, che al momento della schiusa delle uova sono lunghi 4 millimetri, nonché degli esemplari molto giovani, è sempre bruno-olivastra, ma sono possibili anche casi di albinismo. La livrea rosso-arancio è tipica degli esemplari di allevamento (Fig. 3.3), mentre quella bruno-grigiastra è tipica degli esemplari selvatici (Fig. 3.4). La variazione alla livrea rosso-arancio avviene dal terzo all'ottavo mese di vita salvo per esemplari albini che rimarranno chiari per sempre. Il principale fattore ambientale che regola la mutazione del colore è la temperatura dell'acqua: esemplari allevati a temperature inferiori ai 18°C, infatti, tenderanno a rimanere per sempre di livrea bruno-olivastra; gli esemplari allevati in vasche la cui temperatura superi i 20°C, muteranno nel caratteristico colore rosso-arancione. Il dimorfismo sessuale non è accentuato, ma le femmine appaiono solitamente più gonfie se viste dall'alto. Durante il periodo riproduttivo il maschio sviluppa dei piccoli pallini bianchi (tubercoli) sugli opercoli e sulla testa (Fuller et al., 1999).



Fig. 3.3 Esempolari di allevamento di *Carassius auratus*



Fig. 3.4 Esempolare selvatico di *Carassius auratus*

3.2.3. Habitat e biologia

Il pesce rosso in natura vive in fiumi, laghi, stagni e specchi d'acqua calma, fino ad una profondità massima di 20 metri, preferendo le aree ricche di vegetazione acquatica.

Il pesce rosso è tollerante ad ampi range di torbidità, di temperatura, di ossigeno disciolto, di pH e di salinità; gli avannotti risultano più sensibili alla salinità rispetto agli adulti. È onnivoro, la sua dieta comprende crostacei

planctonici, fitoplancton, larve di insetti, uova di pesce ed avannotti anche della sua stessa specie (Penttinen & Holopainen, 1992).

I pesci rossi e le altre carpe vengono messi spesso in acque stagnanti per ridurre la popolazione di zanzare. Va detto però che la loro introduzione ha spesso conseguenze negative sull'equilibrio dell'ecosistema locale (Holopainen & Hyvärinen, 1984).

3.2.4. Riproduzione e sviluppo

Carassius auratus è una specie molto prolifica. La riproduzione ha luogo principalmente in primavera-estate, quando la temperatura dell'acqua inizia a superare stabilmente i 16°C (condizione indispensabile). Le femmine, generalmente più numerose dei maschi, si radunano in grossi bacini non molto profondi e successivamente sono raggiunte dai maschi (Muus & Dahlstrom, 1978; Penttinen, & Holopainen, 1992). La tecnica di corteggiamento è piuttosto lunga; durante questa fase, il maschio, una volta scelta la partner, comincia a solleticarle l'addome mediante speciali piccole protuberanze che prendono il nome di tubercoli nuziali; il corteggiamento può durare da poche ore a circa tre giorni, alla fine dei quali la femmina depone le uova (fino a trentamila per ogni chilogrammo di peso del suo corpo) tra la vegetazione. La fecondazione è esterna: le uova vengono fecondate dallo sperma maschile che può vivere solamente trenta secondi nell'acqua. Le uova si schiudono dopo circa 5-7 giorni, e gli avannotti si nutrono per i successivi 9 giorni del sacco vitellino. Grazie alla grande prolificità, i pesci rossi introdotti in habitat favorevoli al loro sviluppo, tendono a diventare infestanti danneggiando l'equilibrio autoctono (Lever, 1996).

Capitolo 4

Materiali e metodi

4.1. Provenienza delle specie studiate e mantenimento in laboratorio

Gli esemplari di *Thalassoma pavo* utilizzati per lo studio (lunghezza 6.5 - 8 cm e peso 6 - 8 g) sono stati prelevati in natura in località San Lucido, in provincia di Cosenza.

La qualità dell'acqua del sito di prelievo è stata più volte testata mediante analisi chimico-fisiche (Tab. 4.1) e non è stata rilevata la presenza di inquinanti. La cattura è stata effettuata in diversi periodi dell'anno mediante retini a maglie strette ed utilizzando un'esca attrattiva. Gli animali catturati, tutti di dimensioni simili e allo stadio adulto, sono stati posti in vasche per il trasporto munite di ossigenatori e mantenuti ad una temperatura costante. In laboratorio, gli animali sono stati trasferiti in acquari da 100 litri precedentemente allestiti con acqua proveniente dal sito di prelievo, muniti di sistema filtraggio e aeratori, per la fase di acclimatazione della durata di 5 giorni. Gli animali sono stati alimentati quotidianamente con cozze sminuzzate *ad libitum*.

Gli esemplari di *Carassius auratus* (lunghezza 10 - 12 cm e peso 26 - 30 g), invece, sono stati acquistati presso un negozio specializzato (COF SAS, Bologna, Italia). In laboratorio, per la durata della fase di acclimatazione (5 giorni), gli animali sono stati mantenuti in acquari da 120 litri allestiti con acqua di rubinetto precedentemente dechlorinata e muniti di sistema filtraggio e aeratori; i parametri sono stati misurati quotidianamente (Tab. 4.2). Gli animali sono stati alimentati quotidianamente con cibo commerciale in fiocchi per pesci *ad libitum*.

<i>Parametro</i>	<i>Valore</i>
pH	7.84
Conducibilità	80.01 ms/cm
Salinità	36/37‰
Temperatura	18-23°C
Ossigeno disciolto	6.97 mg O ₂ /L
Durezza	32.8°F
Tensione superficiale	66.2 din/cm
Inquinanti rinvenuti	Nessuno
Microrganismi patogeni	Assenti

Tab. 4.1 Caratteristiche chimico fisiche delle acque prelevate nel sito di cattura di *Thalassoma pavo*

<i>Parametro</i>	<i>Valore</i>
pH	7.50
Conducibilità	80.01 ms/cm
Temperatura	18-23°C
Ossigeno disciolto	8 mg O ₂ /L
Durezza	34°F
Conduttività	300 µS/cm
Inquinanti rinvenuti	Nessuno
Microrganismi patogeni	Assenti

Tab. 4.2 Caratteristiche chimico fisiche delle acque di mantenimento di *Carassius auratus*

Per entrambe le specie, al fine di garantire una giusta procedura di acclimatazione, secondo quanto suggerito da Sprague (1969), gli acquari sono stati muniti di sistemi di filtraggio ed aerazione. Per evitare l'insorgere di eventuali squilibri o alterazioni dovuti a fluttuazioni dei parametri chimico-fisici dell'acqua, i gas disciolti, la salinità, i sali nutritivi, il fotoperiodo (naturale) e la temperatura sono stati mantenuti costanti per tutta la durata degli esperimenti.

Dopo un periodo di acclimatazione della durata di 5 giorni si è dato inizio alle fasi sperimentali.

4.2. Piombo: esperimenti su *Thalassoma pavo*

Al fine di valutare gli effetti morfo-funzionali di una esposizione a breve termine (192 ore) sull'apparato branchiale di *Thalassoma pavo* abbiamo testato 3 concentrazioni sub-letali di nitrato di piombo, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma-Aldrich Chemical Co., UK). Il piombo è stato disciolto in 1 L d'acqua (dal sito di prelievo) per la preparazione di una soluzione stock a maggiore concentrazione utilizzata per ottenere successivamente le tre concentrazioni nominali di metallo. L'acqua di trattamento utilizzata durante gli esperimenti è stata prelevata dal sito di cattura degli esemplari di *Thalassoma pavo*. Gli esperimenti sono stati effettuati in acquari da 80 L, privi di sistema di filtraggio e aerazione, esponendo 8 individui, di dimensioni comparabili, per ciascuna concentrazione (Tab. 4.3), più il gruppo di controllo; per ogni concentrazione *plus* il gruppo di controllo sono state eseguite tre repliche. È stato usato il sistema di esposizione semi-statico (ASTM, 2002), ovvero con rinnovo periodico (48 ore) dell'intero volume di acqua di trattamento; gli animali non sono stati alimentati durante l'intero periodo di esposizione.

Concentrazione di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	Tempi
800 $\mu\text{g}/\text{L}$	48h, 96h e 192h
2000 $\mu\text{g}/\text{L}$	48h, 96h e 192h
1200 $\mu\text{g}/\text{L}$	48h, 96h e 192h

Tab. 4.3 Concentrazioni sub-letali di piombo testate e relativi tempi di esposizione

Il prelievo delle branchie è stato effettuato dopo 48, 96 e 192 ore di trattamento e parallelamente sono state prelevate le branchie degli animali di controllo per l'indispensabile confronto tra condizioni basali e condizioni sperimentali. I campioni di tessuto sono stati successivamente processati per l'osservazione al microscopio ottico (MO), al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) e al microscopio confocale.

4.3. Chlorpyrifos: esperimenti su *Thalassoma pavo*

Al fine di valutare gli effetti morfo-funzionali di una esposizione a breve termine (96 ore) sull'apparato branchiale di *Thalassoma pavo* abbiamo testato 2 concentrazioni sub-letali di chlorpyrifos (Sigma-Aldrich Chemical Co., UK). Il pesticida è stato disciolto in 2 L d'acqua (dal sito di prelievo) per la preparazione di una soluzione stock a maggiore concentrazione utilizzata per ottenere successivamente le due concentrazioni nominali di chlorpyrifos. L'acqua di trattamento utilizzata durante gli esperimenti è stata prelevata dal sito di cattura degli esemplari di *Thalassoma pavo*. Gli esperimenti sono stati effettuati in acquari da 80 L, privi di sistema di filtraggio e aerazione, esponendo 8 individui, di dimensioni comparabili, per ciascuna concentrazione (Tab. 4.4), più il gruppo di controllo; per ogni concentrazione *plus* il gruppo, di controllo sono state eseguite tre repliche. È stato usato il sistema di esposizione statico (senza alcun rinnovo dell'acqua di trattamento nell'arco delle 96 ore) e gli animali non sono stati alimentati durante il periodo di esposizione (ASTM, 2002).

Concentrazione di CPF	Tempi
3.5 µg/L	48h e 96h
7 µg/L	48h e 96h

Tab. 4.4 Concentrazioni sub-letali di chlorpyrifos e relativi tempi di esposizione

Il prelievo delle branchie è stato effettuato dopo 48 e 96 ore di trattamento e parallelamente sono state prelevate le branchie da animali di controllo. I campioni di tessuto sono stati successivamente processati per l'osservazione al MO, al TEM e al microscopio confocale.

4.4. Chlorpyrifos: esperimenti su *Carassius auratus*

Al fine di valutare gli effetti diretti e quelli a lungo termine causati dall'esposizione a chlorpyrifos sull'apparato branchiale di *Carassius auratus*, il set-up sperimentale ha previsto due fasi: una singola esposizione acuta (96 ore) seguita da un periodo di recupero della durata di sette giorni in acqua priva di inquinante. Il pesticida è stato disciolto in 2 L d'acqua di rubinetto dechlorinata per la

preparazione di una soluzione stock a maggiore concentrazione utilizzata per ottenere successivamente le tre concentrazioni nominali di chlorpyrifos utilizzate (Tab. 4.5). Gli esperimenti sono stati effettuati in acquari da 80 L, privi di sistema di filtraggio e aerazione, esponendo 8 individui, di dimensioni comparabili, per ciascuna concentrazione, più il gruppo di controllo; per ogni concentrazione *plus* il gruppo di controllo sono state eseguite tre repliche. Durante il periodo di trattamento È stato usato il sistema di esposizione semi-statico (ASTM, 2002); ovvero con rinnovo parziale pari a metà del volume di acqua ogni 48 ore; durante il periodo di recupero è stato effettuato un rinnovo parziale pari a metà del volume di acqua ogni 48 ore. Gli animali non sono stati alimentati durante il periodo di esposizione al pesticida, mentre durante il periodo di recupero sono stati alimentati a giorni alterni con cibo commerciale in fiocchi.

Concentrazione di CPF	Tempi
1 µg/L	96h di esposizione + 7 gg di recupero
4 µg/L	96h di esposizione + 7 gg di recupero
8 µg/L	96h di esposizione + 7 gg di recupero

Tab. 4.5 Concentrazioni sub-letali di chlorpyrifos e relativi tempi di esposizione e di recupero

Le branchie sono state prelevate dopo 96 ore di esposizione al chlorpyrifos e dopo 7 giorni di recupero in acqua priva di pesticida; parallelamente sono state prelevate le branchie da animali di controllo. I campioni di tessuto sono stati successivamente processati per l'osservazione al MO, al TEM e al microscopio confocale.

Parte delle branchie prelevate da 7 esemplari per ogni gruppo sperimentale è stato impiegato per misurare la lipoperossidazione del tessuto, tramite LIPOTISS test.

4.5. Allestimento dei preparati per MO e TEM

Tratteremo di seguito le metodiche utilizzate unitamente per tutti gli esperimenti compiuti sulle due specie in esame dal momento che, salvo eccezioni

diversamente indicate, l'allestimento dei preparati ed i protocolli impiegati sono stati i medesimi.

Per le operazioni relative all'allestimento dei preparati per MO e TEM sono state eseguite le metodiche standard riportate in letteratura (Scala et al., 1995), adeguatamente corrette secondo le nostre esigenze. Le fasi di disidratazione e infiltrazione sono state realizzate mediante l'ausilio del processore automatico di tessuti modello Leica EM TP.

4.5.1. Prelievo

Gli animali precedentemente anestetizzati con MS 222 (tricaine methanesulphonate) (Sigma-Aldrich Chemical Co., UK) sono stati sacrificati per decapitazione. Sono stati utilizzati forbici e bisturi perfettamente puliti ed i campioni sono stati costantemente perfusi con soluzione di lavaggio o fissativo. Dopo il prelievo, i campioni sono stati lavati con la soluzione di lavaggio (isotonica ed allo stesso pH dell'ambiente cellulare) per allontanare eventuali contaminanti, frammenti extracellulari, sostanze proteiche e polisaccaridi presenti sulla superficie del campione. Le fasi di prelievo, riduzione e lavaggio sono state effettuate nel minor tempo possibile per evitare modificazioni a carico della struttura cellulare. Le dimensioni finali dei campioni sono state, come di norma, quelle compatibili con una buona penetrazione degli agenti chimici (circa 1 mm³).

4.5.2. Fissazione

La fase di fissazione del campione rappresenta la prima fase di modificazione artificiale dell'ambiente cellulare: permette che le strutture cellulari non vadano incontro a processi degenerativi, arresta le attività metaboliche della cellula ed immobilizza tutti i componenti molecolari e macromolecolari. I campioni sono stati sottoposti ad una fissazione primaria aldeidica seguita da una post-fissazione in tetrossido di osmio. Nel nostro protocollo la prima fissazione è stata eseguita utilizzando la glutaraldeide al 4%, veicolata da un tampone fosfato (fosfato monobasico e bibasico di sodio, 0.1 M, pH 7.2) che ha il vantaggio di mantenere il pH cellulare costante durante l'intero periodo di fissazione. La glutaraldeide garantisce una stabilizzazione sufficientemente rapida da evitare un'estrazione delle componenti cellulari da parte del veicolo. Per la post-fissazione è stato utilizzato il tetrossido di osmio all'2%, veicolato sempre da un tampone fosfato. Come soluzione di lavaggio (tra le due fissazioni e al termine della seconda fissazione) è

stato ugualmente utilizzato il tampone fosfato in quanto ha il vantaggio di avere una composizione chimica simile a quella dei fluidi extracellulari.

SCHEMA DI FISSAZIONE	
Pre-fissazione	2-3 h in glutaraldeide al 4% in tampone fosfato 0.1 M (pH 7.2) a 4°C
Lavaggio	3-4 passaggi da 30' in tampone fosfato 0.15 M
Post-fissazione	2 h in OsO ₄ al 2% in tampone fosfato 0.1 M (pH 7.2) a 4°C
Lavaggio	3-4 passaggi da 10' in tampone fosfato 0.15 M (pH 7.2)

Tab. 4.6 Schema di fissazione MO e TEM

4.5.3. *Disidratazione*

Nella fase di disidratazione vengono rimossi tutti i liquidi presenti nel tessuto. Gli agenti disidratanti sono solventi organici ad elevata forza e, per questa ragione, è inevitabile un certo grado di coartazione ed estrazione dei costituenti cellulari. Al fine di evitare l'estrazione di componenti cellulari, la disidratazione deve essere effettuata in modo graduale e nel minor tempo possibile in relazione al tipo di tessuto ed alle sue dimensioni. L'agente disidratante è stato l'etanolo

SCHEMA DI DISIDRATAZIONE	
Etanolo al 30%	1 passaggio da 10'
Etanolo al 50%	1 passaggio da 10'
Etanolo al 70%	1 passaggio da 10'
Etanolo al 90%	1 passaggio da 10'
Etanolo al 100%	2 passaggi da 10'

Tab. 4.7 Schema di disidratazione MO e TEM

4.5.4. *Infiltrazione o inclusione*

Nel caso della microscopia elettronica a trasmissione, i liquidi devono essere sostituiti con un solvente organico compatibile con la resina utilizzata nella fase di inclusione. Dopo aver concluso la disidratazione del campione, infatti, si sostituisce

l'alcool con l'ossido di propilene. A sua volta tale sostanza deve essere sostituita dal mezzo di inclusione che consiste in monomeri di resine sintetiche, di ridotte dimensioni, capaci di impregnare completamente il tessuto. Nel nostro studio è stata utilizzata una resina epossidica, ottenuta dalla miscela di Epon 812 e Araldite (in presenza di agenti acceleratori e induttori), che viene fatta polimerizzare ottenendo il blocchetto di inclusione. Le operazioni di inclusione sono state eseguite tramite l'utilizzo del processatore, mentre la polimerizzazione è stata condotta in stufa a 60°C per due giorni.

SCHEMA DI INCLUSIONE	
Ossido di propilene	2 passaggi da 15'
Misto ossido di propilene-resina (1:1)	2h
Resina	1 passaggio da 6-12h
	1 passaggio da 3h
Inclusione	24-48h a 60°C

Tab. 4.8 Schema di inclusione MO e TEM

4.5.5. *Sezionamento e colorazione*

I campioni inclusi in resina sono stati sezionati utilizzando l'ultramicrotomo modello Leica Ultracut UCT. Lo spessore delle sezioni semifini destinate alla microscopia ottica è di 1500 - 2500 nm, mentre le sezioni ultrasottili per la microscopia elettronica a trasmissione hanno uno spessore di 60 - 90 nm. Prima di procedere con il sezionamento è stata effettuata l'operazione di "trimming", che consiste nella rimozione della resina superflua finché non si ottiene un blocco avente la forma di un tronco di piramide, con la faccia superiore a forma di trapezio/rettangolo orientato in modo che la superficie di taglio risulti parallela alla lama. Il blocco così ottenuto viene montato sul braccio dell'ultramicrotomo che oscillando determina il taglio delle sezioni.

- **Trattamento delle sezioni semifini**

Le sezioni semifini ottenute sono state colorate utilizzando il blu di toluidina (toluidina 1% in borato 2%), oppure la colorazione tricromica secondo Humphrey e Pittman (blu di metilene, azzurro II, fucsina basica) (1974). Le sezioni semifini sono state quindi osservate al microscopio ottico Leica DM E,

acquisite mediante la macchina fotografica Leica ICC50 HD e del software LAS EZ (Leica Application Suite Versione 3.0.0).

- **Trattamento delle sezioni ultrasottili**

Le sezioni ultrasottili, adagiate sulle apposite griglie (o retini) vengono sottoposte a contrastazione. In questa fase le sezioni vengono trattate con metalli pesanti in grado di fissarsi selettivamente alle differenti strutture sub-cellulari, con conseguente aumento dello scattering con il fascio elettronico del microscopio elettronico. Le sezioni ultrasottili subiscono quindi un doppio trattamento con acetato di uranile e citrato di piombo in soluzione al 2%. I sali di uranio si fissano in particolare agli acidi nucleici, evidenziando la cromatina nucleare ed i ribosomi mentre i sali di piombo potenziano l'azione dell'osmio e dell'uranio delineando l'ultrastruttura cellulare. Nel nostro caso sono stati utilizzati retini rivestiti di un film di carbonio che aumenta la stabilità meccanica e termica delle sezioni. I retini sono stati osservati al microscopio elettronico a trasmissione Zeiss EM 900.

4.6. Allestimento dei preparati per immunistoichimica

L'analisi morfologica ed ultrastrutturale è stata integrata con uno studio funzionale volto a testare le alterazioni indotte dal piombo e dal chlorpyrifos sul pattern di immunomarcatura di alcuni anticorpi.

I campioni prelevati secondo le metodiche già descritte sono stati processati secondo un protocollo adatto a preservare al massimo l'integrità dei siti antigenici.

4.6.1. Fissazione

Il fissativo utilizzato è il liquido di Bouin. Questo è un ottimo fissativo in quanto coarta poco i tessuti ed ha un potere penetrante abbastanza elevato che permette di fissare agevolmente grossi frammenti. La presenza di acido picrico impone il lavaggio in alcool per togliere il colore giallo che dà quest'acido, ma che permette l'individuazione dell'organo nel blocchetto di paraffina consentendo un miglior orientamento del campione durante la fase di taglio

FISSATIVO DI BOUIN	
Acido picrico	15 ml
Formalina tamponata	5 ml
Acido acetico glaciale	1 ml

Tab. 4.9 Composizione del fissativo di Bouin

4.6.2. Disidratazione

I primi passaggi servono ad eliminare l'eccesso di acido picrico, si procede, poi, all'allontanamento dei liquidi mediante alcool a concentrazione crescente.

SCHEMA DI DISIDRATAZIONE	
Etanolo al 50%	4-5 passaggi da 5'
	1 passaggio da 1h
Etanolo al 70%	1 passaggio da 1h
Etanolo al 80%	1 passaggio da 1h
Etanolo al 90%	1 passaggio da 1h
Etanolo al 95%	1 passaggio da 12h
Etanolo al 100%	3 passaggio da 30-60'

Tab. 4.10 Schema di disidratazione per microscopia confocale

4.6.3. Infiltrazione o inclusione

La fase di infiltrazione prevede l'utilizzo dello xilolo, il solvente organico della paraffina. Durante questo passaggio, conosciuto come chiarificazione, il solvente viene gradualmente sostituito all'etanolo. L'infiltrazione prosegue poi, con una serie di passaggi graduali dallo xilolo alla paraffina e termina con l'inclusione dei campioni in blocchetti destinati al taglio. La paraffina è una miscela di idrocarburi con una densità molto vicina a quella dei tessuti biologici, presente in forma solida a temperatura ambiente e in forma liquida ad una temperatura di 56°C. Le branchie, orientate ad occhio nudo, sono state incluse in appositi contenitori riempiti di paraffina fusa, lasciata poi a solidificare a temperatura ambiente.

SCHEMA DI INFILTRAZIONE	
Miscela etanolo-xilolo (1:1)	1 passaggio da 15'
Xilolo	2 passaggi da 20'
Miscela xilolo-paraffina (1:1)	1 passaggio da 30' in stufa 56°C
Paraffina	3-4 passaggi da 1h in stufa 56°C
Inclusione in paraffina	Preparazione del blocchetto

Tab. 4.11 Schema di infiltrazione per microscopia confocale

4.6.4. Sezionamento

I campioni inclusi in blocchetti di paraffina vengono tagliati mediante il microtomo. Prima del sezionamento è stata effettuata l'operazione di "trimming". Il blocchetto fissato al supporto, è stato montato sul braccio del microtomo Leica modello RM2125RT, orientato in modo che la superficie di taglio risulti parallela alla lama.

Le sezioni dello spessore di 8-10 μm vengono poi raccolte e trasferite su un vetrino portaoggetti su cui è stata posta una goccia d'acqua distillata precedentemente riscaldata. A questo punto il vetrino viene poggiato su una piastra riscaldata a 20°C per permettere la distensione delle sezioni e l'adesione delle stesse al vetrino.

4.6.5. Sparaffinatura

Prima di essere osservati i vetrini devono essere sottoposti al processo di "sparaffinatura" ossia all'eliminazione della paraffina dal campione, avvenuta secondo lo schema seguente:

SCHEMA DI SPARAFFINATURA	
Xilolo	1 passaggio da 5'
Etanolo 100%	2 passaggi da 2'
Etanolo 95%	1 passaggio 2'
Acqua distillata	1 passaggio 2'

Tab. 4.12 Schema di sparaffinatura delle sezioni

4.7. Tecniche di immunomarcatura

Per le indagini funzionali abbiamo applicato la metodica dell'immunomarcatura indiretta secondo Coons (1955) (Fig.4.1).

Questa metodica prevede l'utilizzo di un anticorpo primario che si lega all'antigene in esame, ed un anticorpo secondario coniugato con il fluorocromo, FITC o TRITC, che si lega a quello primario.

Questa metodica è stata applicata per l'immunolocalizzazione della Na^+/K^+ -ATPasi, dell'Acquaporina 3, delle Metallothioneine e dell'iNOS. Le osservazioni sono state effettuate al microscopio confocale a scansione laser modello Leica TCS SP II.

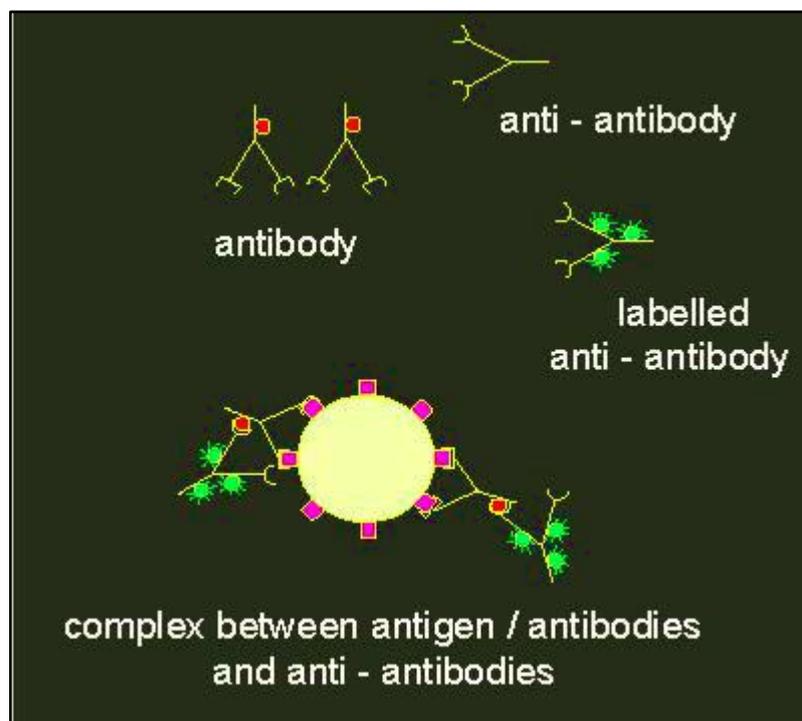


Fig. 4.1 Rappresentazione schematica della tecnica di immunomarcatura indiretta

Per gli studi sulla funzionalità branchiale le sezioni sono state sparaffinate e processate applicando tecniche di immunofluorescenza. Gli anticorpi primari e secondari utilizzati sono riportati in tabella:

Anticorpo primario	Specie host	Diluizione	Casa produttrice	Anticorpo secondario
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasi	Mouse	1:100	Sigma-Aldrich Chemical Co., UK	FITC Anti-Mouse in Goat
AQP-3	Rabbit	1:100	Sigma-Aldrich Chemical Co., UK	FITC Anti-Rabbit in Sheep
MT	Mouse	1:100	Sigma-Aldrich Chemical Co., UK	FITC Anti-Mouse in Goat
iNOS	Mouse	1:80	Santa Cruz Inc., USA	FITC Anti-Mouse in Goat

Tab. 4.13 Anticorpi testati

4.7.1. Na⁺/K⁺-ATPasi

La Na⁺/K⁺-ATPasi conosciuta anche come pompa Na⁺/K⁺, è un enzima localizzato nella membrana plasmatica. Esso provvede a mantenere il potenziale e a regolare il volume cellulare. Per mantenere il potenziale a cavallo della membrana, le cellule devono mantenere una bassa concentrazione di ioni sodio ed un alto livello di ioni potassio a livello intracellulare. A livello extracellulare, ci sono alte concentrazioni di sodio e basse concentrazioni di potassio, la diffusione di questi ioni avviene quindi attraverso canali ionici presenti all'interno della membrana plasmatica. Per mantenere le appropriate concentrazioni la pompa sodio/potassio pompa sodio fuori e potassio dentro con un trasporto attivo.

Il meccanismo con cui opera questo enzima è il seguente:

- La pompa ATP dipendente, lega 3 ioni sodio a livello intracellulare.
- L'ATP è idrolizzata, e la fosforilazione della pompa porta alla formazione di residui di aspartato seguiti da rilascio di ADP. Un cambio conformazionale nella pompa espelle ioni sodio all'esterno. La forma fosforilata della pompa ha una bassa affinità per gli ioni sodio, che così vengono rilasciati.
- La pompa lega 2 ioni potassio extracellulare, questo comporta la defosforilazione della pompa.

- La pompa rilascia ioni potassio dentro la cellula, così essa è pronta per iniziare.

La membrana plasmatica è meno permeabile al sodio che agli ioni potassio, si viene così a creare un potenziale elettrico a livello intracellulare. Il gradiente elettrico e di concentrazione stabilito dalla Na^+/K^+ -ATPasi supporta non solo il potenziale delle cellule a riposo, ma il potenziale d'azione dei nervi e dei muscoli (Lehninger, 2005).

L'uscita di sodio dalle cellule provvede a veicolare i diversi trasporti facilitati, che importano glucosio, aminoacidi e altri nutrienti dentro la cellula. La traslocazione di sodio da un lato dell'epitelio all'altro crea un gradiente osmotico che guida l'assorbimento dell'acqua. Un altro importante compito della pompa Na^+/K^+ -ATPasi è di provvedere al gradiente sodio che è usato nei processi carrier. Nell'intestino, per esempio, il sodio è espulso fuori dalla cellula dalla pompa sodio potassio a livello del sangue, dove il simporto sodio-glucosio usa il gradiente sodio creato come fonte di energia per importare sia sodio che glucosio, che è più efficiente di una diffusione semplice. Processi simili sono localizzati nel sistema tubulare renale (Eckert & Randall, 1991)

Nelle branchie dei pesci la pompa Na^+/K^+ -ATPasi è localizzata nelle cellule a cloruro (Perry, 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Brunelli et al., 2008). Queste cellule localizzate a livello dell'epitelio primario giocano un ruolo importante nell'equilibrio ionico ed osmotico (Evans, 1987).

4.7.2. *Acquaporina 3*

Le acquaporine rappresentano una famiglia ubiquitaria di proteine integrali di membrana caratterizzate da similarità di sequenza. Esse formano dei pori transmembrana attraverso i quali l'acqua riesce ad attraversare in modo efficiente il doppio strato delle membrane biologiche (Agre et al., 2002; King et al., 2004).

Strutturalmente le acquaporine sono formate da quattro monomeri, che possono essere uguali fra loro (omotetrameri) o diversi (eterotetrameri). Tutti e quattro i monomeri sono in grado di trasportare acqua, ogni proteina possiede, quindi, quattro canali (Lehninger, 2005).

Tra le varie isoforme di acquaporina le AQP 1, 2, 4 e 5 sono considerate selettive per l'acqua (Agre et al., 1993; Hasegawa et al., 1994; Raina et al., 1995; Yang & Verkman, 1997) mentre le acquaporine 3, 7, 9, e 10 sono anche permeabili

al glicerolo ed altri piccoli soluti e spesso vengono chiamate acquagliceroloproteine. (Ishibashi et al., 1994, 1997, 1998, 2002; Echevarria et al., 1996). L' AQP6 nel fegato sembra essere invece un canale anionico (Yasui et al., 1999a,b). L'isoforma più diffusa è l'AQP3. Nei pesci è espressa in branchie, intestino, esofago e occhi. Nell'epitelio branchiale dei pesci è localizzata a livello delle chloride cells e sembra sia coinvolta nella regolazione del volume e nella osmoregolazione (Watanabe et al., 2005).

4.7.3. *Metallotioneine*

Le metallotioneine (MTs) sono delle proteine a basso peso molecolare ricche in cisterna caratterizzate da un'elevata capacità di legare metalli. Le MTs funzionano come una sorta di "tampone cellulare" dei metalli, e la loro abbondanza nella cellula dipende dal contenuto di metalli nell'organismo e nella cellula stessa: se la concentrazione intracellulare di metallo è alta, viene indotta la sintesi di nuove molecole di metallotioneine; se il contenuto di metallo diminuisce, la sintesi di metallotioneine viene rallentata. Gli organismi viventi possono sfruttare questo meccanismo di sintesi regolata per diminuire gli effetti dannosi dei metalli tossici come cadmio e mercurio (Dang et al., 1999; Wu et al., 2006).

Nei pesci, l'espressione e il ruolo delle MT sono state evidenziate negli organi in cui si evidenzia maggiormente accumulo di metalli, ovvero branchie, fegato e reni (De Boeck et al., 2003, Fasulo et al., 2008; Brunelli et al., 2011).

4.7.4. *Ossido nitrico sintasi inducibile*

L'ossido di azoto (NO), chiamato anche ossido nitrico, è una specie chimica reattiva di natura radicalica centrata sull'azoto (Brennan & Moncada, 2002).

L'NO è un composto ubiquitario prodotto a partire dall'amminoacido L-arginina in una reazione multi-step catalizzata dall'enzima ossido nitrico sintasi (NOS) NADPH-dipendente. La NOS esiste in numerose isoforme, alcune costitutive (eNOS, nNOS) ed altre inducibili (iNOS.) (Förstermann et al., 1998).

Nei sistemi biologici, l'NO agisce come un importante messaggero intra- ed inter-cellulare regolando numerosissime funzioni, tra cui quella dell'endotelio vascolare. Infatti, in seguito ad adeguata stimolazione (meccanica o chimica), le cellule endoteliali producono l'NO che in parte, diffonde nel compartimento ematico, riducendo l'aggregabilità delle piastrine e l'adesività dei leucociti alle pareti dei vasi sanguigni e in parte raggiunge la sottostante muscolatura liscia

vascolare inducendone il rilasciamento (Brennan & Moncada, 2002). Schoor & Plumb (1994) hanno scoperto che l'ossido nitrico nei pesci svolge un ruolo importante nell'osmoregolazione.

Di conseguenza esso viene sintetizzato in organi coinvolti in questo processo quali branchie e reni. L'ossido nitrico interviene anche nella regolazione del tono vascolare (Gibbins et al., 1995). Da studi condotti da Ebbesson e collaboratori (2005) è emerso che l'isoforma nNOS ed eNOS sono espresse nelle chloride cells, lungo il filamento primario e negli spazi interlamellari. La produzione dell'iNOS viene indotta nei meccanismi di difesa innescati dalla presenza di patogeni, tumori e xenobionti (Liew et al., 1990; Xiang & Rice, 2000). L'ossido nitrico nei pesci agisce da vasodilatatore (Fritsche et al., 2000; Haraldsen et al., 2002).

4.8. Dosaggio dei lipoperossidi nei tessuti

Per misurare il contenuto di lipoperossidi nei tessuti branchiali è stato utilizzato lo spettrofotometro Free Carpe diem/DIACRON international, mediante l'uso di monotest pronti all'uso.

Il metodo si basa sulla capacità dei perossidi di favorire l'ossidazione del Fe^{2+} a Fe^{3+} . Il Fe^{3+} prodotto si lega al tiocianato sviluppando un complesso colorato misurabile fotometricamente. L'aumento di assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione dei perossidi presenti nel campione. Nel test si utilizzano i seguenti reagenti: R1, una miscela di indicatori disciolti in alcol; R2, ferro ridotto; lo standard, terbutilidroperossido (4mEq/L). La lettura spettrofotometrica consente di calcolare il numero di nano equivalenti di idroperossidi/grammo di tessuto.

È stato eseguito il seguente protocollo:

SCHEMA LIPOTISS	
Omogeneizzazione tessuto	
Eliminazione sovrnatante	
Aggiunta reagente R1	2 ml
Vortex	1 passaggio da 5'
Centrifuga	1400g per 5'
Prelievo di 1 ml di sovrnatante	
Incubazione	37°C per 5'
Lettura spettrofotometrica a 505 nm	

Tab.4.14 Protocollo Lipotiss

I dosaggi spettrofotometrici sono stati eseguiti secondo il seguente schema:

	Bianco	Standard	Campione
Estratto	/	/	1 ml
R1	1 ml	1 ml	/
Standard	/	10 μ L	/
R2	10 μ L	10 μ L	10 μ L

Tab.4.15 Schema letture spettrofotometriche

4.8.1. *Analisi statistica*

Per l'analisi dei dati ottenuti dal Lipotiss test ci si è avvalsi di test statistici, tramite l'utilizzo del software Graph-Pad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), con un livello di significatività per $p < 0.05$.

La normalità dei dati è stata testata utilizzando il Kolmogorov-Smirnov normality test mentre per la valutazione dell'omogeneità delle varianze è stato applicato Bartlett test. L'analisi delle varianze (one-way ANOVA seguita dal Bonferroni post hoc test) è stata applicata per valutare le differenze tra i gruppi sperimentali.

Capitolo 5

Risultati

5.1. Apparato branchiale degli esemplari di controllo di *Thalassoma pavo*

L'apparato branchiale di *Thalassoma pavo* mostra l'organizzazione strutturale tipica dei Teleostei; le branchie sono poste ai lati del capo e sono protette da un opercolo. Ciascuna branchia è costituita da 4 archi branchiali da cui si dipartono i filamenti principali che danno inserzione alle numerose lamelle secondarie deputate agli scambi gassosi (Tav. 1, figg. A-B) (Evans et al., 2005; Brunelli et al., 2011). L'epitelio che ricopre il filamento principale viene definito epitelio primario ed è costituito da cinque tipologie cellulari: cellule pavimentose (PVC), cellule mucose o goblet cells (GC), chloride cells (CC) associate a cellule accessorie (AC) e cellule basali (BC) (Tav. 1, figg. C-D). Le cellule pavimentose rappresentano la tipologia cellulare più comune nell'epitelio del filamento; dalle immagini al TEM è possibile notare che la superficie di queste cellule è dotata di un complesso sistema di microcreste superficiali. Tra le cellule pavimentose del filamento possiamo identificare le meno frequenti goblet e chloride cells, le prime sono caratterizzate da un citoplasma ricco di granuli di secrezione (Tav. 1, fig. C), le seconde occupano quasi tutto lo spessore del filamento e presentano un gran numero di mitocondri all'interno del citoplasma e (Tav. 1, fig. D). La componente cellulare lamellare ha un'organizzazione molto semplice: uno strato esterno di cellule pavimentose che poggia su uno strato più interno di cellule basali (Tav. 1, fig. E). Anche le cellule pavimentose delle lamelle sono dotate di microcreste superficiali, e risultano legate tra loro da giunzioni strette e desmosomi; le cellule basali, invece, si collocano internamente all'epitelio lamellare e prendono contatto con la lamina basale, sono cellule poco differenziate, il cui rapporto nucleo/citoplasma molto elevato.

5.2. Struttura ed ultrastruttura delle branchie di *Thalassoma pavo* dopo esposizione a piombo - $Pb(NO_3)_2$

5.2.1. Esposizione a 800 $\mu g/L$ di $Pb(NO_3)_2$

Dopo 48 ore di esposizione alla concentrazione di 800 $\mu g/L$ di nitrato di piombo, l'osservazione al microscopio ottico rivela che l'organizzazione morfologica della branchia è in gran parte mantenuta; tuttavia, è possibile osservare una anomala curvatura in particolar modo a livello dei filamenti principali.

A livello delle lamelle secondarie è stata inoltre riscontrata la presenza di aneurismi (Tav. 2, fig. A); non si osservano alterazioni a livello ultrastrutturale (Tav. 2, figg. B-D).

Dopo 96 ore di esposizione le alterazioni diventano maggiormente evidenti. I filamenti e le lamelle appaiono assottigliati ed il numero e la dimensione degli aneurismi aumentano (Tav. 3, fig. A); in alcune regioni inoltre il tessuto appare iperplastico in particolar modo a livello delle lamelle (Tav. 3, fig. B).

Dopo 192 ore, le alterazioni diventano più marcate; in particolare, l'osservazione delle sezioni istologiche evidenzia la presenza di aneurismi, talvolta di notevoli dimensioni (Tav. 3, fig. C); è evidente inoltre l'instaurarsi di un fenomeno di distacco del tessuto epiteliale dalla porzione connettivale sottostante; l'analisi ultrastrutturale rivela inoltre l'ipertrofia delle cellule pavimentose (Tav. 3, fig. D).

5.2.2. Esposizione a 2000 $\mu g/L$ di $Pb(NO_3)_2$

Per quanto riguarda le branchie degli individui esposti alla concentrazione di 2000 $\mu g/L$ di nitrato di piombo, le alterazioni sono già evidenti dopo 48 ore di esposizione. In microscopia ottica è possibile notare la presenza di aneurismi, i processi di iperplasia a livello delle lamelle secondarie ed il sollevamento dell'epitelio dal connettivo sottostante (Tav. 4, figg. A-B); le osservazioni ultrastrutturali rivelano la comparsa di fenomeni di degenerazione di cellule specializzate quali le chloride cells (Tav. 4, fig. C), nelle quali, in particolare, è possibile osservare la presenza di ampi spazi intercellulari. Al TEM a livello delle lamelle, oltre alla presenza di marcati processi degenerativi a carico delle componenti cellulari, è possibile notare l'ipertrofia delle cellule pavimentose che

originano una serie di lunghi processi e conferiscono all'intera struttura un aspetto irregolare (Tav. 4, fig. D).

Dopo 96 ore di trattamento ai danni descritti precedentemente si aggiunge la comparsa di diverse regioni iperplastiche che interessano le lamelle secondarie (Tav. 5, fig. A); inoltre, al MO è possibile notare che le chloride cells, risultano ipertrofiche e quindi maggiormente evidenti all'interno dell'epitelio primario (Tav. 5, fig. B).

Dopo 192 ore di esposizione è possibile osservare la comparsa di un fenomeno di assottigliamento dell'epitelio sia primario che secondario. Al MO si osserva che nei filamenti principali, le chloride cells presentano dimensioni maggiori rispetto alle altre cellule, mentre nelle lamelle secondarie gli aneurismi interessano le porzioni distali delle lamelle (Tav. 5, fig. C). A livello ultrastrutturale, sono rilevabili processi di degenerazione delle cellule basali che, in alcuni punti, risultano ormai assenti (Tav. 5, fig. D); anche le cellule epiteliali mostrano marcati fenomeni degenerativi (Tav. 5, fig. E).

5.2.3. Esposizione a 12000 µg/L di Pb(NO₃)₂

Alla più alta concentrazione testata i fenomeni degenerativi appaiono molto intensi. Già dopo 48 ore di trattamento, infatti, le sezioni istologiche mostrano una notevole riduzione del numero delle lamelle secondarie, che, in alcuni casi, appaiono ridotte in numero e fortemente iperplastiche (Tav. 6, fig. A); inoltre, la componente vascolare è seriamente compromessa (Tav. 6, fig. B). L'osservazione al TEM conferma i processi degenerativi delle tipologie cellulari che compongono le lamelle secondarie; sia nelle cellule basali che nelle pavimentose, infatti, possiamo osservare la presenza di ampi spazi intercellulari (Tav. 6, Figg. C-D).

In tutte le porzioni della branchia, i fenomeni degenerativi e le alterazioni finora descritti appaiono ancora più intensi e marcati, sia a livello strutturale che ultrastrutturale, dopo 96 ore (Tav. 7, figg. A-B) e 192 ore di esposizione (Tav. 7, figg. C-D).

5.3. Espressione di proteine target nelle branchie di *Thalassoma pavo* esposte a piombo

5.3.1. Na⁺/K⁺-ATPasi

L'osservazione in microscopia confocale del pattern di immunomarcatura della pompa Na^+/K^+ -ATPasi rivela che in condizioni basali tale proteina è espressa, nella porzione interlamellare del filamento principale, esclusivamente a livello delle chloride cells; la fluorescenza mette in evidenza l'ampio corpo cellulare di tale tipologia cellulare (Tav. 8, figg. A-B).

Dopo esposizione ad 800 $\mu\text{g}/\text{L}$ di nitrato di piombo, è ancora possibile notare un'espressione della proteina sempre a livello delle chloride cells comparabile a quanto osservato negli esemplari di controllo (Tav. 9, figg. A-B). Una lieve diminuzione del pattern di espressione della proteina è invece riscontrabile dopo 96 ore di esposizione al metallo considerato (Tav. 9, figg. C-D), che diventa ancora più pronunciata dopo 192 ore di esposizione; infatti, è possibile osservare che il segnale diminuisce ulteriormente rispetto agli esemplari di controllo (Tav. 9, figg. E-F).

Dopo 48 ore di esposizione a 2000 $\mu\text{g}/\text{L}$ di nitrato di piombo, l'espressione della Na^+/K^+ -ATPasi nelle branchie di *Thalassoma pavo* risulta diminuita rispetto a quanto si osserva negli esemplari di controllo (Tav. 10, figg. A-B); all'aumentare dei tempi di esposizione, ovvero dopo 96 e 192 ore, è possibile notare che la proteina mantiene livelli di espressioni più bassi rispetto al gruppo di controllo (Tav. 10, figg. C-F).

Dopo 48 ore di esposizione a 12000 $\mu\text{g}/\text{L}$ di nitrato di piombo, l'espressione della Na^+/K^+ -ATPasi appare ancora comparabile a quanto osservato nel gruppo di controllo (Tav. 11, figg. A-B). Al contrario, dopo 96 ore è possibile notare una marcata down regolazione della sua espressione; il segnale immunofluorescente a livello del filamento primario, infatti, è quasi assente (Tav. 11, figg. C-D). Dopo 192 ore di esposizione, invece, è possibile notare nuovamente una lieve espressione della Na^+/K^+ -ATPasi sempre a livello delle chloride cells (Tav. 11, figg. E-F).

5.3.2. *Acquaporina 3*

Nell'epitelio branchiale di *Thalassoma pavo*, l'AQP-3 è espressa nel filamento principale a livello delle chloride cells (Tav. 8, fig. C-D).

Dopo 48 di esposizione a 800 $\mu\text{g}/\text{L}$ di nitrato di piombo, il pattern di espressione della AQP-3 risulta invariato e comparabile a quanto osservato negli esemplari di controllo (Tav. 12, figg. A-B). Al contrario, dopo 96 ore è possibile notare una lieve decremento dell'espressione della proteina (Tav. 12, figg. C-D), che risulta ancora più marcato dopo 192 ore di trattamento (Tav. 12, figg. E-F),

Dopo 48 e 96 ore di esposizione a 2000 µg/L di nitrato di piombo, l'espressione dell'AQP-3 risulta diminuita rispetto al gruppo di controllo (Tav. 13, figg. A-D). Al contrario, dopo 192 ore di trattamento il segnale di immunomarcatura relativo alla proteina appare lievemente aumentato (Tav. 13, figg. E-F).

Dopo 48 ore di esposizione a 12000 µg/L a nitrato di piombo il pattern di espressione della proteina AQP-3 si mantiene paragonabile a quello osservato negli esemplari di controllo (Tav. 14, figg. A-B). Dopo 96 ore, invece, le regioni immunoreattive sono scarsissime: è possibile notare limitate regioni fluorescenti in corrispondenza delle cellule accessorie (Tav. 14, figg. C-D). Al termine delle 192 ore di trattamento, il segnale appare nuovamente a livello delle chloride cells (Tav. 14, figg. E-F).

5.3.3. *Metallotioneine*

Le osservazioni eseguite in microscopia confocale rivelano l'assenza dell'espressione delle MTs nelle branchie degli esemplari di controllo di *Thalassoma pavo* (Tav. 8, figg. E-F).

Già dopo 48 ore di esposizione a 800 µg/L di nitrato di piombo è possibile notare un incremento dell'immunoreattività relativa alle MTs soprattutto a livello delle regioni interlamellari (Tav. 15, figg. A-B). Dopo 96 ore, il pattern di espressione è rilevabile anche a livello delle lamelle secondarie (Tav. 15, figg. C-D). Al termine delle 192 ore di esposizione, l'espressione delle MT risulta ancora più intensa, ed il segnale è rilevabile in maniera marcata sia nell'epitelio primario che in quello secondario (Tav. 15, figg. E-F).

Le MTs mostrano una marcata e uniforme espressione che interessa tutto il tessuto branchiale di *Thalassoma pavo*, in tutti i tempi di esposizione dopo trattamento con 2000 µg/L di nitrato di piombo (Tav. 16, figg. A-F). Stesso pattern di espressione è rilevabile negli esemplari esposti a 12000 µg/L di nitrato di piombo dopo tutti i tempi di esposizione; in particolare, è possibile notare che la proteina è espressa in maniera più marcata nelle aree che presentano maggiore danno strutturale (Tav. 17, figg. A-F).

5.4. Struttura ed ultrastruttura delle branchie di *Thalassoma pavo* esposte a chlorpyrifos

5.4.1. Esposizione a 3.5 µg/L di CPF

Le branchie di *Thalassoma pavo* esposte alla concentrazione di 3.5 µg/L di chlorpyrifos dopo 48 ore mostrano severe e numerose alterazioni sia a livello del filamento primario, che secondario. In particolare, le sezioni istologiche mostrano aree iperplastiche a livello del filamento primario, un notevole incremento delle dimensioni delle chloride cells e la fusione delle lamelle secondarie (Tav. 18, figg. A-B). L'osservazione al MO ha permesso anche di rilevare un marcato fenomeno di lifting dell'epitelio secondario (Tav. 18, fig. C), mentre la formazioni di aneurismi che coinvolge la porzione distale delle lamelle è chiaramente osservabili anche a livello ultrastrutturale (Tav. 18, fig. D).

Dopo 96 ore di esposizione, sia il filamento primario che secondario sono interessati da numerose e intense alterazioni. Al MO la struttura branchiale appare notevolmente disorganizzata e interessata da fenomeni degenerativi delle componenti cellulari (Tav. 19, figg. A-B). L'osservazione al TEM consente, inoltre, di notare la marcata degenerazione delle cellule epiteliali e basali del filamento secondario (Tav. 19, figg. C-D).

5.4.2. Esposizione a 7 µg/L di CPF

Le branchie di *Thalassoma pavo* dopo 48 ore di esposizione a 7 µg/L di chlorpyrifos, subiscono gravi alterazioni soprattutto a carico delle lamelle secondarie. Le immagini al MO rivelano il fenomeno di lifting dell'epitelio primario e secondario (Tav. 20, fig. A), mentre nelle lamelle secondarie la componente vascolare è seriamente compromessa a causa della completa degenerazione delle cellule basali (Tav. 20, fig. B). In seguito ad esposizione al chlorpyrifos, inoltre, le chloride cells non sono più localizzate esclusivamente nei filamenti principali, ma si collocano lungo i margini inferiori delle lamelle secondarie (Tav. 20, figg. C-D). Le immagini al TEM confermano, sempre nelle lamelle secondarie, i marcati fenomeni degenerativi delle cellule pavimentose e di quelle basali (Tav. 20, figg. E-G).

Dopo 96 ore di esposizione, le lamelle secondarie presentano un andamento estremamente irregolare (Tav. 21, fig. A). Al MO è possibile notare la fusione delle lamelle originate da filamenti adiacenti (Tav. 21, fig. B), congiuntamente alla presenza di lifting e ipertrofia delle cellule dell'epitelio secondario (Tav. 21, fig. C). A livello ultrastrutturale si nota la presenza di aneurismi (Tav. 21, fig. D), e l'intensa degenerazione a livello cellulare sia nel filamento principale (Tav. 21, fig. E) che in quello secondario (Tav. 21, fig. F).

5.5. Espressione della Na^+/K^+ -ATPasi nelle branchie di *Thalassoma pavo* esposte a chlorpyrifos

Come detto in precedenza, in condizioni basali la Na^+/K^+ -ATPasi è espressa, nella porzione interlamellare del filamento principale, esclusivamente a livello delle chloride cells (Tav. 8, figg. A-B).

Negli esemplari di *Thalassoma pavo* in seguito all'esposizione per 48 ore a 3.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ di chlorpyrifos, l'espressione della Na^+/K^+ -ATPasi appare maggiore rispetto al gruppo di controllo limitatamente alle chloride cells. In particolare, la fluorescenza evidenzia tutto il corpo cellulare che appare di dimensioni notevoli (Tav. 22, fig. A). Nonostante l'intenso danno istologico osservato, l'aspetto funzionale non viene compromesso. Dopo 96 ore di esposizione, il segnale appare meno intenso rispetto alle 48 ore, ma in ogni caso l'immunofluorescenza è sempre maggiore rispetto a quanto osservato nel gruppo di controllo (Tav. 22, fig. B).

Lo stesso pattern di espressione è osservabile dopo l'esposizione a 7 $\mu\text{g}/\text{L}$ di chlorpyrifos; infatti, dopo 48 ore di esposizione il segnale appare più evidente (Tav. 22, fig. C) rispetto a quanto osservabile dopo 96 ore di esposizione (Tav. 22, fig. D).

5.6. Apparato branchiale degli esemplari di controllo di *Carassius auratus*

L'apparato branchiale di *Carassius auratus* mostra la stessa organizzazione strutturale in archi, filamenti e lamelle descritta per *Thalassoma pavo*. Diversamente, le lamelle secondarie sono incorporate in una massa cellulare chiamata Interlamellar Cell Mass (ILCM) (Tav. 23, figg. A-B). Questa regione è composta

prevalentemente da cellule indifferenziate, insieme alle meno frequenti chloride cells (CC), goblet cells (GC) e cellule basali (Sollid et al., 2005) (Tav. 23, figg. C-D).

5.7. Struttura ed ultrastruttura delle branchie di *Carassius auratus* dopo esposizione a chlorpyrifos e post esposizione

5.7.1. Apparato branchiale dopo 96 h di esposizione acuta

Dopo 96 ore di esposizione alla concentrazione più bassa di pesticida (1 $\mu\text{g/L}$), l'organizzazione tissutale delle branchie di *Carassius auratus* è mantenuta; non si osservano alterazioni eccetto per un lieve decremento dell'ILCM (Tav. 24, fig. A). Dopo esposizione acuta alla concentrazione intermedia di chlorpyrifos (4 $\mu\text{g/L}$), il fenomeno di riduzione della regione interlamellare diventa più marcato (Tav. 24, fig. B). In aggiunta, le sezioni istologiche mostrano la formazione di edemi nella porzione apicale delle lamelle secondarie (Tav. 24, fig. C), mentre, l'analisi ultrastrutturale rivela il distaccamento dell'epitelio secondario dalla componente vasale sottostante (Tav. 24, fig. D).

Dopo 96 ore di esposizione alla concentrazione di chlorpyrifos più alta (8 $\mu\text{g/L}$), è possibile osservare la presenza di danni istologici ancora più intensi; la regione interlamellare subisce un'ulteriore riduzione (Tav. 25, fig. A), fino a risultare quasi assente in alcune regioni (Tav. 25, fig. B). A livello ultrastrutturale si nota il drastico assottigliamento dell'epitelio delle lamelle secondarie (Tav. 25, fig. C) e il distaccamento delle cellule epiteliali dalla componente vasale sottostante (Tav. 25, fig. D).

5.7.2. Apparato branchiale dopo 7 giorni di recupero

Dopo 7 giorni di post esposizione in acqua priva di pesticida, l'apparato branchiale degli esemplari precedentemente esposti a 1 $\mu\text{g/L}$ di chlorpyrifos presenta un andamento molto regolare, sia a livello strutturale (Tav. 26, fig. A), che ultrastrutturale (Tav. 26, fig. B).

Al contrario, nonostante il periodo di recupero, gli esemplari di *Carassius auratus* esposti a 4 $\mu\text{g/L}$ di chlorpyrifos, mostrano ancora diverse alterazioni; al MO è ben visibile una scarsa presenza della componente cellulare dell'ILCM (Tav. 26, fig. C); inoltre, l'epitelio lamellare mostra ancora il fenomeno di lifting (Tav. 26, fig.

D). L'analisi ultrastrutturale rivela ancora l'evidente assottigliamento a carico dell'epitelio lamellare secondario (Tav. 26, fig. E).

Negli esemplari esposti precedentemente a 8 µg/L di chlorpyrifos dopo 7 giorni di recupero in acqua priva di pesticida sono ancora rilevabili marcati fenomeni di alterazione, sia a livello strutturale che ultrastrutturale, quali la riduzione della regione interlamellare (Tav. 27, fig. A), e la degenerazione a carico delle cellule che compongono l'ILCM che, in alcuni casi, appaiono svuotate del loro contenuto (Tav. 27, figg. B-C).

5.8. Espressione di proteine target nelle branchie di *Carassius auratus* dopo esposizione a chlorpyrifos e post esposizione

5.8.1. Na^+/K^+ -ATPasi

Nell'epitelio branchiale di *Carassius auratus*, in condizioni basali, la Na^+/K^+ -ATPasi è espressa esclusivamente a livello delle chloride cells nella parte apicale dell'ILCM (Tav. 28, figg. A-B).

In seguito ad una esposizione acuta a 1 µg/L di chlorpyrifos, rispetto al gruppo di controllo, l'immunofluorescenza della proteina target appare di minore intensità, soprattutto in coincidenza delle regioni dove il danno strutturale a livello dell'ILCM è più intenso (Tav. 29, fig. A).

Dopo l'esposizione a 4 µg/L di chlorpyrifos, è possibile osservare che l'espressione della pompa Na^+/K^+ -ATPasi a livello delle chloride cells, ma intensità del segnale risulta minore rispetto a quanto osservato negli esemplari mantenuti in condizioni basali (Tav. 29, fig. B). L'immunolabelling diminuisce, invece, in maniera marcata dopo l'esposizione alla concentrazione più alta di chlorpyrifos testata; in particolare, in accordo con i maggiori danni strutturali osservati in microscopia ottica a carico dello spazio interlamellare, è possibile osservare solo ristrette aree immunoreattive (Tav. 29, fig. C).

Dopo sette giorni di recupero, l'espressione della Na^+/K^+ -ATPasi, negli animali precedentemente esposti ad 1 µg/L di chlorpyrifos, torna ad essere espressa a livelli comparabili a quanto osservato nel gruppo di controllo, in particolare l'espressione coinvolge gli strati apicali dell'ILMC (Tav. 29, fig. D) che ha ormai riacquisito il lotro assetto strutturale.

Nelle branchie degli esemplari esposti a 4 µg/L di chlorpyrifos dopo il periodo di post esposizione, si osserva una ripresa nell'espressione delle proteina comparabile con quella osservata negli esemplari di controllo in virtù di una diminuzione dei danni strutturali a carico livello dell'ILCM (Tav. 29, fig. E).

Invece, dopo il periodo di post esposizione negli esemplari precedentemente esposti a 8 µg/L di chlorpyrifos, si osserva una lieve ripresa dell'espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi esclusivamente nelle regioni dove il danno istologico appare parzialmente ridotto, mentre nelle regioni ancora fortemente alterate il segnale della proteina risulta quasi o del tutto assente (Tav. 29, fig. F).

5.8.2. Ossido nitrico sintasi inducibile

Le osservazioni eseguite in microscopia confocale rivelano l'assenza dell'espressione della iNOS nelle branchie di *Carassius auratus* in condizioni basali (Tav. 28, figg. C-D).

Dopo esposizione acuta a chlorpyrifos si osserva la presenza dell'espressione di tale proteina il cui livello di intensità aumenta all'aumentare della concentrazione; in particolare, negli esemplari esposti ad 1 µg/L il segnale appare localizzato a livello delle lamelle secondarie (Tav. 30, fig. A), mentre in quelli esposti a 4 e 8 µg/L di chlorpyrifos l'espressione è più uniforme e coinvolge anche la regione interlamellare (Tav. 30, figg. B-C).

Dopo il periodo di recupero in acqua priva di pesticida, l'iNOS è fortemente espressa e localizzata sia a livello delle lamelle secondarie che dell'ILCM; in particolare l'intensità del segnale risulta maggiore negli individui precedentemente esposti alla più bassa ed alla più alta concentrazione testata (Tav. 30, fig. D-F).

5.9. Dosaggio dei lipoperossidi nei tessuti branchiali di *Carassius auratus* esposti a chlorpyrifos

Dal tessuto branchiale prelevato da esemplari di *Carassius auratus*, sia dopo esposizione diretta a chlorpyrifos che dopo il periodo di recupero in acqua priva di pesticida, è stata effettuata la misurazione dei lipoperossidi nelle due condizioni. Come è possibile osservare nel grafico in fig. 5.1, in seguito ad esposizione diretta al pesticida si evidenzia un incremento statisticamente significativo, rispetto al gruppo

di controllo, dei valori di nanoequivalenti di idroperossidi/g di tessuto in tutte le concentrazioni testate.

Dopo il periodo di recupero di 7 giorni in acqua priva di chlorpyrifos, i livelli di lipoperossidazione nei gruppi precedentemente esposti alle concentrazioni di 1 e 4 $\mu\text{g}/\text{L}$ di chlorpyrifos rientrano nei valori riscontrabili anche in condizioni basali. Diversamente, il gruppo precedentemente esposto alla concentrazione più alta (8 $\mu\text{g}/\text{L}$ di chlorpyrifos), dopo il periodo di post esposizione, presenta ancora un livello di lipoperossidazione significativamente più alto rispetto al gruppo di controllo.

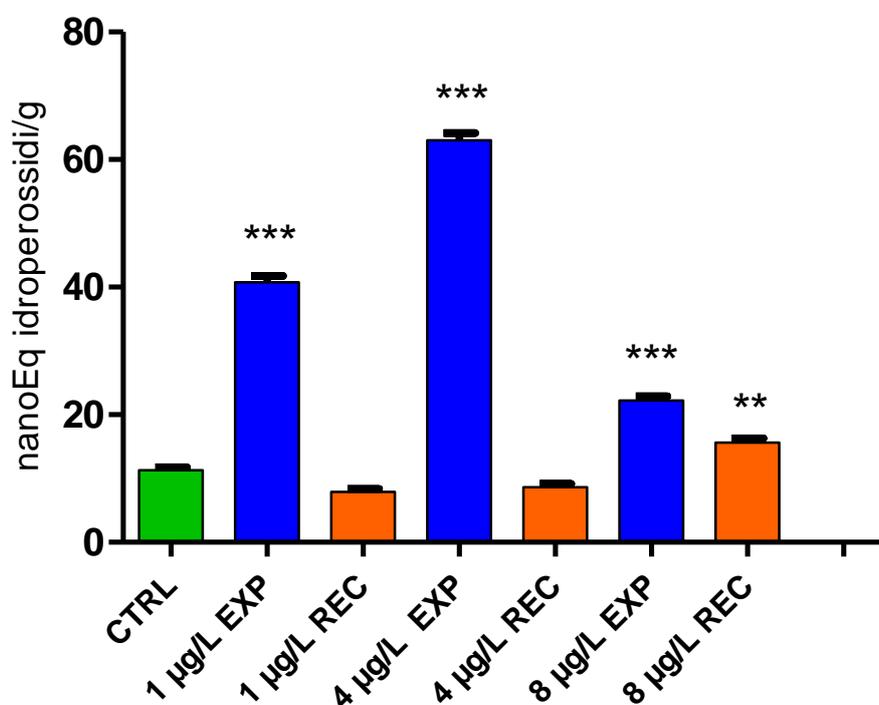
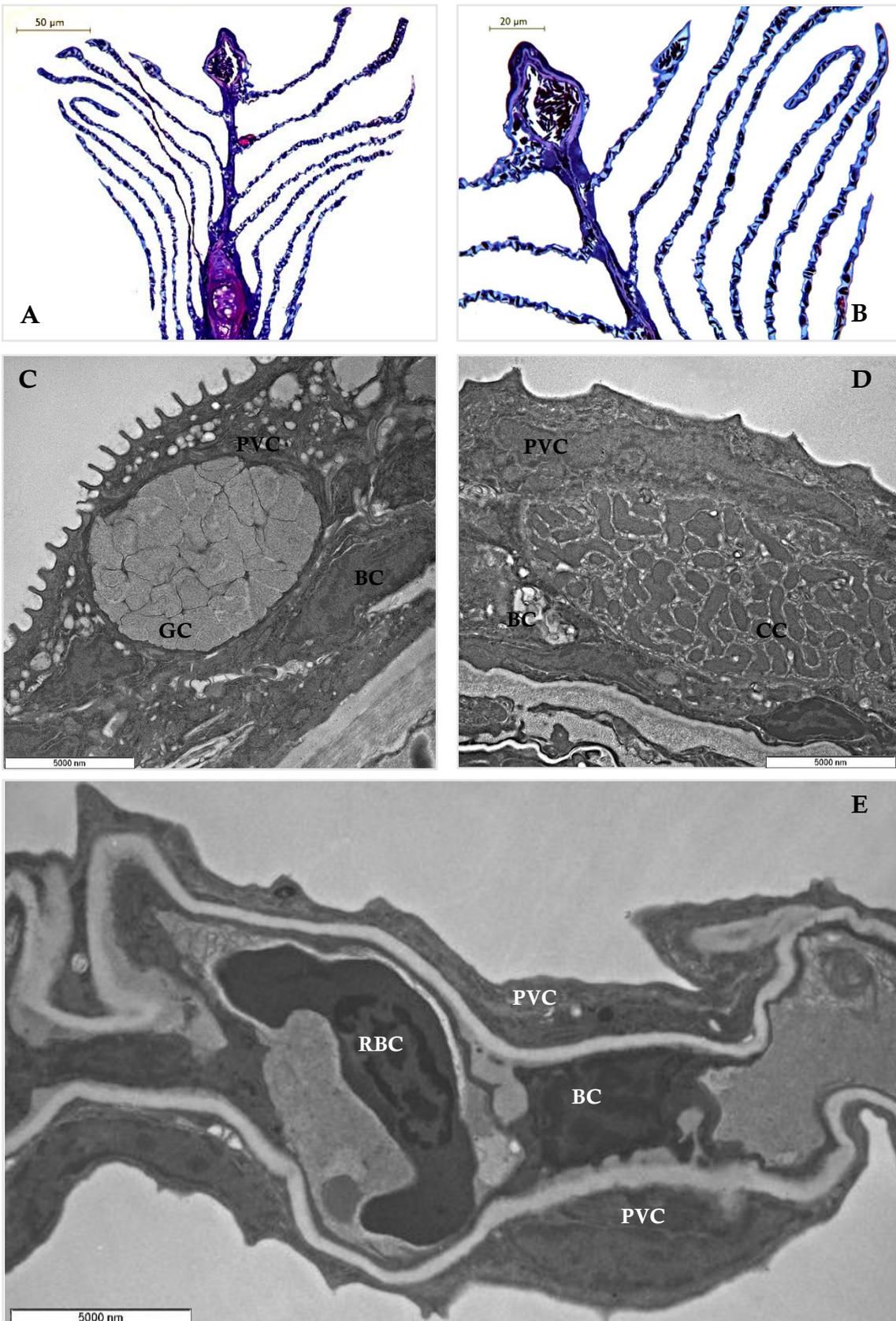


Fig. 5.1 Dosaggio dei lipoperossidi nel tessuto branchiale.

Le barre mostrano il valore medio \pm S.E.; $n=7$; ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$ rispetto al gruppo di controllo (one-way ANOVA seguita dal Bonferroni post hoc test).

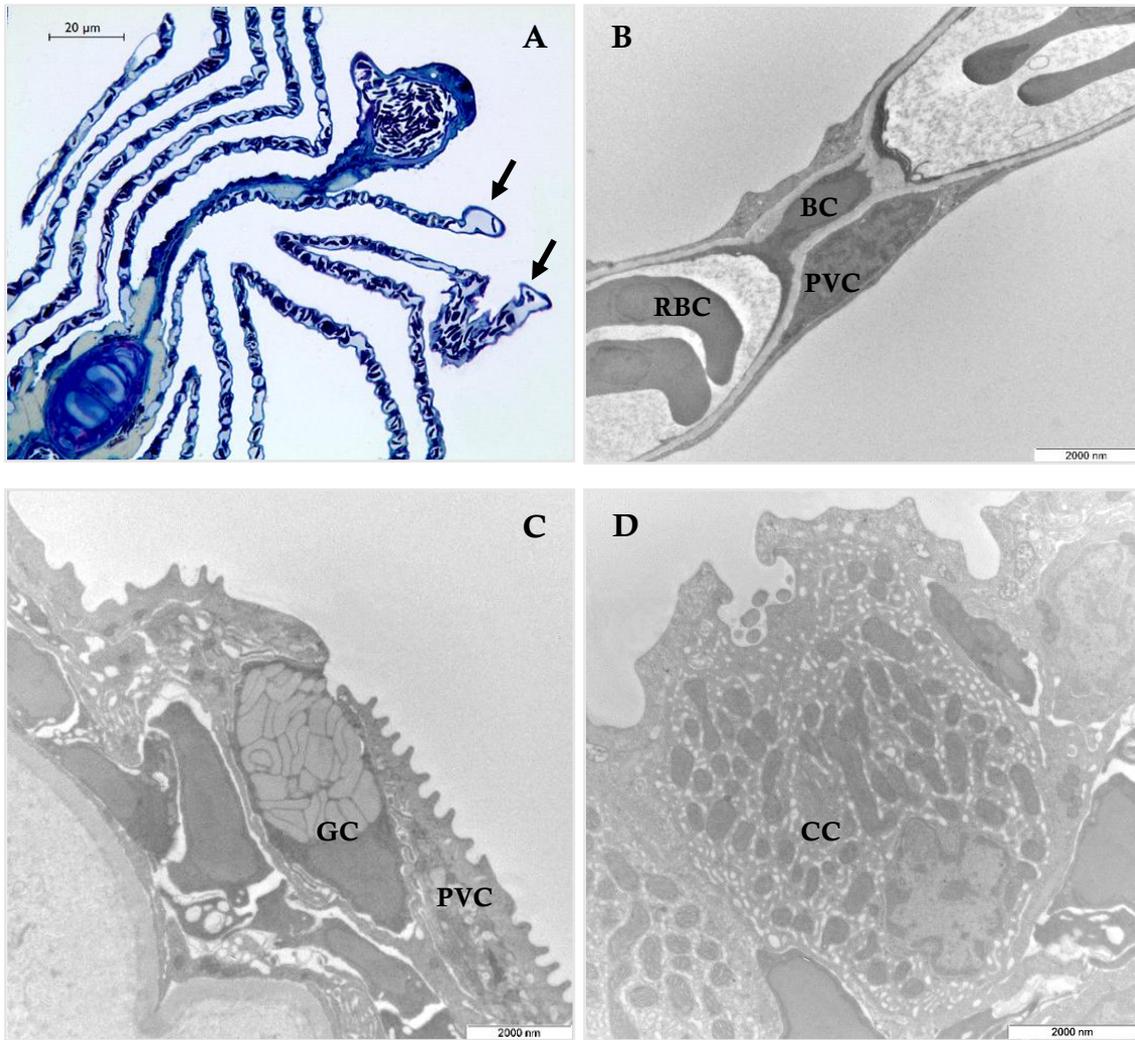
Thalassoma pavo - Tavola 1

Esemplari di controllo



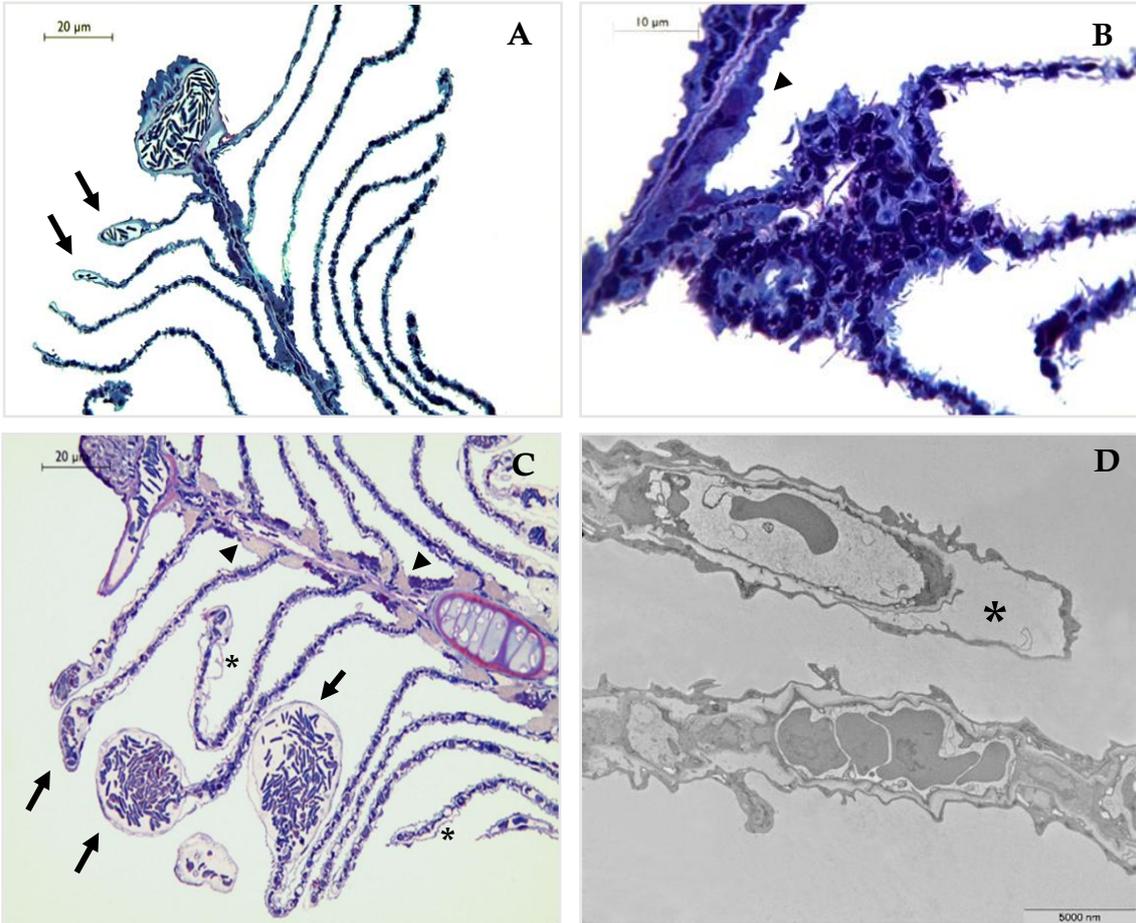
Thalassoma pavo - Tavola 2

48 ore di esposizione a 800 µg/L di Pb(NO₃)₂



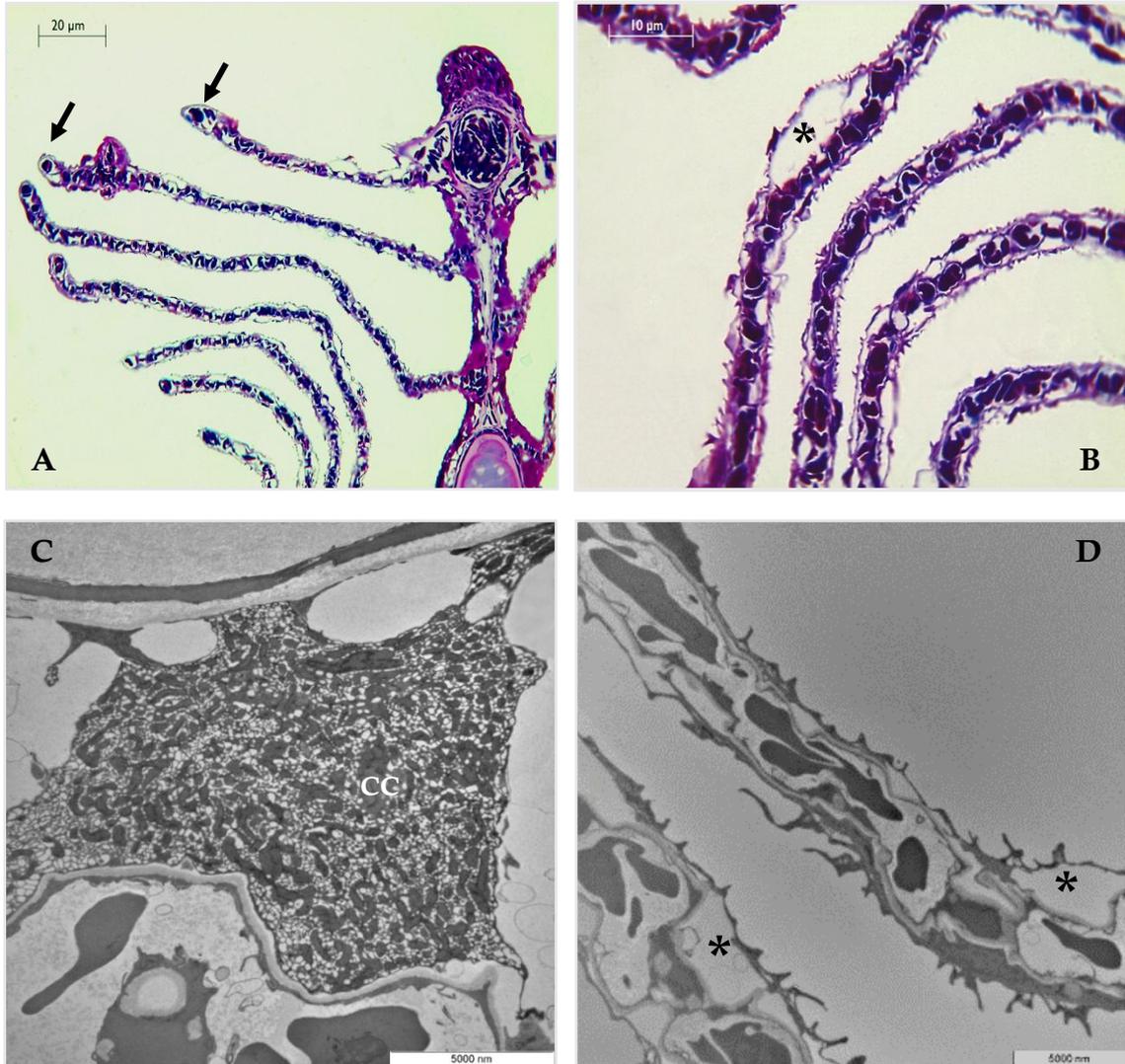
Thalassoma pavo - Tavola 3

96 e 192 ore di esposizione a 800 µg/L di Pb(NO₃)₂



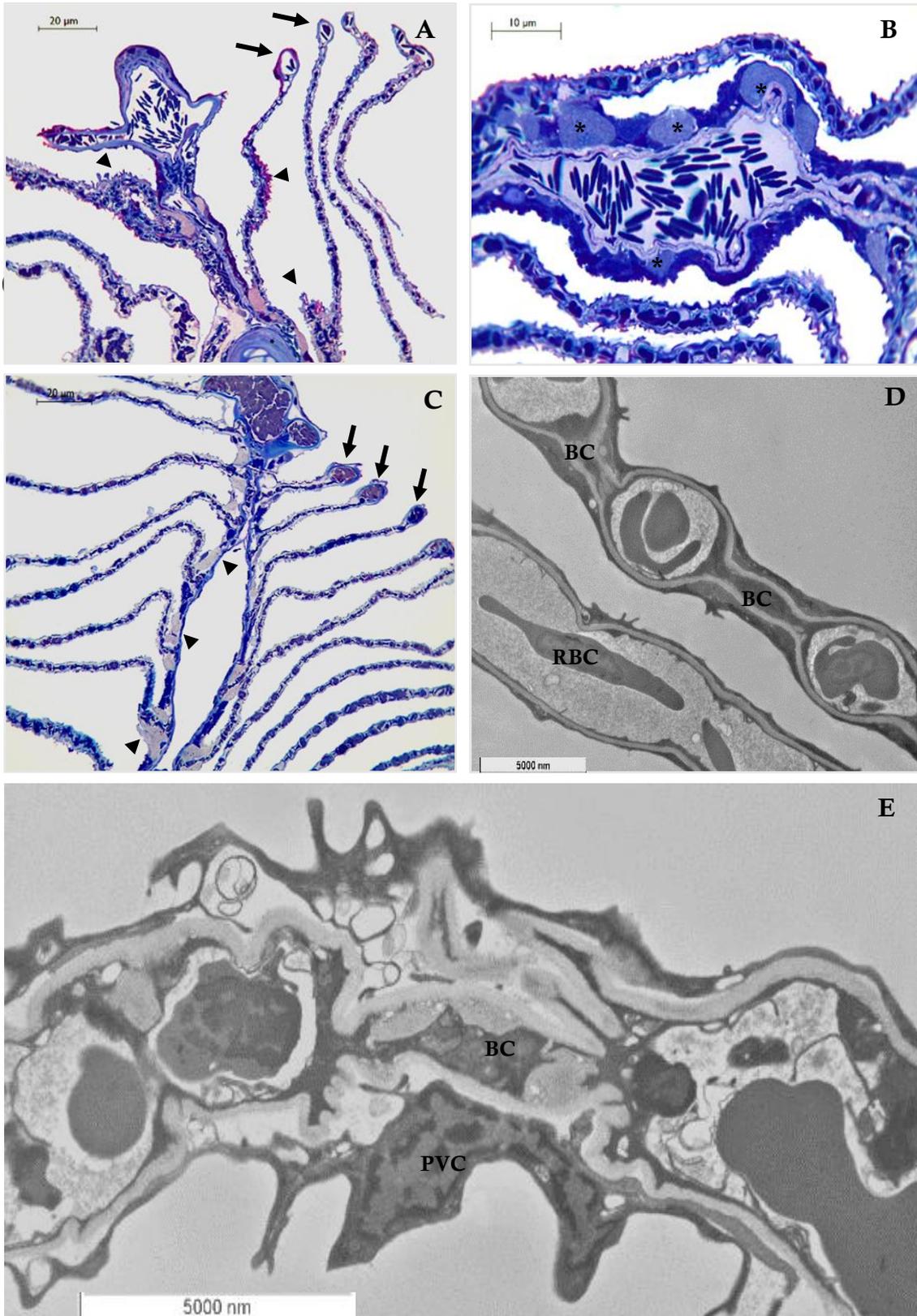
Thalassoma pavo - Tavola 4

48 ore di esposizione a 2000 $\mu\text{g/L}$ di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$



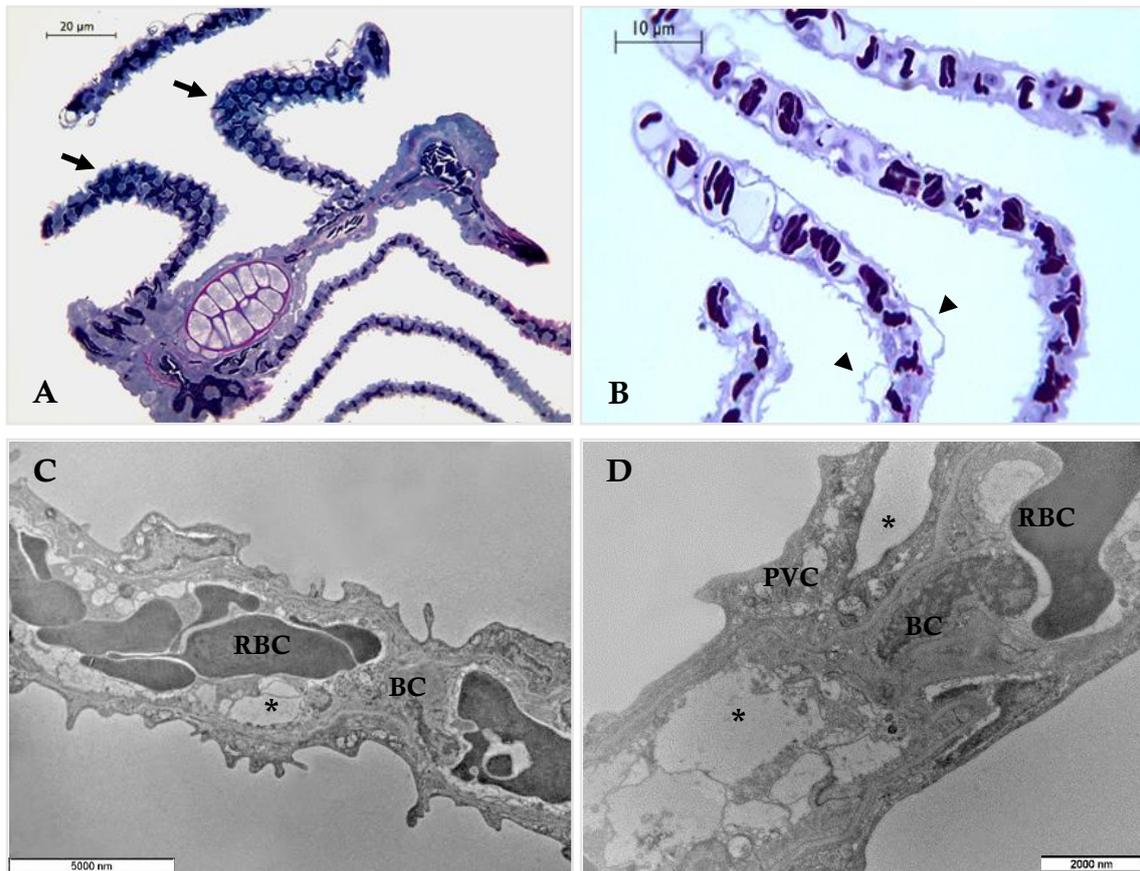
Thalassoma pavo - Tavola 5

96 e 192 ore di esposizione a 2000 $\mu\text{g}/\text{L}$ di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$



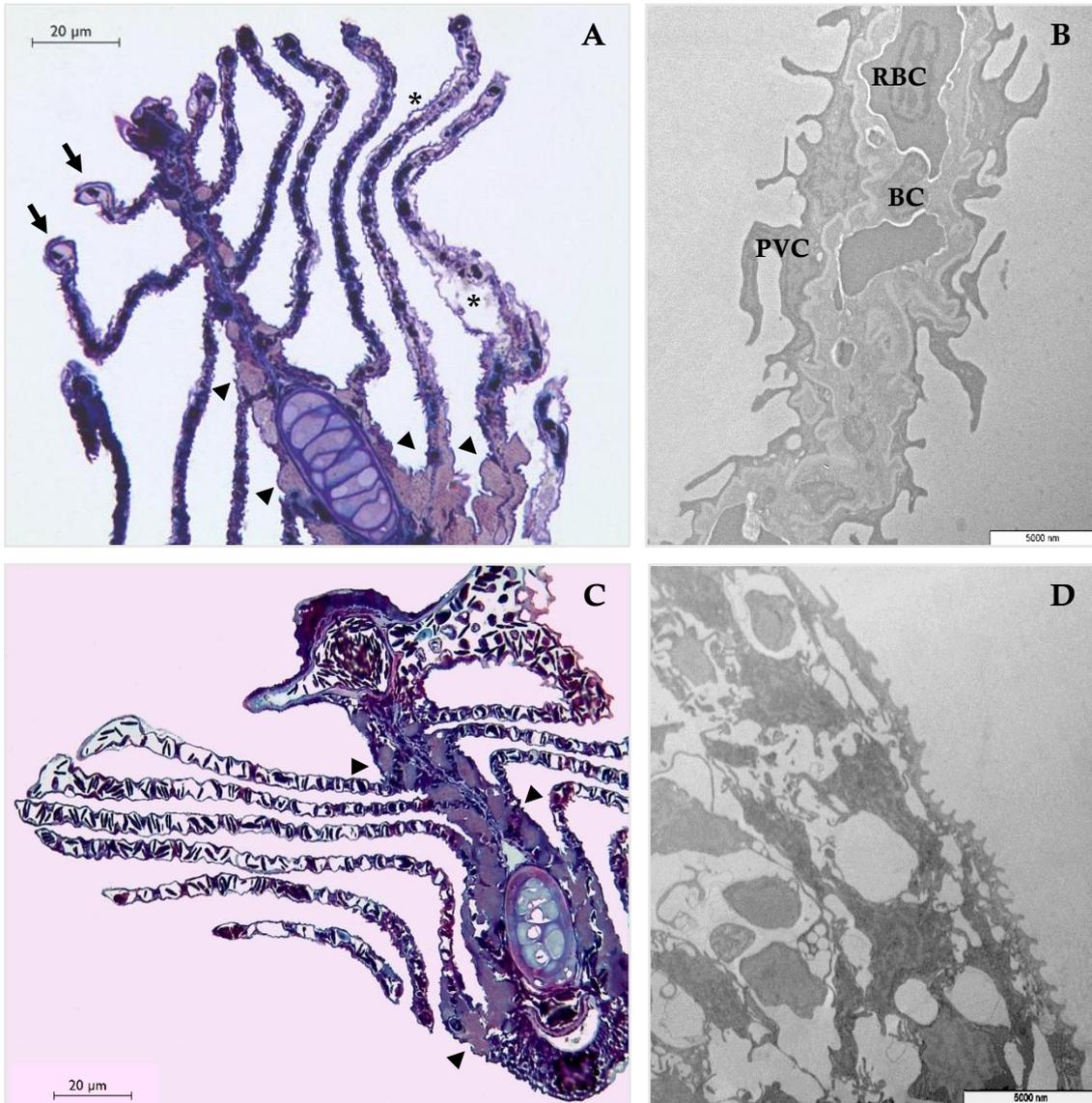
Thalassoma pavo - Tavola 6

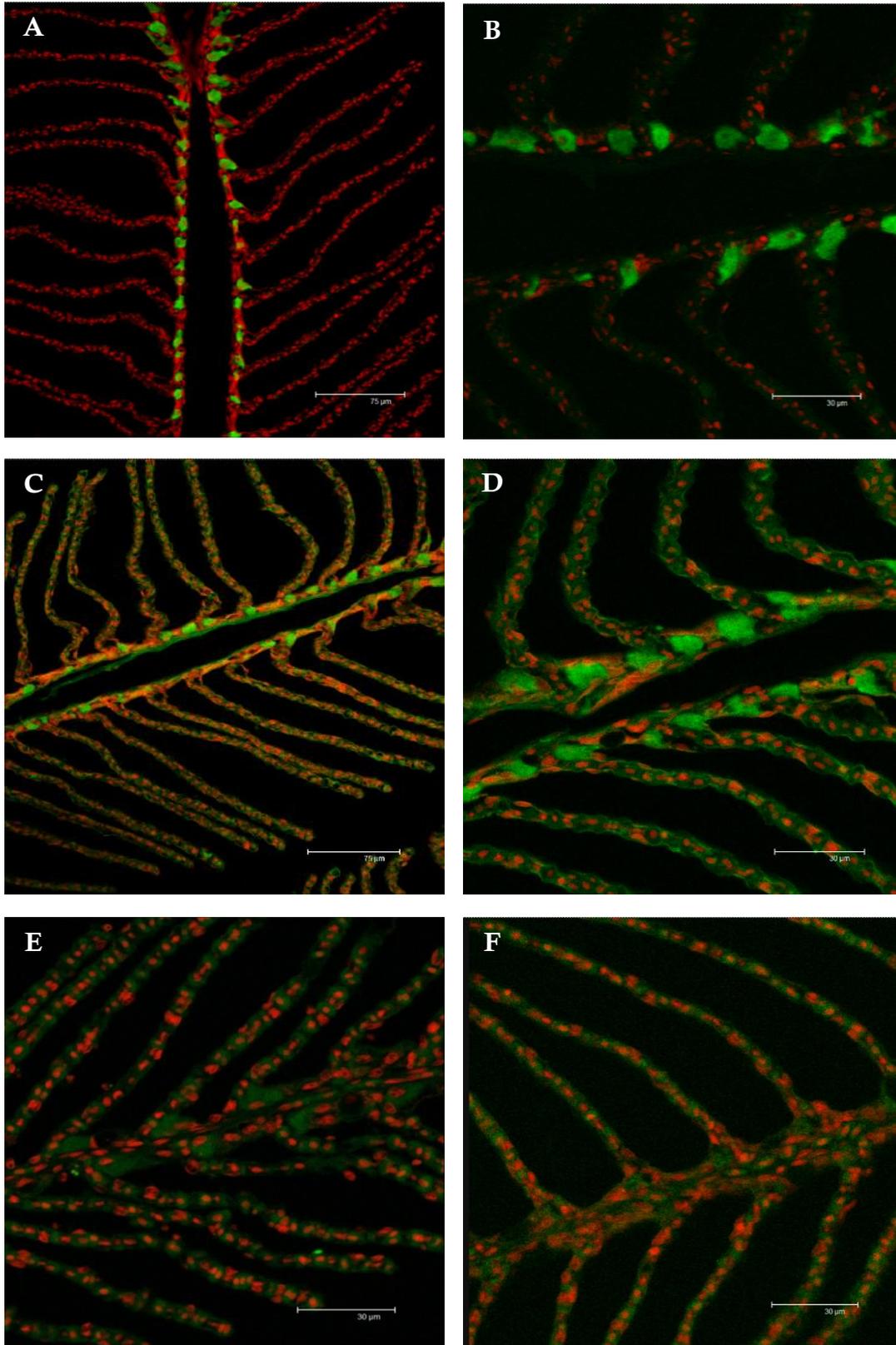
48 ore di esposizione a 12000 $\mu\text{g/L}$ di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$



Thalassoma pavo - Tavola 7

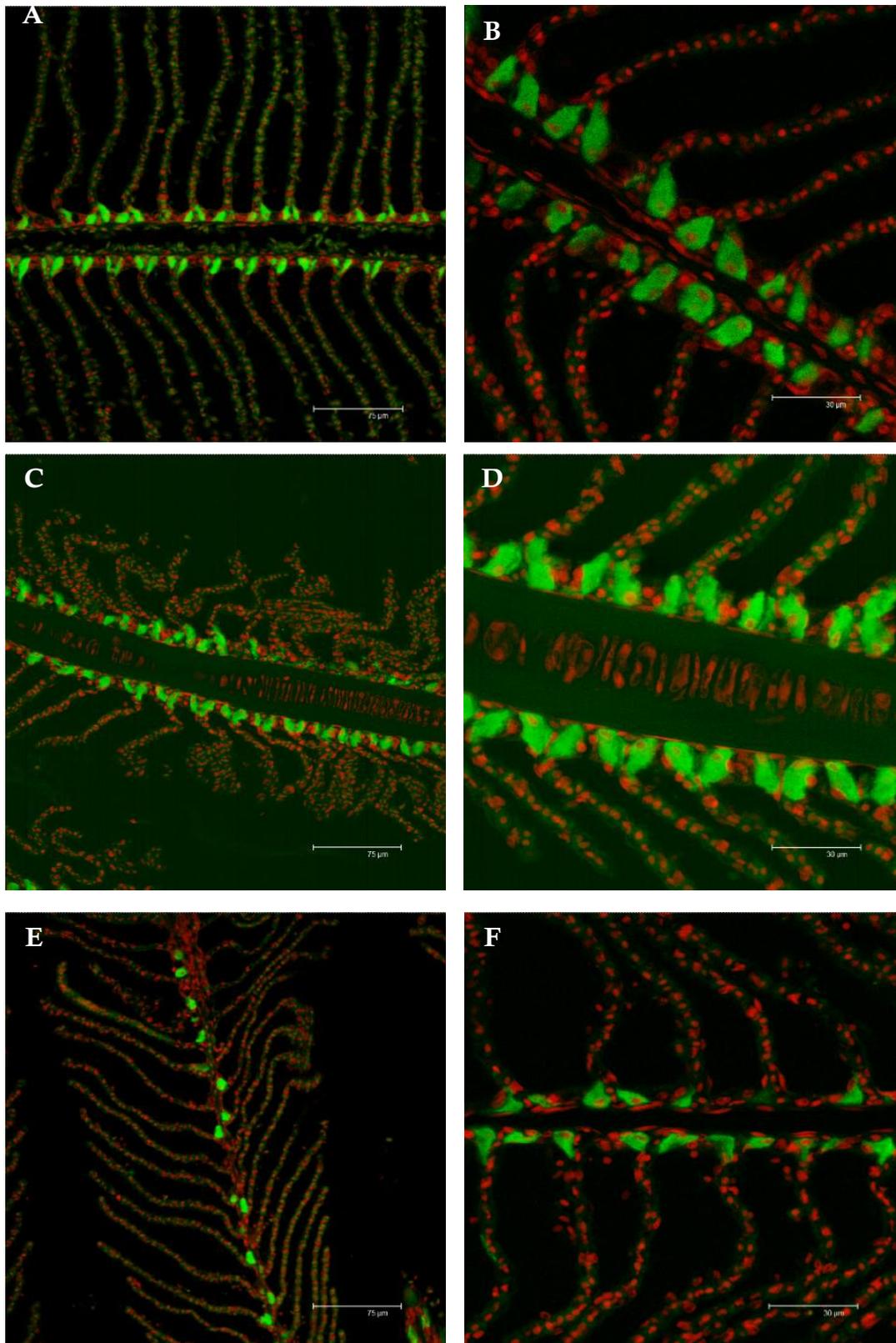
96 e 192 ore di esposizione a 12000 $\mu\text{g}/\text{L}$ di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$



Thalassoma pavo - Tavola 8Esemplari di controllo
Espressione di Na⁺/K⁺-ATPasi, AQP-3 e MTs

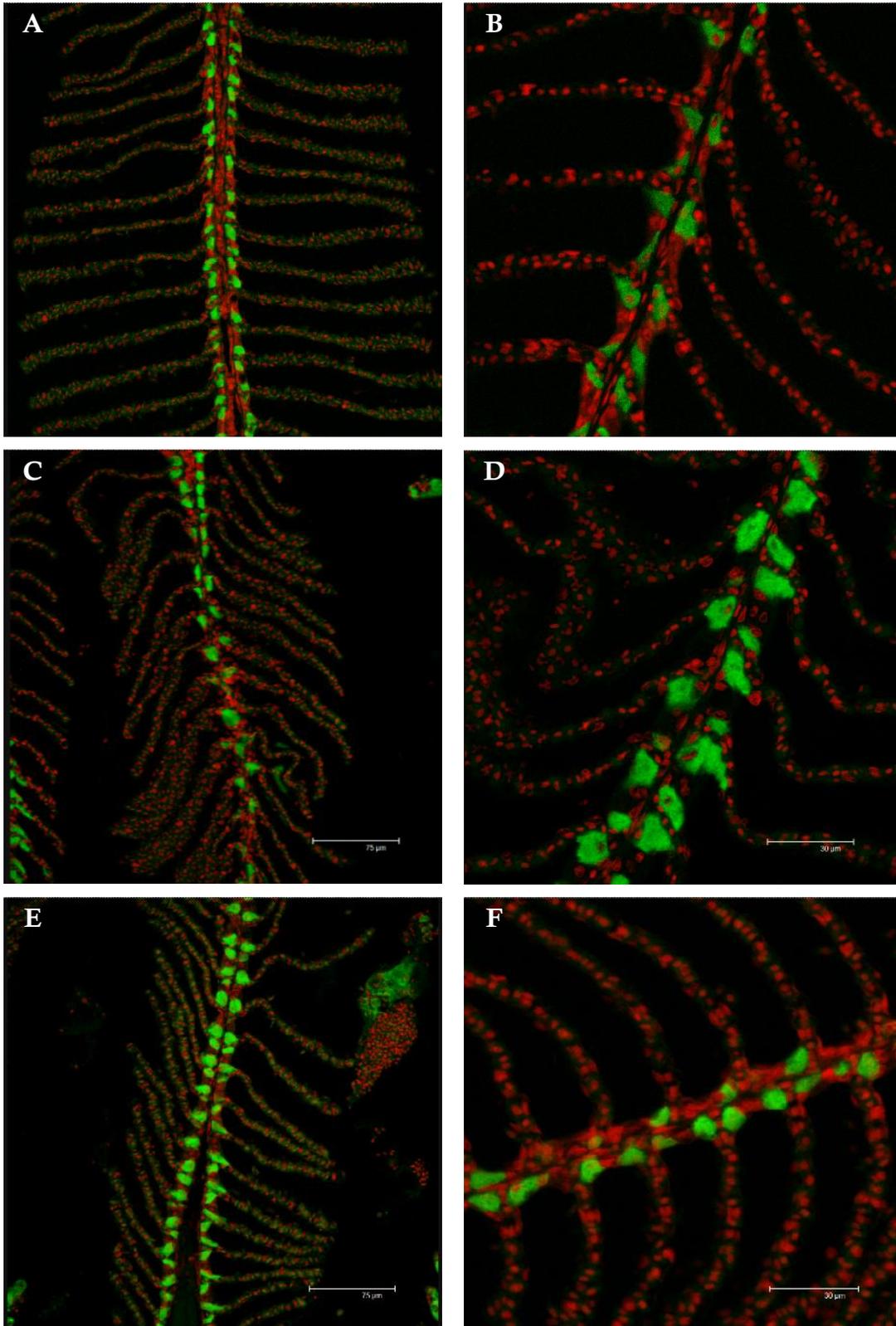
Thalassoma pavo - Tavola 9

Espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi dopo esposizione a 800 µg/L di Pb(NO₃)₂



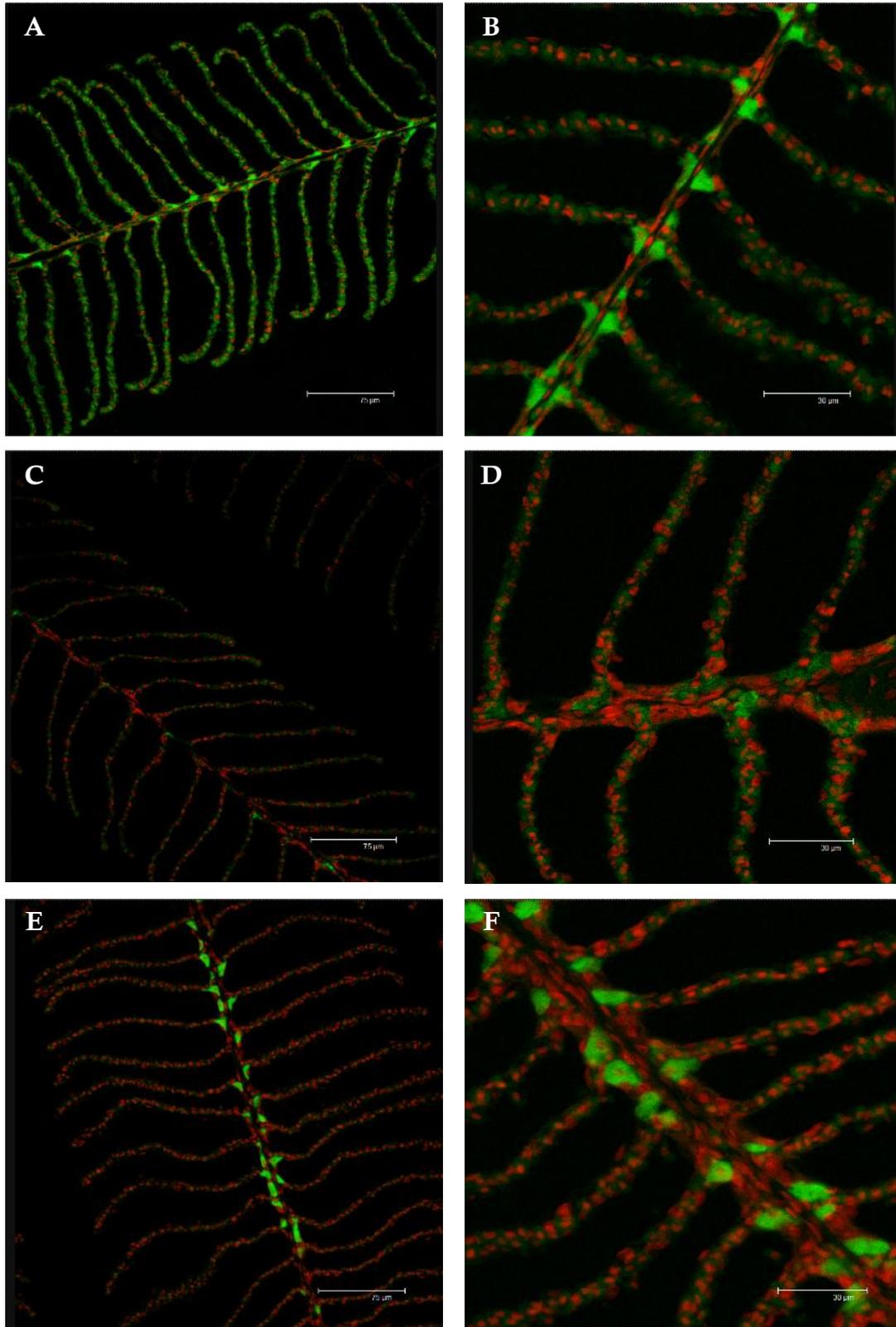
Thalassoma pavo - Tavola 10

Espressione della Na^+/K^+ -ATPasi dopo esposizione a $2000 \mu\text{g}/\text{L}$ di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$



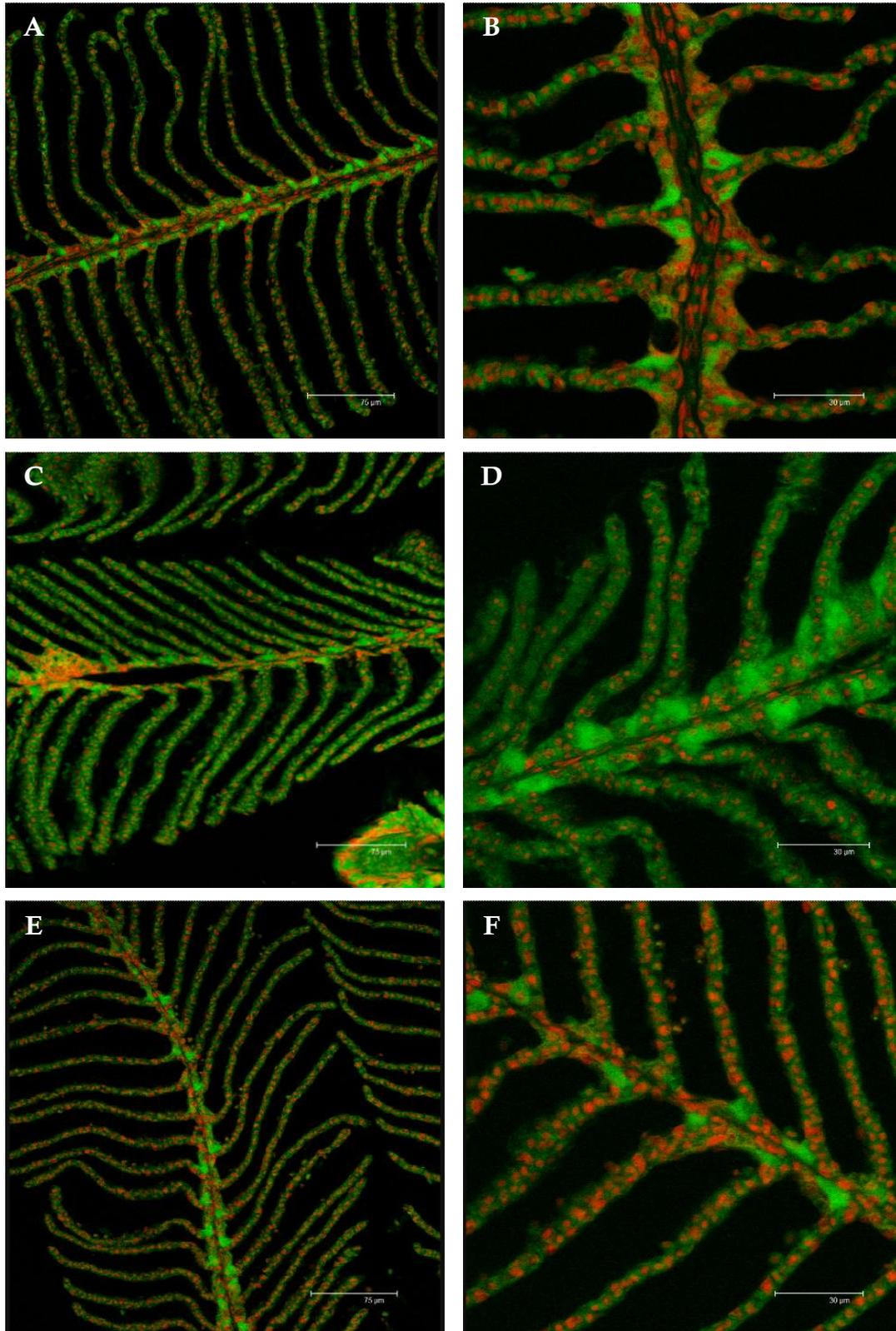
Thalassoma pavo - Tavola 11

Espressione della Na^+/K^+ -ATPasi dopo esposizione a $12000 \mu\text{g}/\text{L}$ di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$



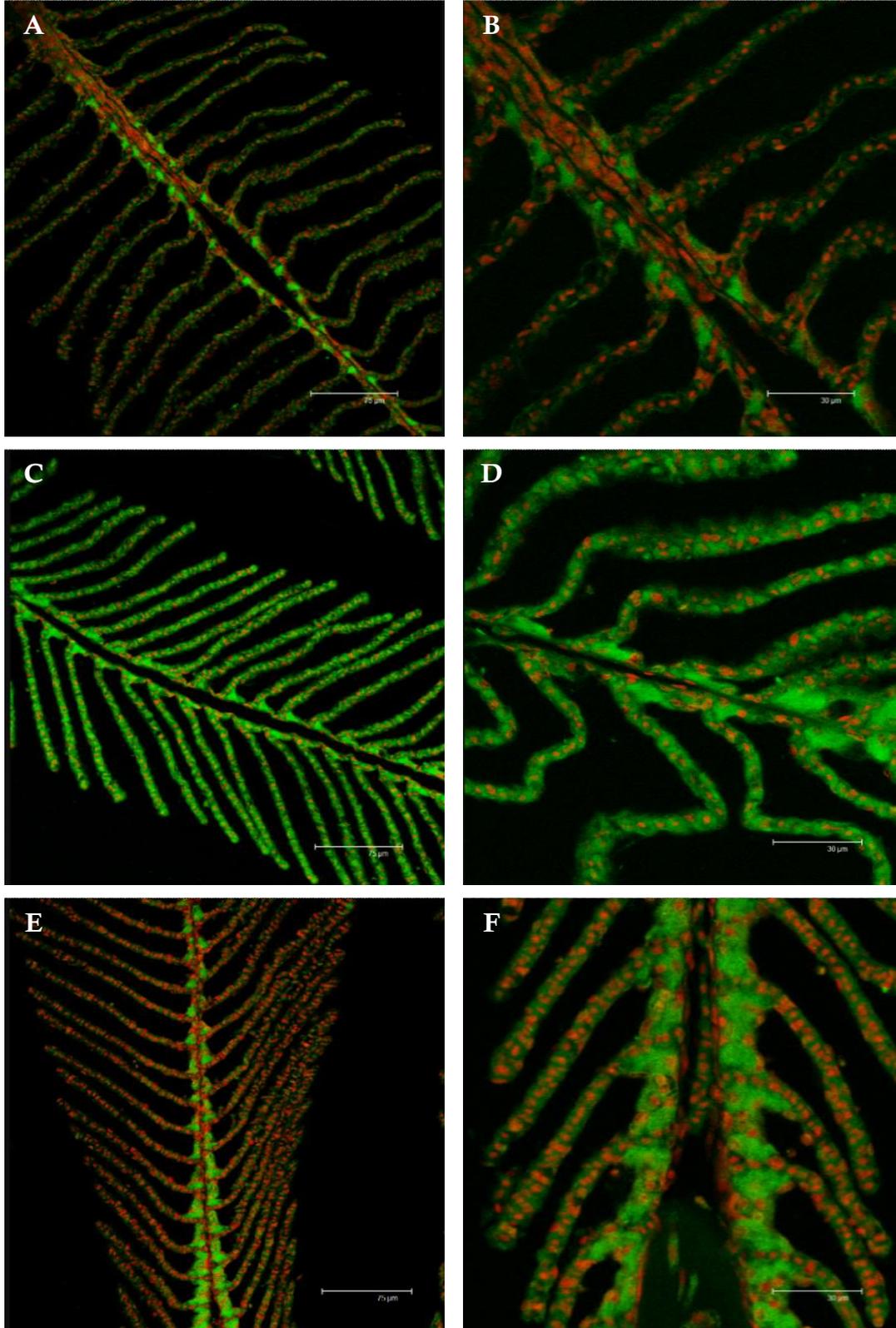
Thalassoma pavo - Tavola 12

Espressione dell'AQP-3 dopo esposizione a
800 $\mu\text{g/L}$ di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$



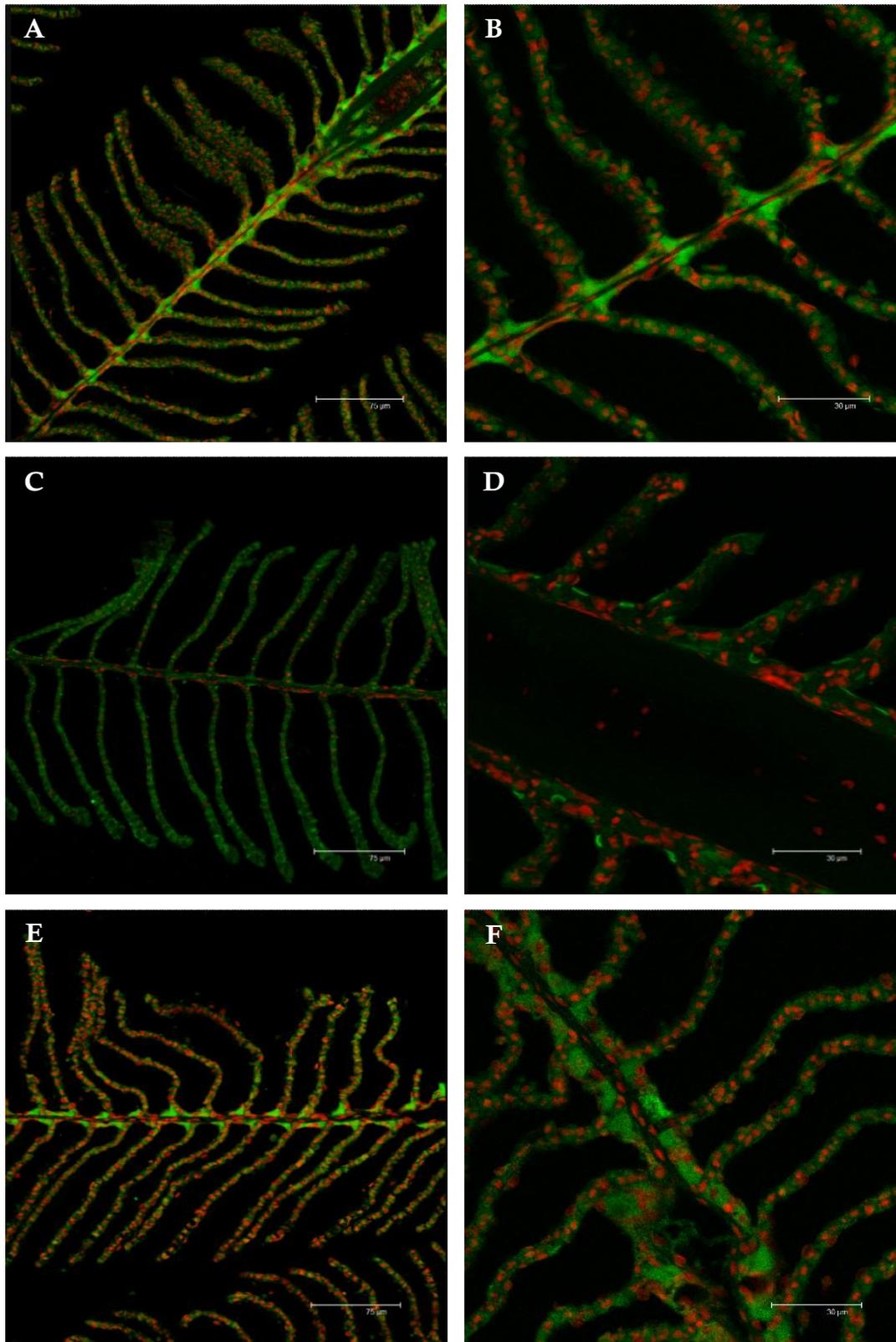
Thalassoma pavo - Tavola 13

Espressione dell'AQP-3 dopo esposizione a
2000 $\mu\text{g/L}$ di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$



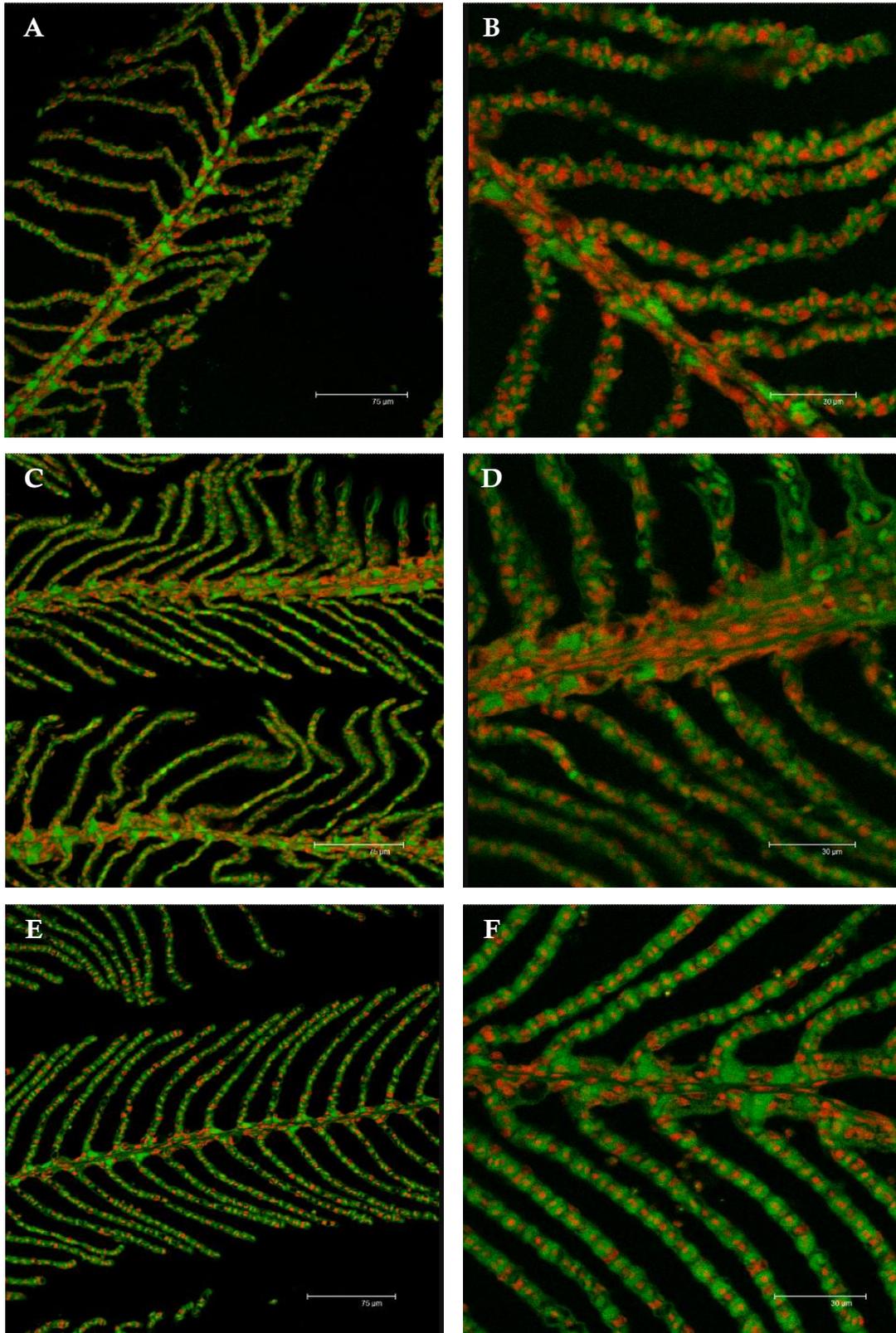
Thalassoma pavo - Tavola 14

Espressione dell'AQP-3 dopo esposizione a
12000 $\mu\text{g/L}$ di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$



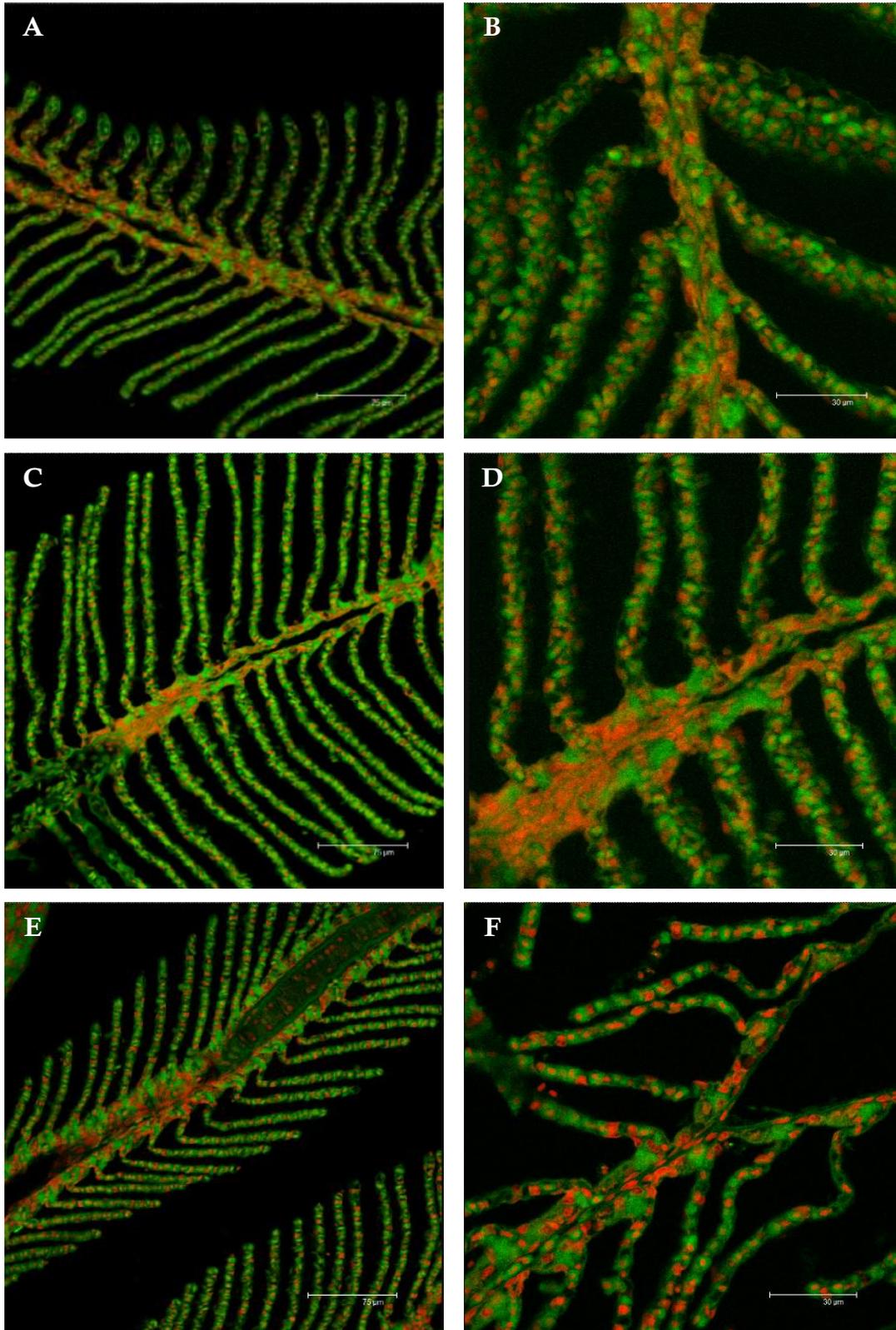
Thalassoma pavo - Tavola 15

Espressione delle MTs dopo esposizione a
800 µg/L di Pb(NO₃)₂



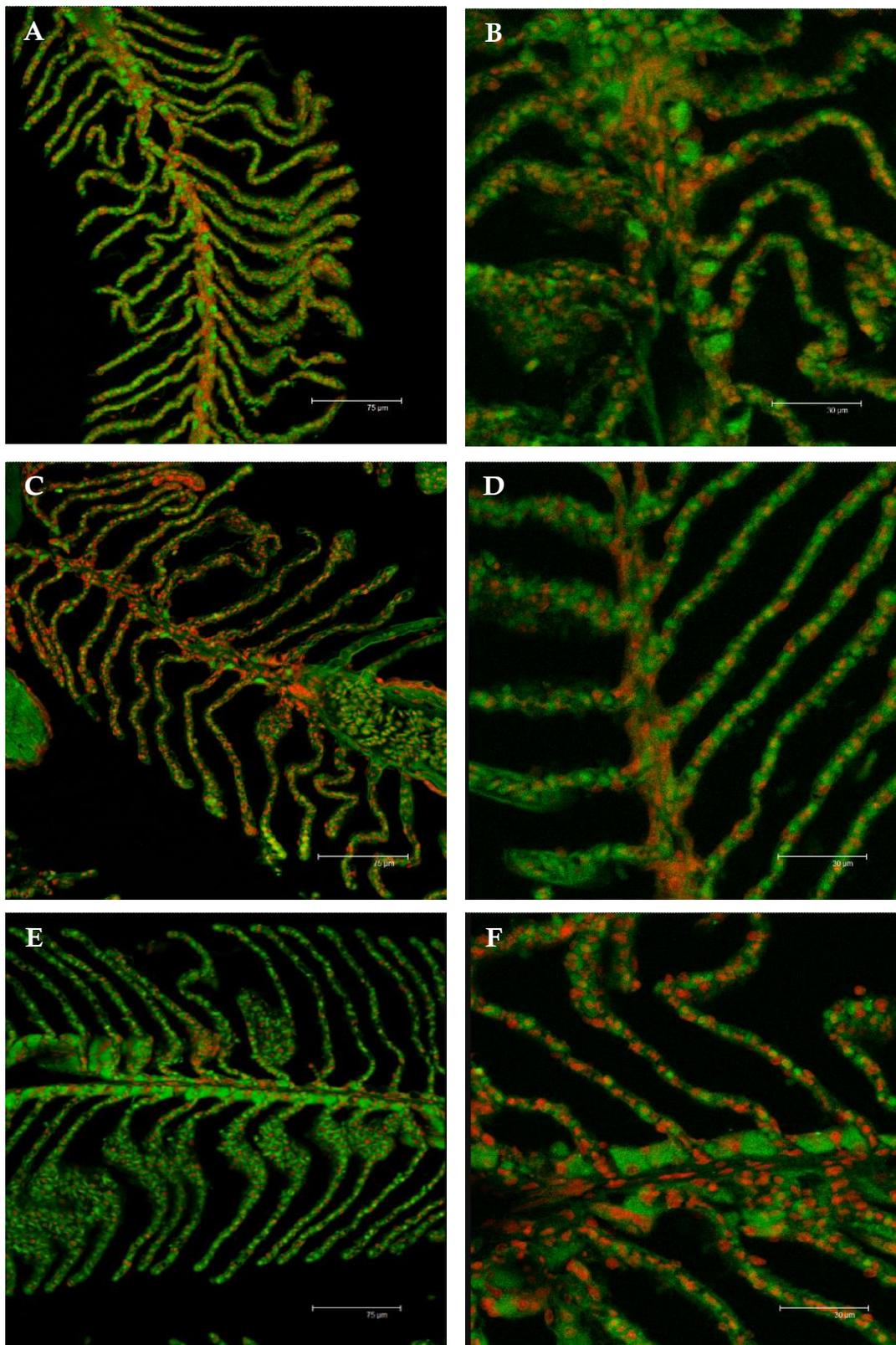
Thalassoma pavo - Tavola 16

Espressione delle MTs dopo esposizione a
2000 $\mu\text{g/L}$ di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

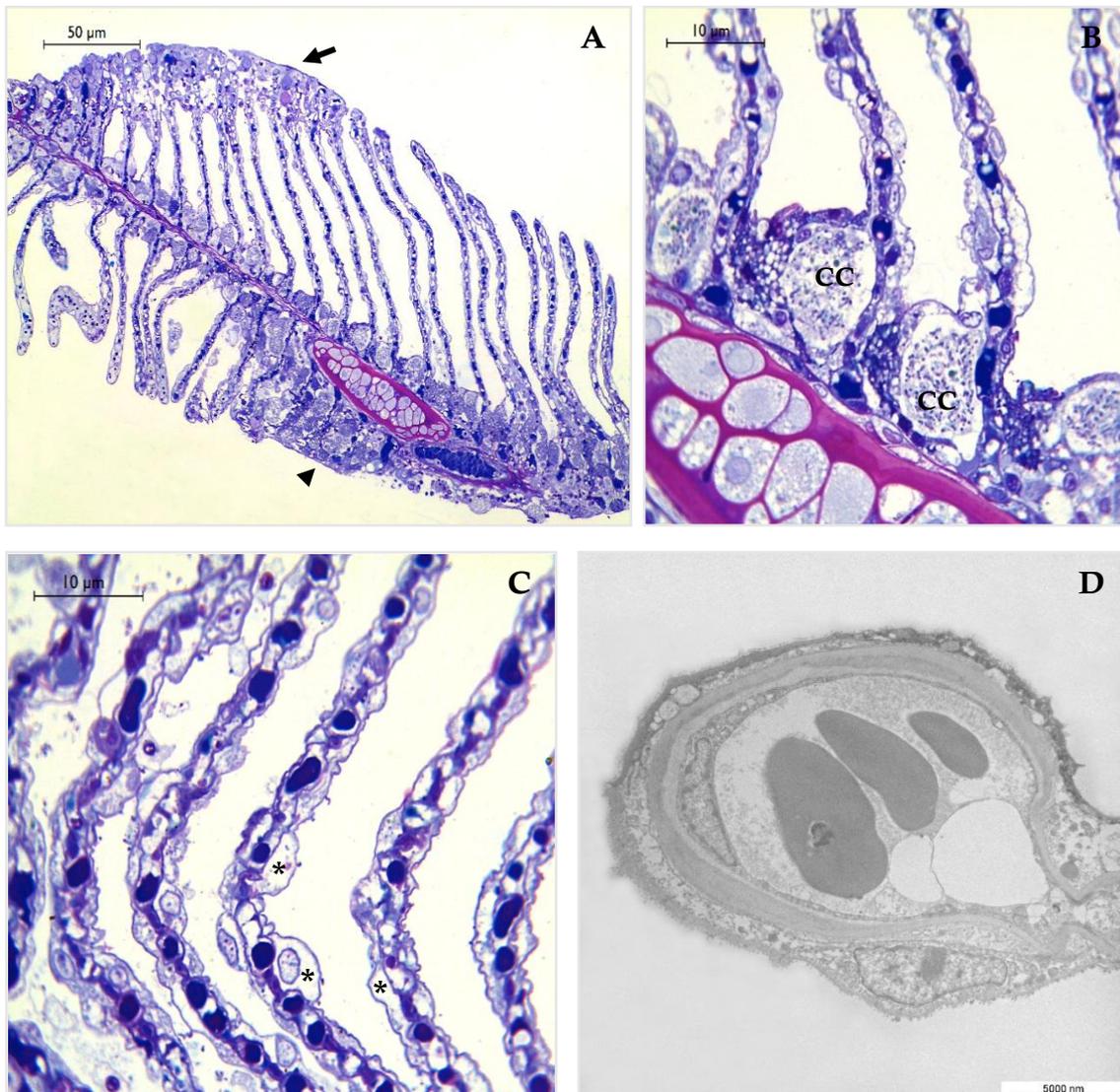


Thalassoma pavo - Tavola 17

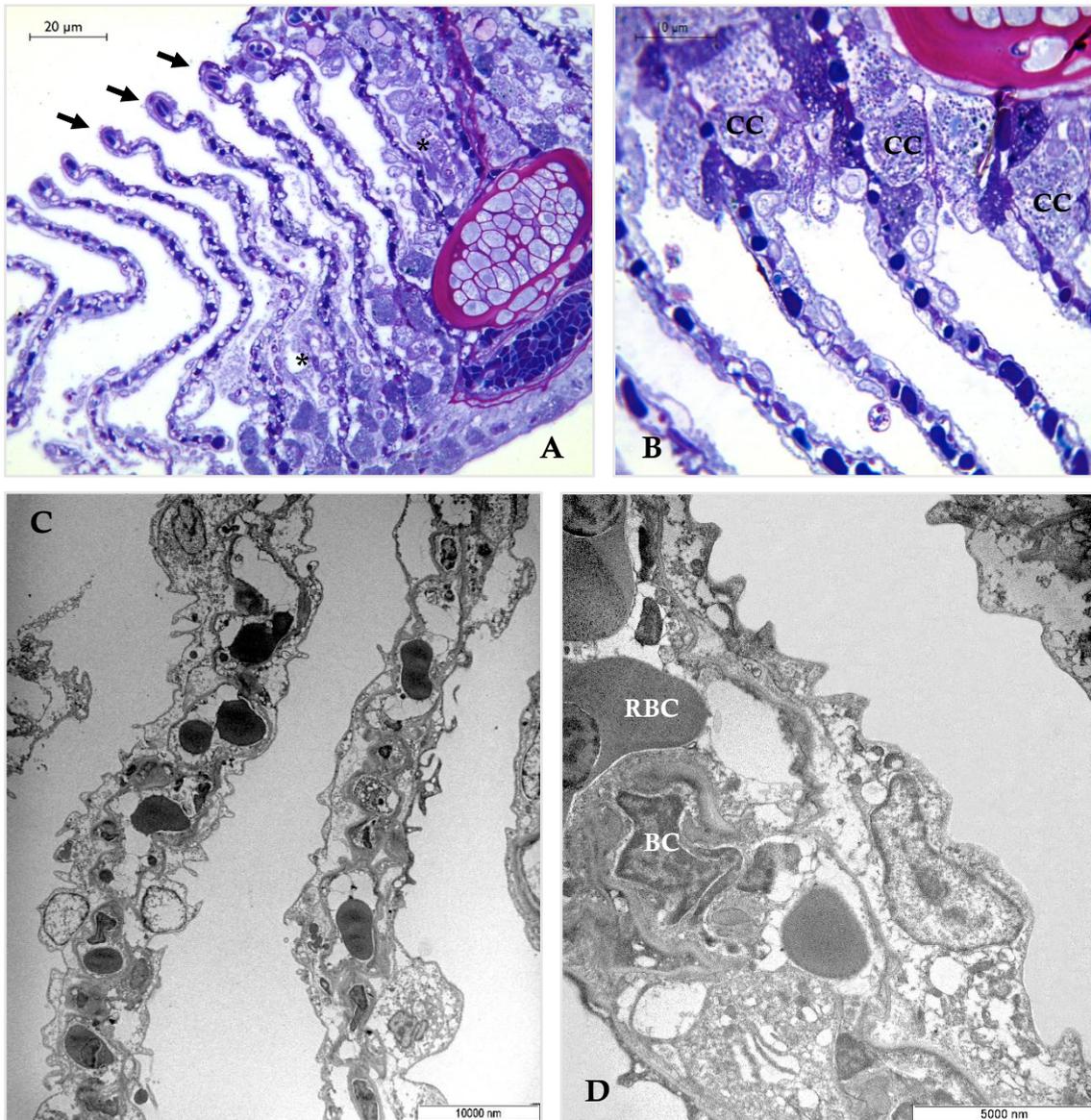
Espressione delle MTs dopo esposizione a
12000 µg/L di Pb(NO₃)₂



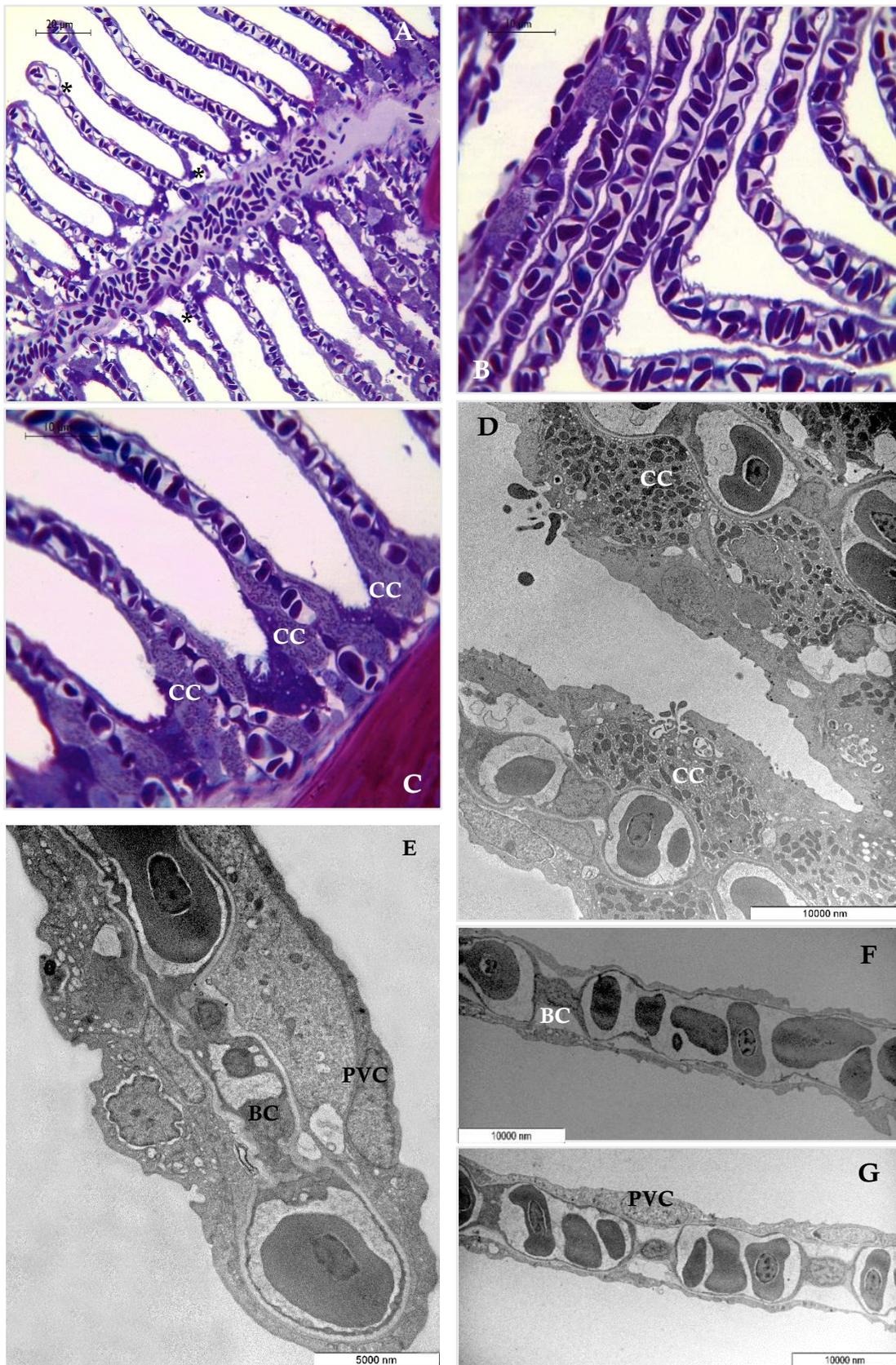
Thalassoma pavo - Tavola 18
48 ore di esposizione a 3.5 µg/L di CPF



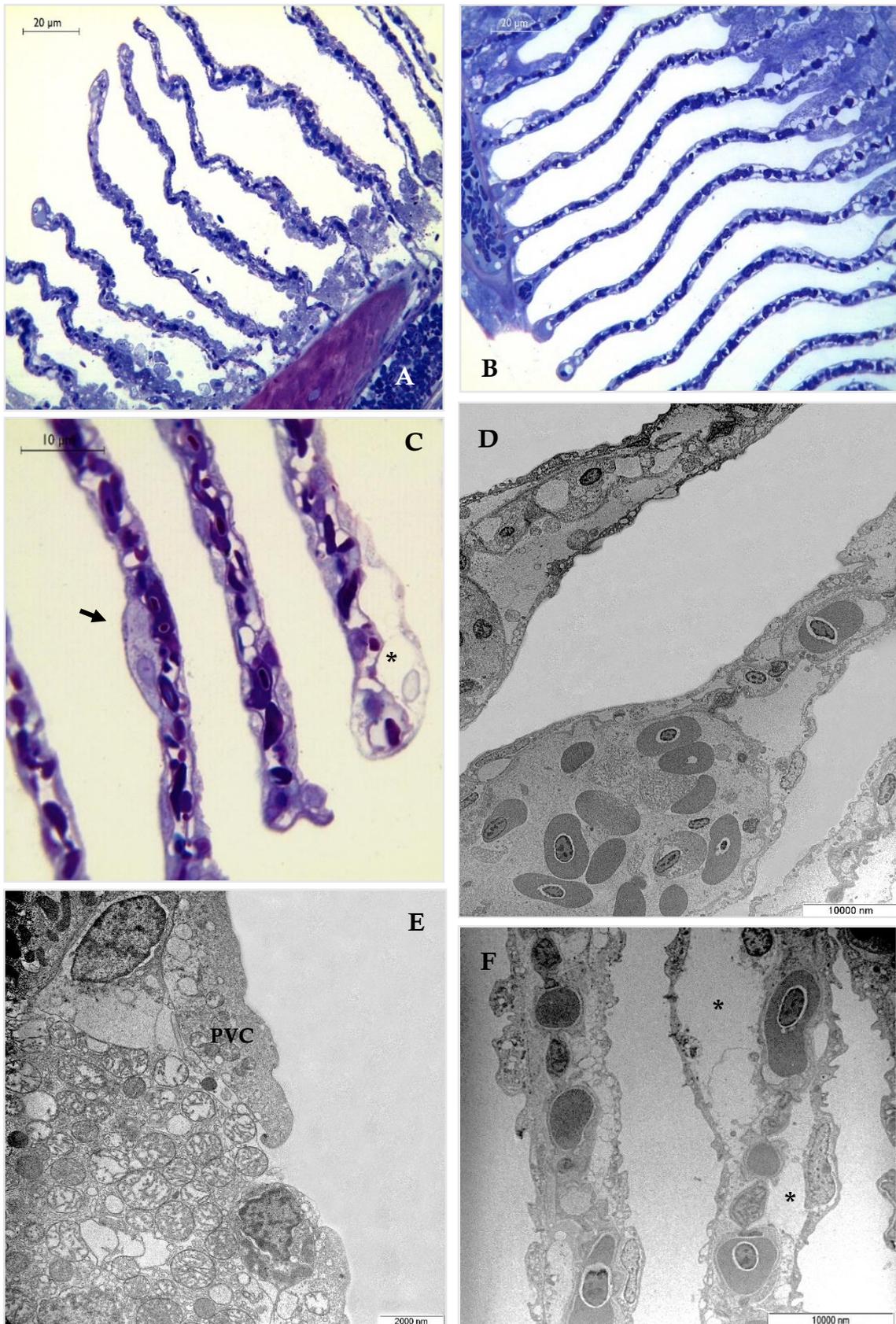
Thalassoma pavo - Tavola 19
 96 ore di esposizione a 3.5 µg/L di CPF



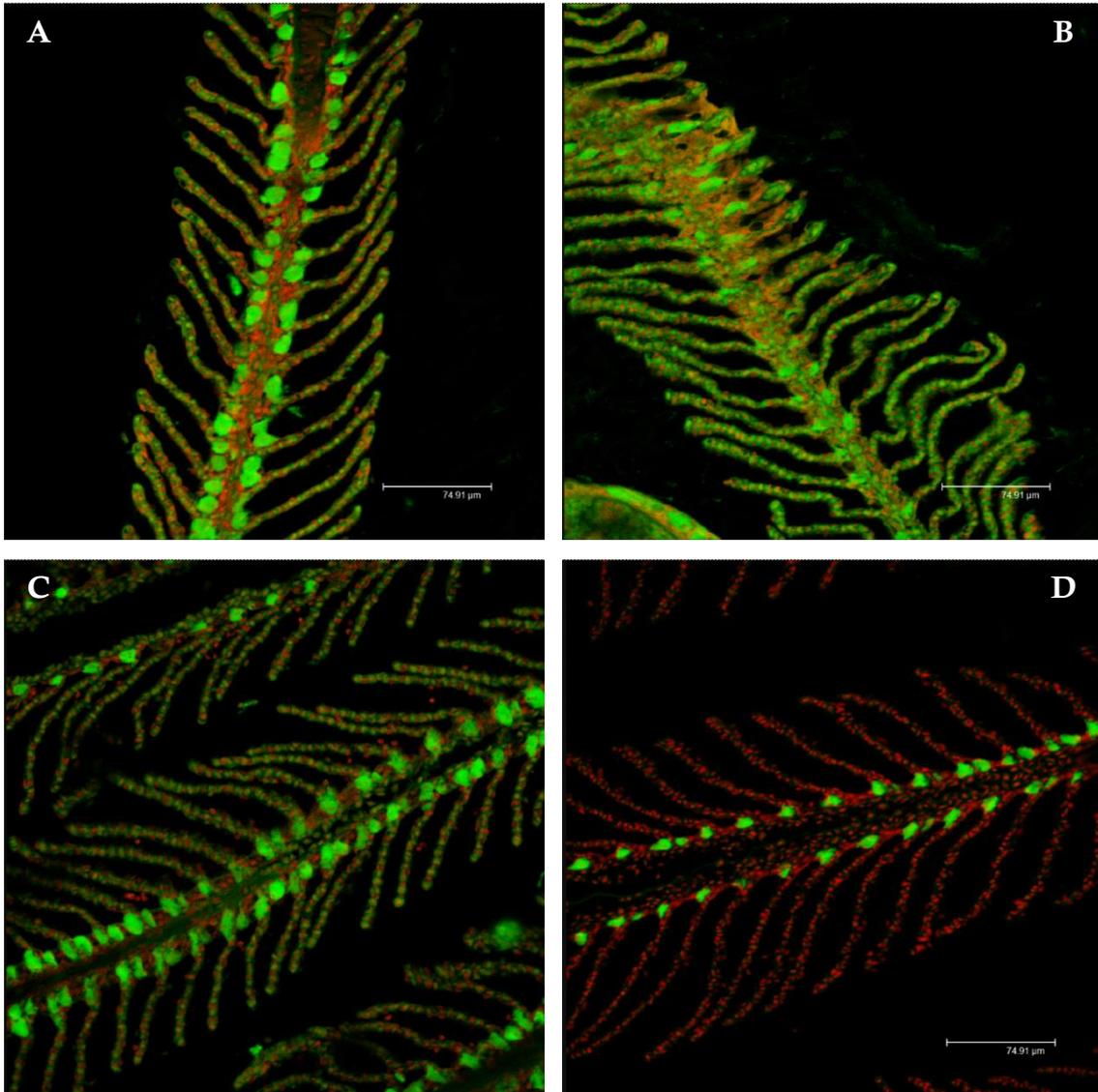
Thalassoma pavo - Tavola 20
48 ore di esposizione a 7 µg/L di CPF



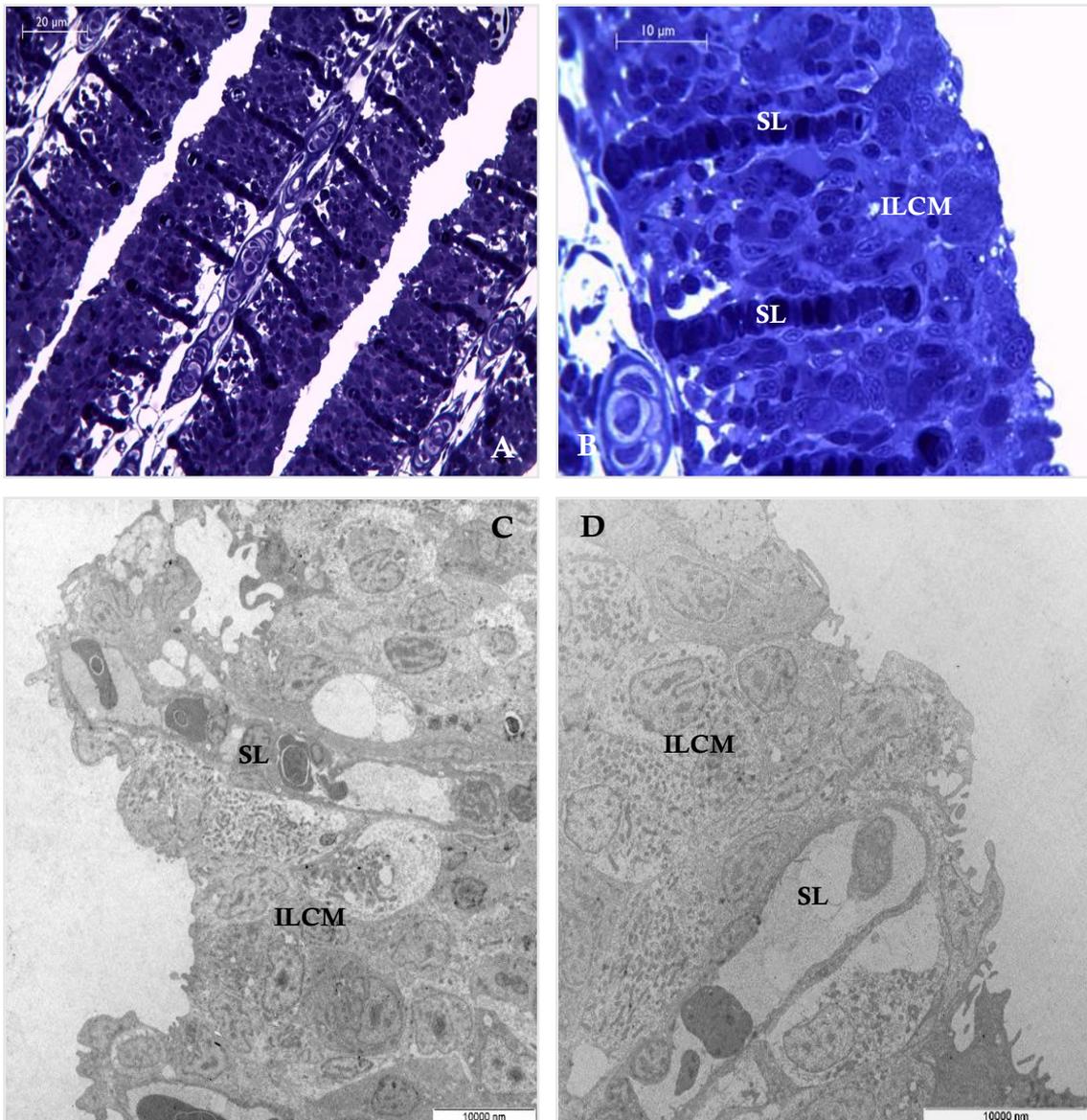
Thalassoma pavo - Tavola 21
96 ore di esposizione a 7 µg/L di CPF



Thalassoma pavo - Tavola 22
 Espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi
 dopo esposizione a CPF

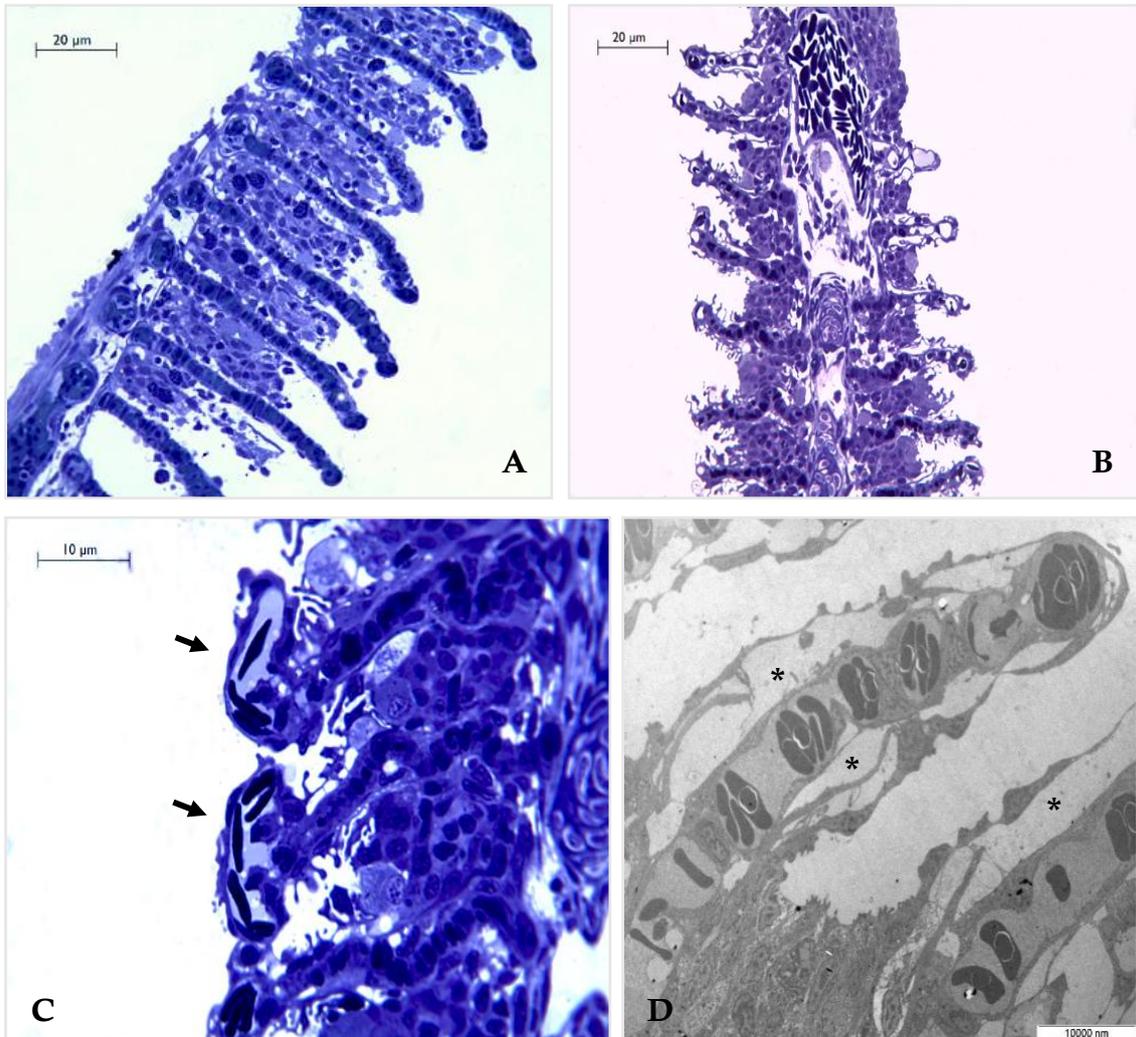


Carassius auratus - Tavola 23
Esemplari di controllo

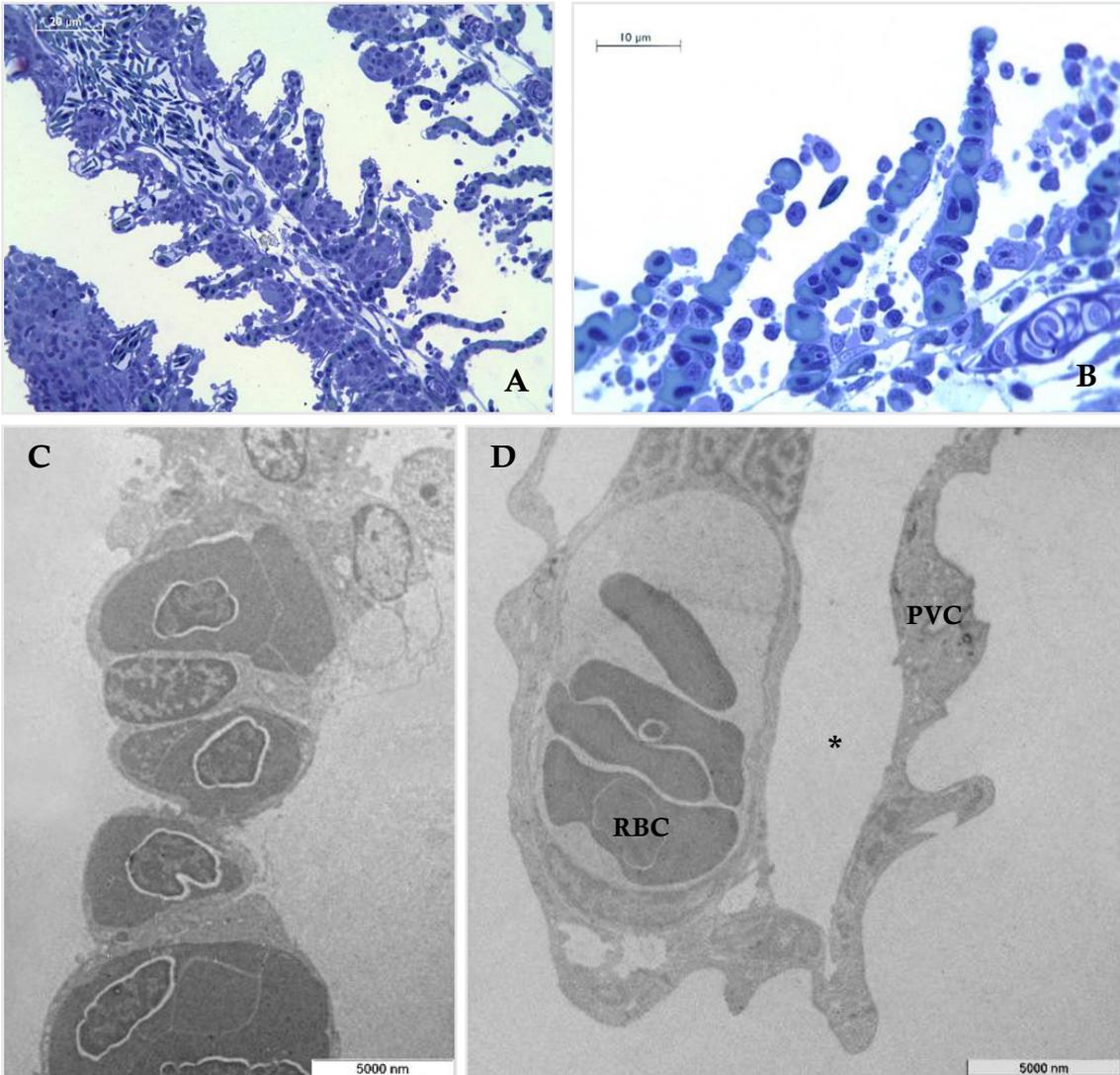


Carassius auratus - Tavola 24

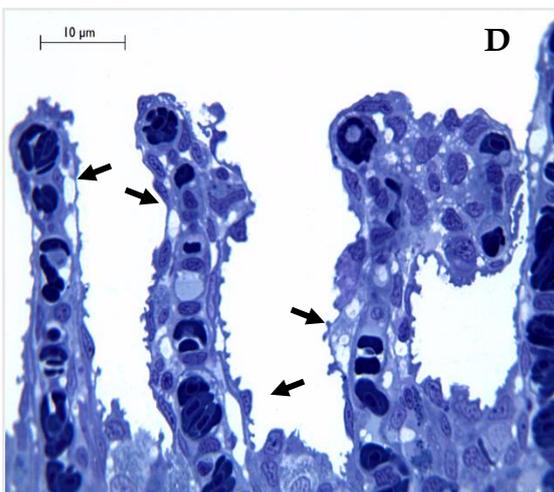
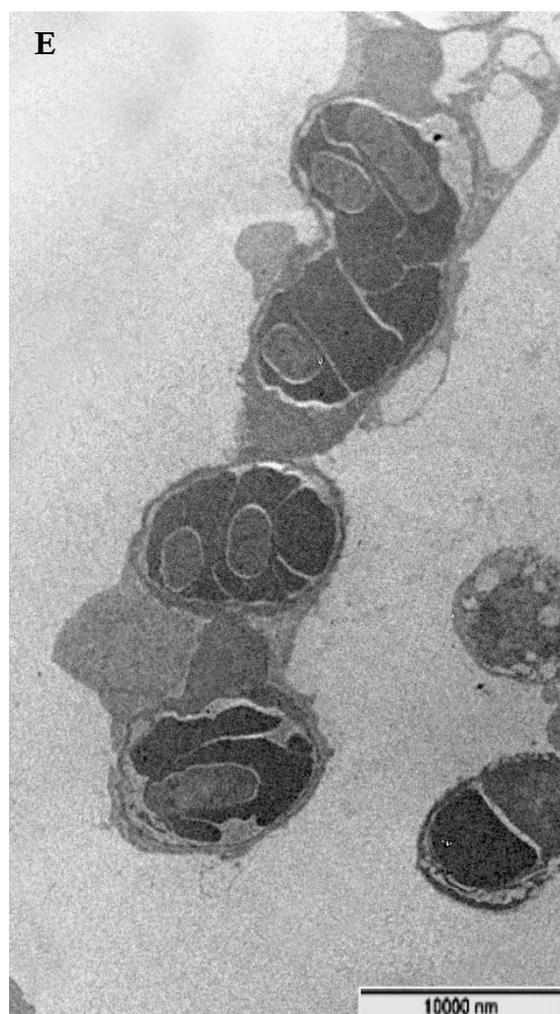
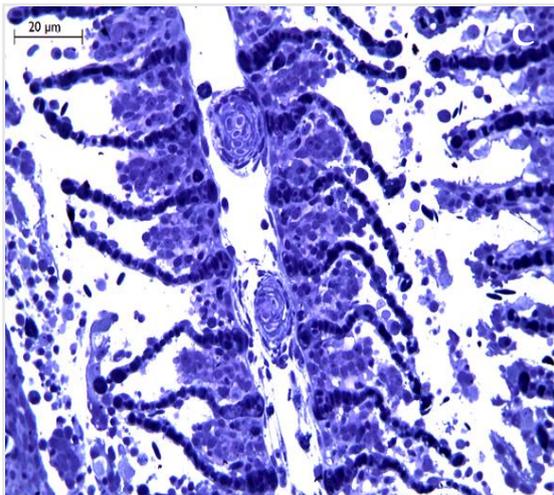
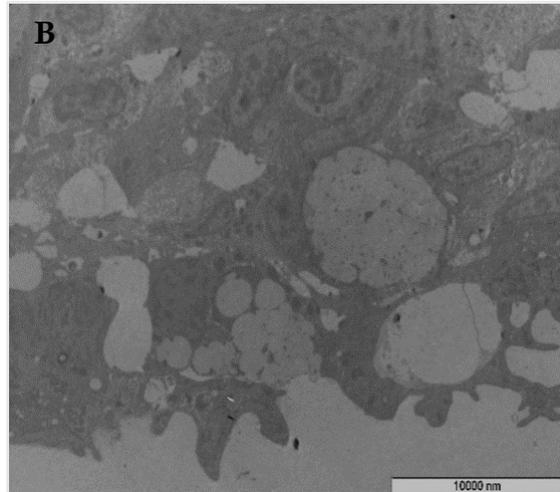
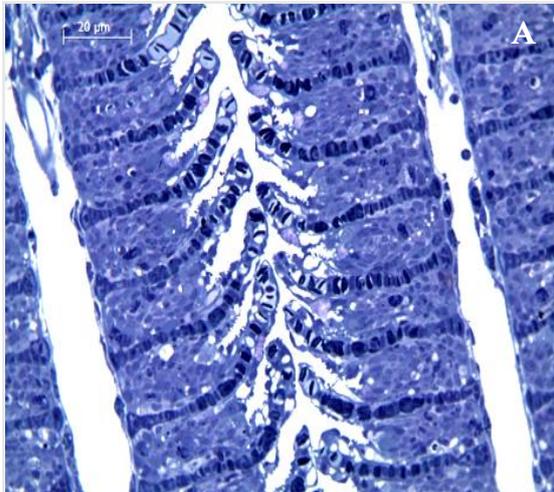
96 ore di esposizione a 1 e 4 $\mu\text{g/L}$ di CPF



Carassius auratus - Tavola 25
96 ore di esposizione a 8 µg/L di CPF

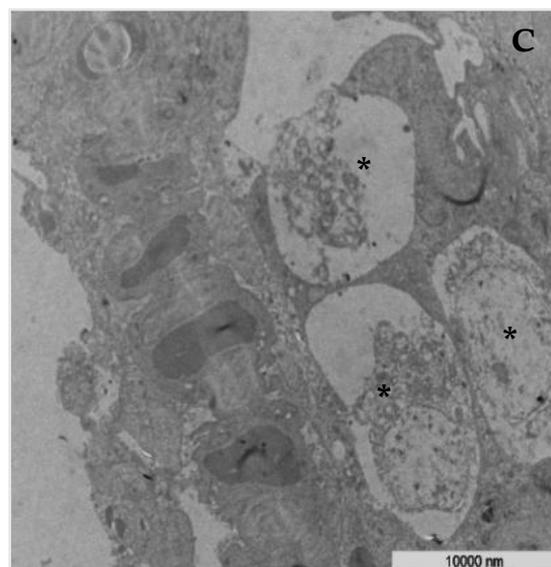
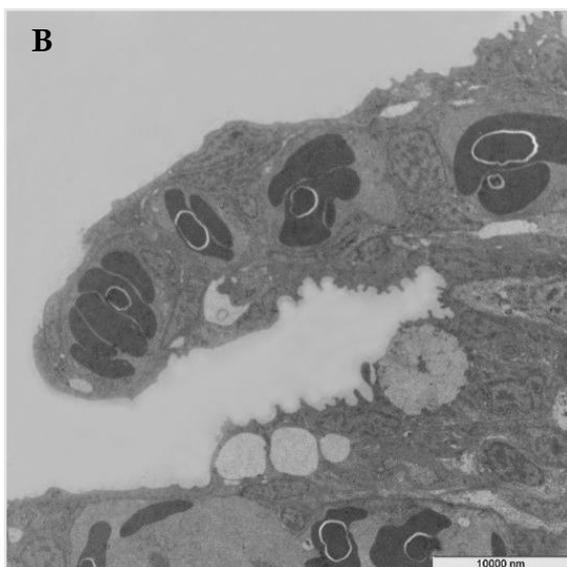
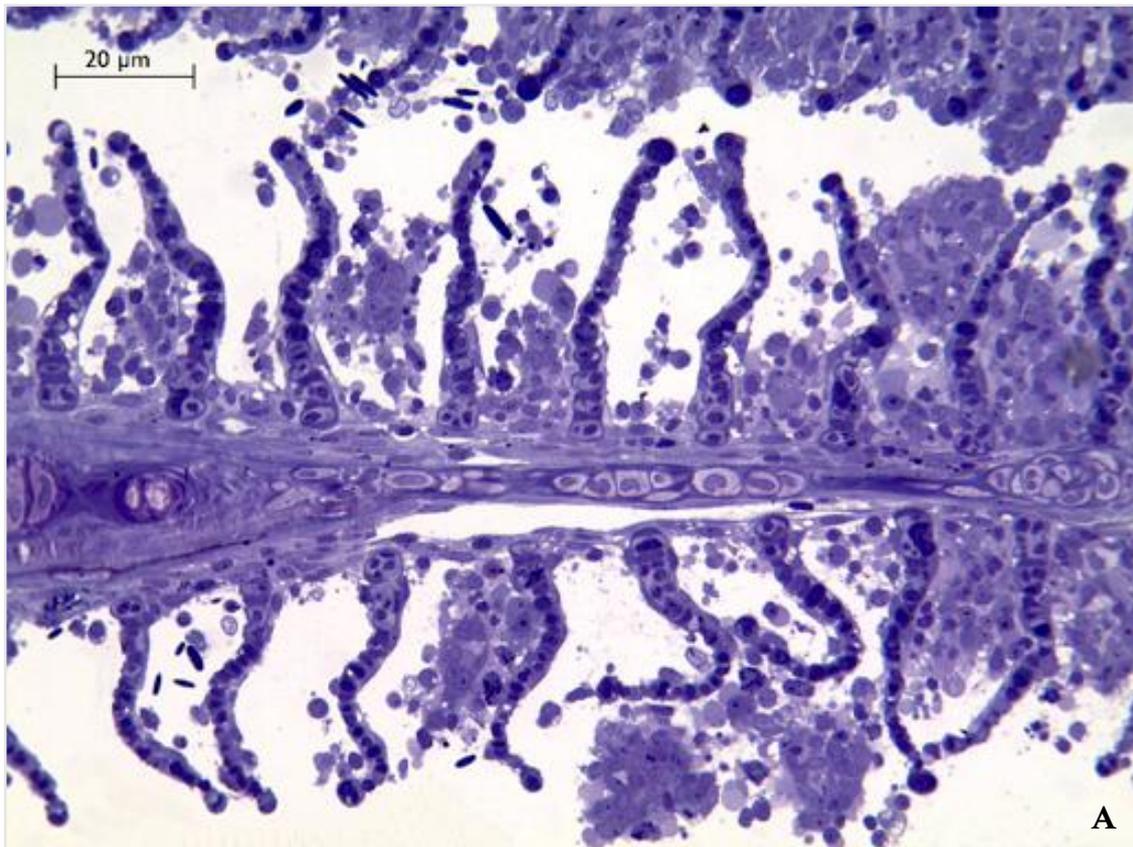


Carassius auratus - Tavola 26
 Periodo di recupero (7 giorni) dopo esposizione a
 1 e 4 $\mu\text{g}/\text{L}$ di CPF

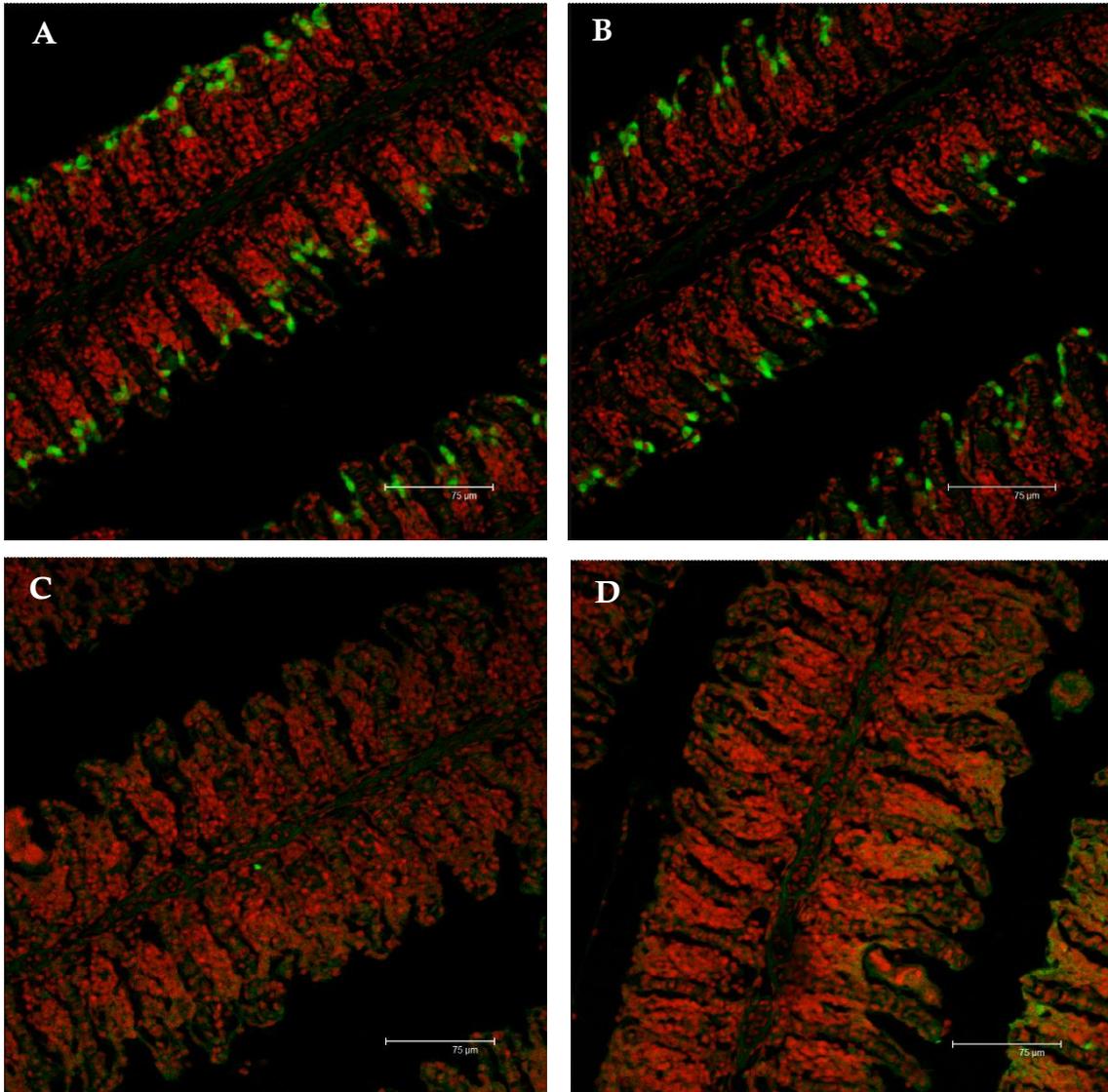


Carassius auratus - Tavola 27

Periodo di recupero (7 giorni) dopo esposizione
8 µg/L di CPF

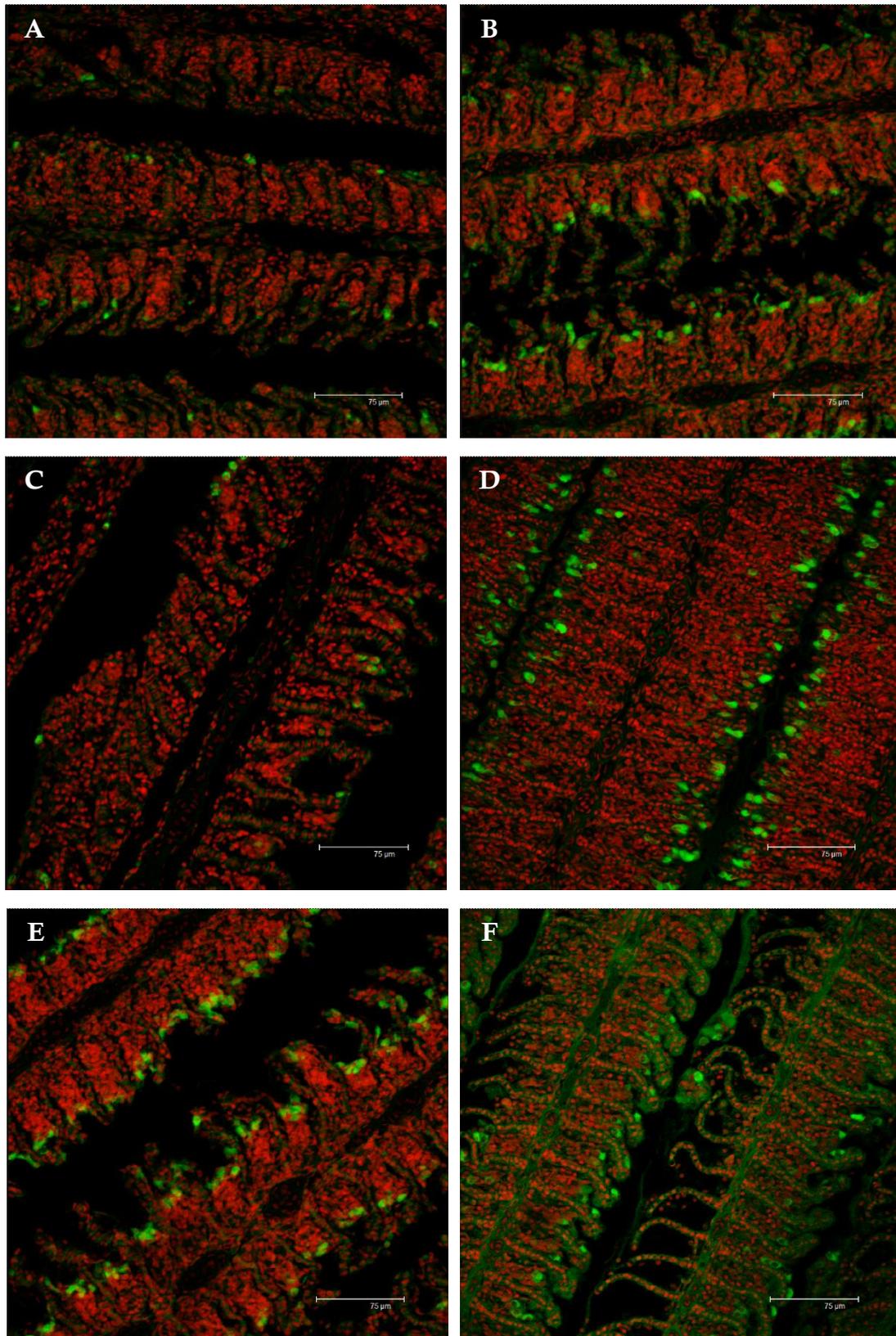


Carassius auratus - Tavola 28:
Esemplari di controllo
Espressione di Na⁺/K⁺-ATPasi e iNOS



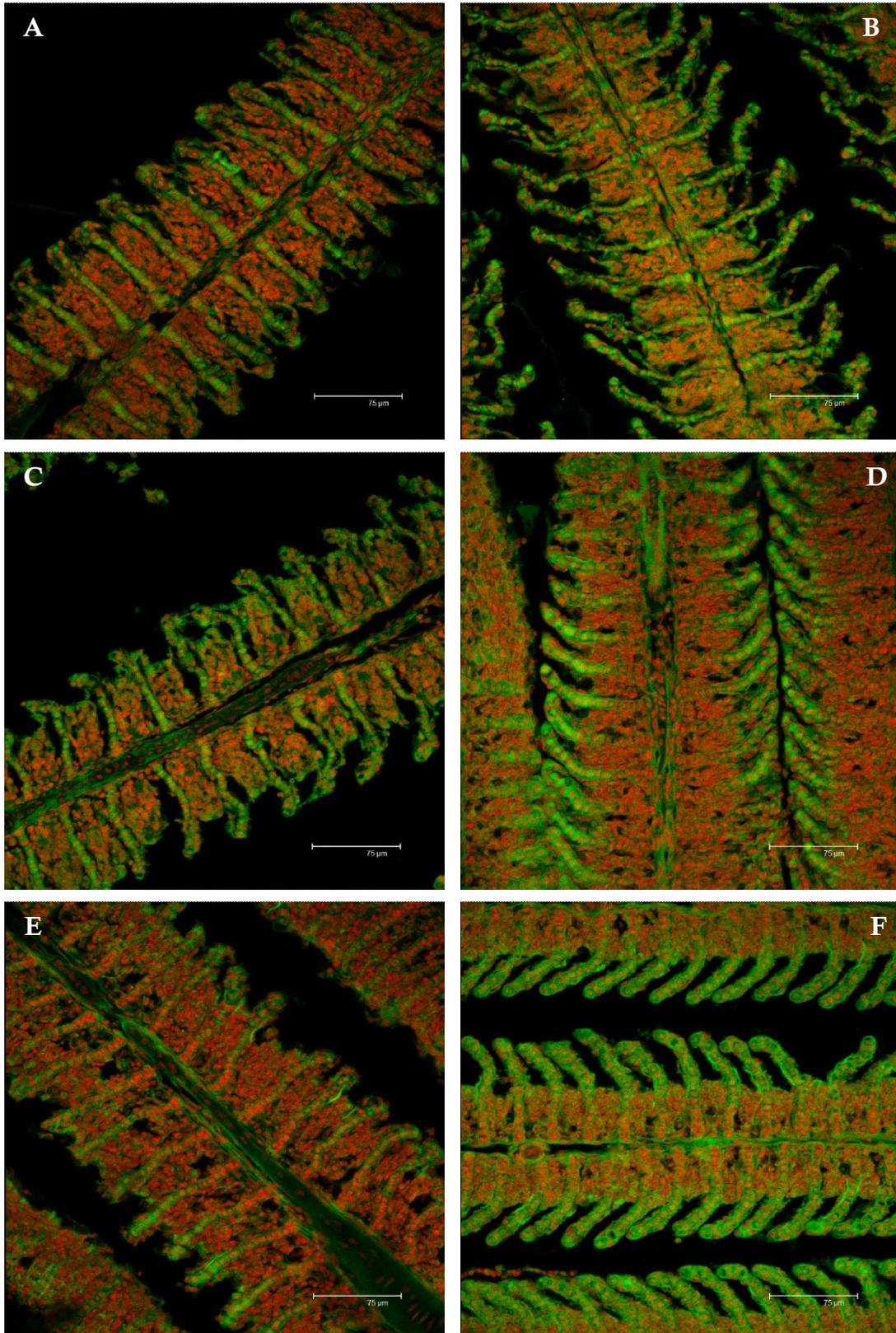
Carassius auratus - Tavola 29

Espressione Na⁺/K⁺-ATPasi dopo esposizione (96 h) a CPF e post esposizione (7 giorni)



Carassius auratus - Tavola 30

Espressione dell'iNOS dopo esposizione (96 h) a CPF e post esposizione (7 giorni)



LEGENDA

- Tav. 1. Figg. A-F.** Esempari di controllo di *T. pavo*: **A-B.** Sezioni trasversali dell'apparato branchiale (HP = colorazione tricromica secondo Humphrey e Pittman) osservate al MO; è visibile la struttura composta da filamento principale da cui dipartono le SL=lamelle secondarie. **C-D.** Ultrastruttura dell'epitelio primario composto da PVC= cellula pavimentosa, dotata di microvilli; BC= cellula basale, GB=goblet cell; CC= chloride cell. **C.** Immagine al TEM di una GC in cui sono evidenti i granuli di muco all'interno del citoplasma. **D.** Particolare di una CC, caratterizzata dalla presenza di un elevato numero di mitocondri all'interno del citoplasma. **E.** Ultrastruttura dell'epitelio secondario composto da PVC e BC. Nel vaso sanguigno è presente un RBC= globulo rosso.
- Tav. 2. Figg. A-D.** Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 48h di esposizione a 800 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A.** Sezione trasversale delle branchie (HP) osservate al MO. Sono evidenti l'andamento irregolare della struttura e la presenza di aneurismi all'apice delle lamelle (freccie). **B-D.** Ultrastruttura dell'epitelio branchiale in cui è possibile vedere che l'organizzazione cellulare è mantenuta.
- Tav. 3. Figg. A-B.** Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 96h di esposizione a 800 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** Sezioni trasversali dell'apparato branchiale (HP) osservate al MO, **A.** Si può notare che l'epitelio appare assottigliato e la presenza di aneurismi all'apice delle lamelle (freccie). **B.** Particolare in cui si nota la presenza di iperplasia a livello delle lamelle secondarie e ipertrofia del filamento principale (testa di freccia).
Figg. C-D. Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 192h di esposizione a 800 µg/L di Pb(NO₃)₂. **C.** Immagine al MO (HP) in cui si osserva la presenza di aree ipertrofiche (teste di freccia), distacco dell'epitelio secondario dalla componente basale (lifting) (*) e grandi aneurismi all'apice delle lamelle (freccie). **D.** Ultrastruttura delle lamelle secondarie, in cui è visibile degenerazione delle componenti cellulari e lifting (*).
- Tav. 4. Figg. A-D.** Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 48h di esposizione a 2000 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** Sezioni trasversali delle branchie (HP) osservate al MO che rilevano presenza di aneurismi apicali (freccie) e lifting (*) a livello lamellare. **C-D.** Ultrastruttura delle branchie. **D.** Degenerazione delle CC a livello del filamento principale. **D.** Le lamelle secondarie appaiono irregolari per la presenza di lunghi processi che dipartono dalle PVC, in aggiunta sono evidenti fenomeni di lifting (*).
- Tav. 5. Figg. A-B.** Sezioni trasversali dell'apparato branchiale di *T. pavo* dopo 96h di esposizione a 2000 µg/L di Pb(NO₃)₂ (HP) osservate al MO. **A.** Immagine in cui si vedono ampie regioni iperplastiche (teste di freccia) e aneurismi lamellari (freccie). **B.** Particolare dell'epitelio principale in cui si osserva iperplasia delle CC (*).
Figg. C-E. Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 192h di esposizione a 2000 µg/L di Pb(NO₃)₂. **C.** Sezione trasversale della branchia (HP) osservata al MO in cui l'epitelio appare estremamente assottigliato, si notano l'iperplasia delle CC nel filamento principale (teste di freccia) e la presenza di aneurismi lamellari (freccie). **D-E.** Ultrastruttura delle lamelle. **D.** Immagine al TEM in cui si nota l'estremo

assottigliamento delle PCV e la completa scomparsa delle BC in alcuni punti. **E.** Particolare di una lamella in cui è visibile la degenerazione a carico delle BC e delle PVC.

Tav. 6. Figg. A-D. Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 48h di esposizione a 12000 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** Sezioni trasversali delle branchia (HP) osservate al MO. **A.** Immagine in cui si nota che le scarse lamelle che compongono la branchia appaiono estremamente iperplastiche (freccie). **B.** Nelle lamelle è evidente la presenza di lifting dell'epitelio secondario (teste di freccie), mentre la componente vasale risulta compromessa. **C-D.** Ultrastruttura delle lamelle in cui si notano la presenza di spazi cellulari (*) ed intensi fenomeni degenerativi a carico di tutte le componenti cellulari lamellari.

Tav. 7. Figg. A-B. Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 96h di esposizione a 12000 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A.** Sezione trasversale della branchia (HP) osservate al MO in cui sono evidenti numerose aree di iperplasia (teste di freccia), lifting (*) e aneurismi all'apice delle lamelle (freccie). **B.** Ultrastruttura delle lamelle, in cui si notano che le BC e le PVC appaiono estremamente alterate a scapito della componente vascolare.

Figg. C-D. Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 192h di esposizione a 12000 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A.** Sezione trasversale della branchia (HP) osservate al MO che mostra ampie aree di iperplasia a carico del filamento principale (teste di freccia), mentre la componente vascolare delle lamelle secondarie appare seriamente compromessa a causa della completa degenerazione delle BC. **D.** Ultrastruttura del filamento principale dove è visibile un marcato stato degenerativo di tutte le componenti cellulari.

Tav. 8. Figg. A-E. Espressione delle proteine target negli esemplari di controllo di *T. pavo*. **A-B.** Espressione della pompa Na⁺/K⁺-ATPasi nell'apparato branchiale di *T. pavo*. La fluorescenza rivela aree immunoreattive nelle regioni interlamellari del filamento primario a livello delle CC.

C-D. Espressione dell'acquaporina 3 (AQP-3) nell'apparato branchiale di *T. pavo*. Il segnale evidenzia regioni immunopositive a livello delle regioni interlamellari sul filamento primario in corrispondenza delle CC.

E-F. Espressione delle metallotioneine (MTs) nell'apparato branchiale di *T. pavo*. Non viene riscontrata l'espressione della proteina in condizioni basali.

Tav. 9. Figg. A-F. Espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi nelle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 800 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** Dopo 48h di esposizione la proteina mantiene livelli d'espressione paragonabili al gruppo di controllo. **C-D.** In seguito a 96h di trattamento si nota un leggero calo dell'immunomarcatura relativa alla proteina. **E-F.** Dopo 192h di esposizione l'espressione della proteina subisce un ulteriore calo.

Tav. 10. Figg. A-F. Espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi nelle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 2000 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** Già dopo 48h di esposizione al metallo pesante si osserva una diminuzione del pattern di espressione della proteina rispetto a quanto si osserva negli esemplari di controllo. **C-D.** Dopo 96h ore l'immunomarcatura continua a mantenersi a livelli bassi. **E-F.** Al termine delle 192h di esposizione i livelli di espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi sono paragonabili a quanto osservato precedentemente.

- Tav. 11. Figg. A-F.** Espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi nelle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 12000 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** Dopo 48h di trattamento la proteina mantiene livelli di espressione comparabili al gruppo di controllo. **C-D.** L'immunofluorescenza, dopo 96h di esposizione, è molto scarsa; nel filamento principale, infatti, l'espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi è quasi assente. **E-F.** Dopo 192h di esposizione al metallo pesante si osserva, nuovamente, una lieve espressione della proteina localizzata a livello delle CC.
- Tav. 12. Figg. A-F.** Espressione della AQP-3 nelle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 800 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** Dopo 48h il pattern di espressione della AQP-3 risulta invariato e comparabile a quanto osservato negli esemplari di controllo. **C-D.** Si osserva una leggera diminuzione dell'immunomarcatura dopo 96h di trattamento. **E-F.** Dopo 192 di esposizione al metallo pesante si osserva un ulteriore calo dell'espressione dell'AQP-3.
- Tav. 13. Figg. A-F.** Espressione della AQP-3 nelle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 2000 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** Dopo 48h di esposizione il segnale immunofluorescente relativo alla proteina risulta diminuito rispetto al gruppo di controllo. **C-D.** L'AQP-3, dopo 96h di trattamento, mantiene bassi livelli di espressione comparabili a quelli osservati precedentemente. **E-F.** Al termine delle 192h di trattamento si può osservare un lieve incremento dell'espressione della proteina.
- Tav. 14. Figg. A-F.** Espressione della AQP-3 nelle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 12000 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** Dopo 48h piombo il pattern di espressione della proteina AQP-3 si mantiene paragonabile a quello osservato negli esemplari di controllo. **C-D.** Dopo 96 ore, invece, le regioni immunoreattive sono scarsissime: è possibile notare limitate regioni fluorescenti in corrispondenza delle cellule accessorie. **E-F.** Dopo 192h di esposizione al metallo, l'espressione della proteina si osserva, nuovamente, e coinvolge le chloride cells.
- Tav. 15. Figg. A-F.** Espressione della MTs nelle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 800 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** Dopo 48h di esposizione al metallo è già possibile osservare un incremento dell'immunoreattività relativa alla proteina soprattutto nelle regioni interlamellari. **C-D.** Dopo 96 ore, il pattern di espressione è rilevabile anche a livello delle lamelle secondarie. **E-F.** Al termine delle 192 ore di esposizione, l'espressione delle MT è ancora più intensa, e coinvolge sia nell'epitelio primario che in quello secondario
- Tav. 16. Figg. A-F.** Espressione della MTs nelle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 2000 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** Dopo 48h di esposizione al metallo l'espressione delle MTs coinvolge tutto il tessuto branchiale. **C-D.** Dopo 96h l'espressione della proteina si mantiene ancora elevata, come osservato nel precedente trattamento. **E-F.** Al termine delle 192h l'immunofluorescenza è ben evidente sia a livello del filamento principale che delle lamelle secondarie.
- Tav. 17. Figg. A-F.** Espressione della MTs nelle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a 12000 µg/L di Pb(NO₃)₂. **A-B.** L'espressione delle MTs è evidente in tutto il tessuto branchiale dopo 48h di esposizione al metallo **C-D.** Dopo 96h si nota ancora un'intensa immunofluorescenza proveniente sia dal filamento principale che dalle lamelle secondarie. **E-F.** Al termine delle 192 ore il segnale si mantiene molto intenso ed è possibile notare che la proteina è espressa in maniera più marcata nelle aree che presentano maggiore danno strutturale.

- Tav. 18. Figg. A-D.** Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 48h di esposizione a 3.5 µg/L di CPF. **A-C.** Sezioni trasversali dell'apparato branchiale (HP) osservate al MO. **A.** In questa immagine è visibile ampie aree iperplastiche a livello del filamento principale (testa di freccia) e la fusione delle lamelle adiacenti (freccia). **B.** A maggiore ingrandimento è possibile notare l'incremento di volume delle CC. **C.** Le lamelle sono interessate da marcato lifting della componente epiteliale (*). **D.** Immagine al TEM che evidenzia la formazione di emboli nell'estremità distale delle lamelle.
- Tav. 19. Figg. A-D.** Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 96h di esposizione a 3.5 µg/L di CPF. **A-B.** Sezioni trasversali dell'apparato branchiale (HP) osservate al MO. **A.** In questa immagine è possibile notare aree estremamente danneggiate disorganizzate (*) e la presenza di aneurismi all'apice delle lamelle (frecce). **B.** Particolare del filamento principe che evidenzia l'incremento di volume delle CC. **C-D.** Ultrastruttura delle lamelle in cui si notano marcati processi degenerativi a carico di tutte le componenti cellulari.
- Tav. 20. Figg. A-G.** Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 48h di esposizione a 7 µg/L di CPF. **A-C.** Sezioni trasversali dell'apparato branchiale (HP) osservate al MO. **A.** In questa immagine si notano ampi distaccamenti dell'epitelio sia nelle lamelle principali che nelle secondarie (*). **B.** Particolare delle lamelle secondarie in cui è evidente che la componente vascolare è seriamente compromessa a causa della completa degenerazione delle cellule basali. **C.** In questa sezione è possibile notare che le CC si collocano lungo i margini inferiori delle lamelle secondarie. **D-G.** ultrastruttura delle lamelle secondarie. **D.** Al TEM è confermata la localizzazione delle CC lungo i margini inferiori delle lamelle secondarie. **E-G.** Sia le BC che le PVC che compongono le lamelle sono interessate da evidenti fenomeni degenerativi.
- Tav. 21. Figg. A-F.** Apparato branchiale di *T. pavo* dopo 96h di esposizione a 7 µg/L di CPF. **A-C.** Sezioni trasversali dell'apparato branchiale (HP) osservate al MO. **A.** In questa sezione si nota che in seguito ad esposizione al pesticida l'intera struttura branchiale assume un andamento estremamente irregolare. **B.** Particolare che evidenzia la fusione di lamelle collocate su filamenti principali adiacenti. **C.** Particolare delle lamelle secondarie in cui sono evidenziati processi degenerativi a carico delle PVC (frecce) e il lifting epiteliale (*). **D-F.** Ultrastruttura dell'apparato branchiale. **D.** In questa immagine al TEM si osserva la presenza di aneurismi all'apice delle lamelle. **E.** Particolare del filamento principale in cui è possibile notare marcati processi degenerativi a carico delle componenti cellulari. **F.** La degenerazione cellulare coinvolge anche le cellule delle lamelle secondarie. Sono evidenti ampi spazi cellulari sia nelle BC che nelle PVC.
- Tav. 22. Figg. A-D.** Espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi nelle branchie di *T. pavo* dopo esposizione a CPF. **A.** Espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi dopo esposizione per 48 ore a 3.5 µg/L di CPF. L'espressione della proteina appare maggiore rispetto al gruppo di controllo ed evidenzia l'ampio corpo cellulare delle CC lungo i margini interlamellari sul filamento principale. **B.** Espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi dopo 96 ore di esposizione a 3.5 µg/L di CPF. Il segnale appare meno intenso rispetto al trattamento precedente, ma comunque più intenso rispetto al gruppo di controllo. **C.** Espressione della

Na⁺/K⁺-ATPasi dopo esposizione per 48 ore a 7 µg/L di pesticida. Il pattern di espressione si manifesta molto intenso dopo il tempo più breve di trattamento. **D.** L'espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi dopo esposizione per 96 ore a 7 µg/L di pesticida appare, anche in questo caso, è meno intensa rispetto agli esemplari esposti alla stessa concentrazione per 48h, ma più marcata rispetto gruppo mantenuto in condizioni basali.

Tav. 23. Figg. A-D. Esemplari di controllo di *C. auratus*: **A-B.** Sezioni trasversali dell'apparato branchiale (Tol = colorazione con blu di toluidina) osservate al MO; è visibile la struttura composta da filamento principale da cui dipartono le SL=lamelle secondarie. Le SL risultano coperte dall' ILCM=Interlamellar Cell Mass (ILCM). **C-D.** Ultrastruttura dell'apparato branchiale. In cui si notano le SL coperte dall'ILCM.

Tav. 24. Figg. A. Sezione trasversale (Tol) delle branchie di *C. auratus* dopo 96h di esposizione a 1 µg/L di CPF. L'organizzazione tissutale viene mantenuta, è possibile notare solo un lieve decremento dell'ILCM.

Figg. B-D. Apparato branchiale di *C. auratus* dopo 96h di esposizione a 4 µg/L di CPF. **B-C.** Sezioni istologiche osservate (Tol) al MO. **B.** In questa immagine si nota una diminuzione più marcata dell'ILCM. **C.** Particolare che evidenzia la presenza di aneurismi all'apice delle lamelle. **D.** Ultrastruttura delle lamelle in cui è visibile il distacco dell'epitelio secondario dalla componente vasale sottostante (*).

Tav. 25. Figg. A-D. Apparato branchiale di *C. auratus* dopo 96h di esposizione a 8 µg/L di CPF. **A-B.** Sezioni istologiche osservate (Tol) al MO, in cui si osserva la scarsa presenza dell'ILCM. **B.** Particolare che evidenzia l'assenza totale dell'ILCM in alcuni punti lungo le lamelle principali. **C-D.** Ultrastruttura delle lamelle. **C.** In seguito a trattamento con pesticida l'epitelio lamellare appare estremamente assottigliato. **D.** Particolarità in cui è visibile il distacco epiteliale della componente vasale sottostante (*).

Tav. 26. Figg. A-B. Apparato branchiale di *C. auratus* dopo esposizione a 1 µg/L di CPF e 7 giorni di recupero. **A.** Sezione trasversale dell'apparato branchiale (Tol) osservata al MO. Si nota l'andamento regolare della struttura. **B.** Ultrastruttura dell'ILCM in cui la componente cellulare appare ben organizzata.

Figg. C-E. Apparato branchiale di *C. auratus* dopo esposizione a 4 µg/L di CPF e 7 giorni di recupero. **C.** Sezione trasversale dell'apparato branchiale (Tol) osservata al MO. È ancora visibile la scarsa presenza della componente cellulare dell'ILCM. **D.** Particolare delle lamelle (Tol) in cui sono evidenziati diversi punti di distacco dell'epitelio dalla componente vasale (freccie). **E.** Ultrastruttura delle lamelle che appaiono estremamente assottigliate.

Tav. 27. Figg. A-C. Apparato branchiale di *C. auratus* dopo esposizione a 8 µg/L di CPF e 7 giorni di recupero. **A.** Sezione trasversale dell'apparato branchiale (Tol) osservata al MO, in cui è ancora evidente in alcuni punti una marcata riduzione dell'ILCM. **B-C.** Ultrastruttura delle branchie. **B.** L'immagine al TEM mostra una lamella completamente non coperta dall'ILCM. **C.** Particolare dell'LCM in cui è ancora evidente degenerazione a carico delle

componenti cellulari, infatti molte cellule appaiono svuotate del loro contenuto (*).

Tav. 28. Figg. A-D. Espressione delle proteine target negli esemplari di controllo di *C. auratus*. **A-B.** Espressione della pompa Na^+/K^+ -ATPasi nell'apparato branchiale si riscontra a livello delle CC nella parte apicale dell'ILCM.

C-D. Espressione dell'iNOS nell'apparato branchiale di *C. auratus*. Tale proteina non viene espressa in condizioni basali.

Tav. 29. Figg. A-C. Espressione Na^+/K^+ -ATPasi dopo 96h di esposizione a CPF e dopo 7 giorni di post esposizione.

A. Espressione della Na^+/K^+ -ATPasi nell'apparato branchiale dopo esposizione a 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ di CPF. L'immunofluorescenza osservata appare di minore intensità soprattutto nelle regioni dove il danno strutturale a carico dell'ILCM è più intenso.

B. Espressione della Na^+/K^+ -ATPasi nell'apparato branchiale dopo esposizione a 4 $\mu\text{g}/\text{L}$ di CPF. È possibile ancora notare l'espressione della proteina, ma l'intensità è minore rispetto agli esemplari mantenuti in condizioni basali.

C. Espressione della Na^+/K^+ -ATPasi nell'apparato branchiale dopo esposizione a 8 $\mu\text{g}/\text{L}$ di CPF. L'espressione della proteina è marcatamente diminuita, parallelamente alla presenza di danni strutturali.

Figg. D-F. Espressione Na^+/K^+ -ATPasi dopo 96h di esposizione a CPF e dopo 7 giorni di post esposizione.

D. Espressione della Na^+/K^+ -ATPasi nell'apparato branchiale dopo esposizione a 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ e dopo recupero in acqua priva di pesticida. La proteina ritorna visibile in maniera intensa negli strati apicali dell'ILCM. **E.** Espressione della Na^+/K^+ -ATPasi nell'apparato branchiale dopo esposizione a 4 $\mu\text{g}/\text{L}$ e dopo recupero in acqua priva di pesticida. Si può notare che l'immunofluorescenza è comparabile con gli esemplari di controllo. **F.** Espressione della Na^+/K^+ -ATPasi nell'apparato branchiale dopo esposizione a 8 $\mu\text{g}/\text{L}$ e dopo recupero in acqua priva di pesticida. L'espressione della Na^+/K^+ -ATPasi risulta aumentata rispetto al periodo di sola esposizione, ma nelle regioni ancora danneggiate la proteina non viene espressa.

Tav. 29. Figg. A-C. Espressione iNOS dopo 96h di esposizione a CPF. **A.** Espressione della iNOS nell'apparato branchiale dopo esposizione a 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ di CPF. Si osserva che un segnale immunofluorescenza intenso localizzato, soprattutto, a livello delle lamelle. **B.** Espressione della iNOS nell'apparato branchiale dopo esposizione a 4 $\mu\text{g}/\text{L}$ di CPF. L'espressione è più uniforme e coinvolge anche la regione interlamellare. **C.** Espressione della iNOS nell'apparato branchiale dopo esposizione a 8 $\mu\text{g}/\text{L}$ di CPF. Si osserva che l'espressione della proteina simile al precedente trattamento.

Figg. D-C. Espressione iNOS dopo 96h di esposizione a CPF e dopo 7 giorni di post esposizione. **D.** Espressione della iNOS nell'apparato branchiale dopo esposizione a 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ e dopo recupero in acqua priva di pesticida. L'espressione della proteina è aumentata rispetto alla sola esposizione a pesticida sia a livello lamellare che nella regione interlamellare. **E.** Espressione della iNOS nell'apparato branchiale dopo esposizione a 4 $\mu\text{g}/\text{L}$ e dopo recupero in acqua priva di pesticida. L'immunofluorescenza è localizzata, anche in questo caso, in tutto l'epitelio branchiale. **F.** Espressione della iNOS nell'apparato branchiale dopo esposizione a 8 $\mu\text{g}/\text{L}$ e dopo recupero in acqua priva di pesticida. L'immunolocalizzazione della iNOS è sempre molto elevata ed è coinvolge tutto il tessuto branchiale.

Capitolo 6

Discussioni

L'apparato branchiale dei pesci è un organo complesso deputato allo svolgimento di molteplici funzioni. Oltre ad essere la sede degli scambi gassosi, infatti, le branchie giocano un ruolo fondamentale nell'osmoregolazione, nell'escrezione, nel bilancio idrico e ionico (Laurent, 1984; Evans et al., 1999). Le branchie, inoltre, sono continuamente esposte al mezzo acquatico e sono uno dei principali bersagli di diverse classi di inquinanti (Van den Heuvel et al., 2000; Fernandes & Mazon 2003; Fernandes et al., 2007). È noto che le alterazioni a carico dell'apparato branchiale possono essere utili come biomarker di esposizione in risposta a contaminanti ambientali (Das & Mukherjee, 2000; Machado & Fanta, 2003); pertanto la combinazione di analisi morfologiche e funzionali dell'apparato branchiale offre un solido approccio nel valutare le risposte causate dalla presenza nel mezzo acquatico di particolari inquinanti (Mallat, 1985; Fernandes et al., 2008).

6.1. Tossicità del piombo

In letteratura esistono diverse ricerche riguardanti il piombo e la sua tossicità nei pesci e molte di queste hanno avuto lo scopo di determinare la concentrazione letale media in diverse specie di teleostei (Tab.6.1). Tuttavia, la maggior parte dei dati bibliografici, si riferisce a specie di acqua dolce o salmastra, pertanto, le informazioni su pesci marini sono piuttosto limitate. Dallo studio dei dati emerge che i valori di concentrazione letale dopo 96 ore di esposizione (LC50-96h), sebbene siano sempre piuttosto elevati, risultano essere molto variabili. La disomogeneità dei valori di LC50 può essere legata a differenze nelle proprietà chimiche del mezzo acquatico utilizzato nella fase sperimentale, infatti la tossicità dei metalli, inoltre, varia in base alla durezza dell'acqua, infatti, l'effetto dei metalli

può essere maggiore in acque più povere di CaCO_3 (Carrol et al., 1979; Calamari et al., 1980; Pascoe et al., 1986).

Altri fattori che possono essere coinvolti nella diversa risposta al piombo, così come agli altri inquinanti, possono essere l'età degli animali, la loro taglia, nonché la diversa sensibilità specie-specifica (Garcia-Santos et al., 2005).

SPECIE		LC50 – 96h ($\mu\text{g/L}$)	AUTORI
<i>Prochilodus lineatus</i>	FW	95000	Martinez et al., 2004
<i>Catla catla</i>	FW	22380	
<i>Labeo rohita</i>	FW	32700	Javid et al., 2007
<i>Cirrhina mrigala</i>	FW	47000	
<i>Labeo rohita</i>	FW	6800	Latif et al., 2013
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	FW	246000	Nekoubin et al., 2012a
<i>Channa striata</i>	FW	925000	Devi & Banerjee, 2007
<i>Tinca tinca</i>	FW	300000	Shah & Altindag, 2005
<i>Cyprinus carpio</i>	FW	279557	Nekoubin et al., 2012b
<i>Cirrhinus mrigala</i>	FW	10400	Celine et al., 2014
<i>Rutilus rutilus</i>	FW	39800	Hedayati et al., 2014
<i>Carassius auratus</i>	FW	4800	Banaee et al., 2013
<i>Rutilus frisii</i>	FW/SW	268000	Gharedaash et al., 2012
<i>Mugil cephalus</i>	FW/SW	7130	Rajkumar, 2012

Tabella 6.1: Valori di LC50-96h relativi al piombo
FW – pesci di acqua dolce; FW/SW – pesci estuarini

6.1.1 Analisi morfologica degli effetti del piombo sulle branchie di *Thalassoma pavo*

Per quanto riguarda le osservazioni morfologiche ed ultrastrutturali è stato dimostrato che una esposizione a breve termine (192 ore) a concentrazioni sub-letali di piombo è in grado di indurre numerose e severe alterazioni a carico dell'apparato branchiale di *Thalassoma pavo* (Tab. 6.2).

<i>T. pavo</i>	800 µg/			2000 µg/L			12000 µg/L		
	48h	96h	192h	48h	96h	192h	48h	96h	192h
Curvatura fil. primario	+			+			++	++	++
Curvatura lamelle	++	+	++		++		++	+++	+++
Iperplasia		+	++		++	++	+++	+++	+++
Lifting epiteliale	+	++	+++	++	++	++	++	+++	+++
Alterazione chloride cells	+	+	++	+	++	++	++	+++	+++
Altri danni epiteliali	+	+	++	++	++	++	++	++	+++
Aneurismi	+	+	+++	+	++	++	+	++	++

Tabella 6.2: alterazioni osservate in *T. pavo* in seguito ad esposizione a $Pb(NO_3)_2$ + bassa frequenza; ++ media frequenza; +++ alta frequenza

L'intensità di questi fenomeni patologici appare strettamente correlata alla concentrazione dell'inquinante ed al tempo di esposizione. Dopo 48 ore di esposizione, già alla concentrazione più bassa, si evidenzia un lieve ripiegamento delle lamelle secondarie e la riduzione del loro spessore; si assiste inoltre ad ed alla formazione di aneurismi, con infiltrazione di eritrociti a livello delle estremità distali delle lamelle secondarie; a questo livello è inoltre possibile osservare aree di iperplasia. Con il progredire del tempo di esposizione, si assiste alla comparsa di processi di degenerazione cellulare, ipertrofia delle chloride cells e, a livello delle lamelle secondarie, ad alterazioni delle componente vascolare.

Risultati simili a quelli da noi osservati sono stati registrati anche in pesci di acqua dolce dopo esposizione a piombo (Parashar & Banerjee, 2002; Martinez et

al, 2004; Palaniappan et al., 2008; Khan et al., 2011). Tuttavia, anche altre sostanze inquinanti, tra cui altri metalli pesanti (Randi et al., 1996; Fernandes et al. 2007; Brunelli et al. 2011), composti organoclorurati (Altinok & Capkin, 2002) e idrocarburi policiclici aromatici (Au et al., 2004) sono in grado di indurre alterazioni simili a carico dell'apparato branchiale. In uno studio condotto su esemplari di *Channa punctata* trattati con miscele di diversi metalli, la maggior parte delle lesioni istopatologiche osservate nelle branchie si è rivelata aspecifica ovvero non esclusivamente dipendente dall'esposizione ad un solo tipo di metallo (Pandey et al., 2008); risulta difficile, quindi, individuare risposte specifiche indotte dal piombo sull'epitelio branchiale dei pesci. Mallatt (1985) ha descritto accuratamente le lesioni istopatologiche nelle branchie in seguito ad esposizione a diversi xenobionti suggerendo che non esiste una specificità tra metallo e alterazione; tra le alterazioni elencate, le più ricorrenti sono lifting o sollevamento epiteliale, necrosi, iperplasia, ipertrofia, la rottura dell'epitelio branchiale, bulbing o fusione delle lamelle, ipersecrezione e proliferazione di mucociti, cambiamenti nelle chloride cells e nella vascolarizzazione branchiale.

Le modificazioni istopatologiche da noi osservate in *Thalassoma pavo*, al di là della loro specificità, riflettono l'azione diretta del piombo e possono essere interpretate come una risposta di difesa a breve termine. Molte di queste alterazioni, infatti, tendono ad aumentare la distanza di diffusione, in modo che i contaminanti disciolti in acqua raggiungano il circolo sanguigno con più difficoltà (Mallat, 1985; Au et al., 2004; Martinez et al., 2004; Fasulo et al., 2011); in modo particolare il sollevamento epiteliale e l'iperplasia delle cellule epiteliali (Heath, 1987; Hinton et al., 1992; Randy et al., 1996). Lo spazio lasciato vuoto dal distacco dei tessuti branchiali viene riempito da un fluido composto da mielina e residui cellulari, che da un lato contrasta l'assorbimento del piombo, ma dall'altro rende inadeguato l'assorbimento dell'ossigeno (Parashar & Banerjee, 1999a).

L'iperplasia epiteliale che si osserva all'aumentare dei tempi di esposizione al piombo è spesso associata a intensi fenomeni di necrosi cellulare; tale fenomeno può essere attribuito all'azione diretta del piombo sulle membrane cellulari, poiché determina un aumento della fragilità del doppio strato fosfolipidico (Roncero et al., 1990).

L'incremento del volume delle chloride cells, insieme ad un aumento della

loro densità, è stato già osservato in pesci esposti a metalli e ad altri xenobionti (Wendelaar Bonga, 1993; Pelgrom et al., 1995; Parashar & Banerjee, 2002) ed anche in seguito ad infezioni batteriche (Kudo & Kimura, 1983; Dutta et al., 1996). Questa modificazione può essere quindi intesa come una risposta adattativa delle chloride cells ad uno stress ambientale. L'aumento delle dimensioni delle chloride cells, osservata durante i trattamenti, potrebbe anche essere dovuta alla riduzione di volume delle cellule adiacenti oppure ad una iperplasia delle cellule stesse, anche se non è ancora chiaro se queste alterazioni siano reversibili o meno una volta cessata l'esposizione (Pandey et al., 2008). Alcuni autori descrivono l'iperplasia delle chloride cells come una risposta compensatoria alla perdita degli ioni causata dall'esposizione agli agenti tossici, in particolar modo ai metalli. Tali cellule, infatti, potrebbero giocare un ruolo rilevante nel ripristino dell'omeostasi degli ioni incrementando l'assorbimento degli ioni carenti (Pratap & Wendelaar Bonga, 1993; Pelgrom et al., 1995a; Mazon 2002).

Nel nostro studio, inoltre, abbiamo osservato che, con l'aumentare della concentrazione e dei tempi di esposizione, le alterazioni si estendono anche alla componente vasale; infatti, abbiamo osservato alterazioni delle pillar cells e delle cellule dell'endotelio, e aneurismi lamellari a tutte le concentrazioni da noi testate. La presenza di metalli pesanti nel mezzo acquatico è stata spesso collegata alla formazione di aneurismi lamellari e a degenerazione delle pillar cells (Mazon et al., 2002; Martinez et al., 2004, Doaa & Hanan, 2013), come, ad esempio, nelle branchie di *Prochilodus lineatus*, in seguito ad esposizione sia a piombo che a e rame (Mazon et al., 2002; Martinez et al., 2004).

La degenerazione cellulare che coinvolge le lamelle è da ritenere il fattore principale che limita gli scambi gassosi; il deficit dell'assorbimento dell'ossigeno, in particolare, riduce lo stato di salute generale degli animali esposti, determinando in ultima analisi un grave stato di ipossia (Mohamed, 2009; Doaa & Hanan, 2013).

Inoltre, nel determinare gli effetti causati dai metalli pesanti su pesci, non sono da sottovalutare altri fattori di cruciale importanza come il tempo di esposizione e la concentrazione del metallo (Perry et al., 1986; Wood, 2001; Evans, et al., 2005) e la temperatura, in quanto può influire sulle modalità di accumulo del piombo nei tessuti (Maetz, 1972; Cairns et al., 1975; Mallatt, 1985; Kelderman & Osman 2007, Adeyemi et al., 2014).

6.1.2. *Analisi funzionale degli effetti del piombo sulle branchie di Thalassoma pavo*

Le branchie partecipano a molte funzioni vitali oltre alla respirazione, quali l'osmoregolazione, l'equilibrio acido base e l'escrezione delle scorie azotate (Evans, 1987). Poiché l'epitelio branchiale dei teleostei è un tessuto in cui si verificano sia scambi attivi che passivi con l'ambiente, è probabile che l'alterazione chimica del mezzo acquatico determini l'alterazione della funzionalità di alcune proteine.

La pompa Na^+/K^+ -ATPasi nelle branchie dei teleostei è localizzata a livello delle chloride cells (Uchida et al., 1996). Studi condotti sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato che l'attività della Na^+/K^+ -ATPasi, in animali acquatici, è sensibile all'esposizione ai metalli pesanti: l'esposizione *in vitro* causa una diminuzione dell'attività dell'enzima, mentre gli effetti *in vivo* non sono ancora chiari, sebbene sembri che vari meccanismi compensatori siano coinvolti nel processo di recupero dell'attività enzimatica (Jobling, 1994; Wendelaar Bonga, 1997; De la Torre et al., 2007). Poiché l'inibizione di questo enzima si verifica prima della disfunzione osmoregolatoria, ne consegue che l'attività enzimatica potrebbe essere utilizzata come marker precoce di danno del sistema ionico e osmoregolatorio indotto dai contaminanti. Alla luce di queste considerazioni, la proteina Na^+/K^+ -ATPasi delle branchie di pesci, potrebbe servire da indicatore sensibile per valutare l'eventuale presenza dei metalli pesanti nell'ambiente (Ay et al., 1998).

Studi di letteratura dimostrano, infatti, che l'esposizione ai metalli pesanti influisce negativamente sulla funzionalità sia della pompa Na^+/K^+ -ATPasi, sia su quella di altri trasportatori, quali la Mg^{2+} -ATPasi (Atli & Canli 2007, 2011). Tuttavia, questo effetto inibitorio sembra non esserci in ambiente marino in cui la salinità potrebbe esercitare un effetto protettivo sulla tossicità dei metalli pesanti, come dimostrato da studi condotti da Blanchard e Grossel (2006) e più recentemente da Adeyemi (2012). Da questi studi è comunque emerso che gli effetti inibitori dei metalli pesanti quali (Cr e Pb) differiscono a seconda della specie e delle condizioni di esposizione.

Uno studio condotto nel 2004 da Rogers e Wood (2004) su specie di *Oncorhynchus mykiss* esposte per 96 ore a piombo ha dimostrato una forte inibizione sull'attività della Ca^{2+} -ATPasi, probabilmente legata alla capacità del piombo di interferire con il trasporto del calcio. In questo lavoro, l'esposizione al $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ha

indotto un effetto dose/tempo dipendente sulla immunolocalizzazione della proteina che si è modulata con andamento decrescente.

Nelle branchie di *Thalassoma pavo* abbiamo osservato una diminuzione dell'espressione della proteina in seguito ad esposizione a 800 e 2000 µg/L di piombo, rispettivamente dopo 96 e 48 ore di esposizione. Al contrario, esponendo i pesci a 12000 µg/L di piombo la modulazione dell'espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi segue un andamento diverso rispetto alle precedenti condizioni; infatti dopo 96 ore di il segnale relativo alla proteina è quasi assente. Questo periodo critico viene superato da un ripristino dell'immunoreattività dopo 192 ore di trattamento dovuta probabilmente ad una risposta stress dipendente. Questo risultato rappresenta una conferma di come la Na⁺/K⁺-ATPasi possa ricoprire un ruolo di marker precoce di esposizione.

La proteina canale AQP-3 è anch'essa responsabile dell'equilibrio osmotico e, in particolare, è importante per la permeabilità all'acqua nelle branchie dei pesci (Isaia, 1984). Nelle branchie essa è localizzata a livello della porzione apicale delle chloride cells (Lignot et al., 2002), ed è stata riscontrata in differenti specie di teleostei (Cutler & Cramb, 2000; 2002; Cutler et al., 2007; Brunelli et al., 2008). Aumenti dell'espressione dell'AQP-3 sono stati osservati in seguito ad incremento della salinità nel mezzo acquatico (Giffard-Mena et al., 2007; Whitehead et al., 2011; Qiang et al., 2013; Salati et al., 2014). Al contrario, l'AQP-3 può essere inibita dalla presenza di contaminanti ambientali come rame, nickel e processi di acidificazione (Zeuthen & Klaerke, 1999; Zelenina et al., 2004).

Dalle nostre osservazioni si evince che l'andamento dell'espressione della proteina AQP-3 subisce una lieve diminuzione dopo 96 ore di esposizione alla concentrazioni di 800 µg/L e già dopo 48 ore di esposizione alla concentrazioni di 2000 µg/L. Il risultato più indicativo, anche in questo caso, si rileva alla concentrazione di 12000 µg/L ed è simile a quello osservato per la pompa Na⁺/K⁺-ATPasi, in cui l'espressione della proteina è quasi assente dopo 96 ore. Le poche regioni immunoreattive sono rilevabili nelle cellule accessorie presenti nel filamento principale. Al contrario dopo 192 ore è possibile riscontrare l'aumento dell'immunomarcatura. Quest'andamento è, anche in questo caso, attribuibile ad una risposta allo stress indotto dal metallo pesante che eserciterebbe un effetto inibitorio sull'espressione della proteina canale AQP-3, correlabile anche alle

alterazioni morfologiche a carico delle chloride cells. In aggiunta, è necessario sottolineare che la ripresa dell'espressione della proteina target potrebbe essere legata all'instaurarsi di meccanismi di detossificazione innescati per cercare di ripristinare l'equilibrio osmotico.

In seguito a trattamento con piombo, la pompa Na^+/K^+ -ATPasi e la proteina canale AQP-3 mostrano, quindi, un meccanismo di risposta simile; nonostante il grave danno istologico, è possibile notare, infatti, come l'espressione di entrambe le proteine viene ripristinata all'aumentare del tempo di esposizione nel trattamento a concentrazione più alta.

I meccanismi alla base di questa risposta potrebbero essere collegabili a processi di differenziazione cellulare. Secondo alcuni studi, infatti, le chloride cells, danneggiate in seguito ad esposizione a contaminanti, tra cui i metalli pesanti, vengono sostituite per differenziamento delle cellule basali o delle cellule collocate negli stati centrali del filamento (Dang et al., 2000), oppure, molto più probabilmente, sono le cellule accessorie a svolgere questo ruolo (Brunelli et al., 2008). A supporto di tale teoria, è stato dimostrato che la Na^+/K^+ -ATPasi e l'AQP-3 sono colocalizzate a livello delle chloride cells in un altro teleosteo marino *Coris julis* (Brunelli et al., 2009).

Lo sforzo dell'organismo nel ripristinare la funzionalità delle chloride cells, evidenzia l'importanza di tale tipologia cellulare, e in generale, il ruolo indispensabile giocato dalle branchie nel mantenere l'equilibrio osmotico.

Per quanto riguarda l'espressione delle MTs, in *Thalassoma pavo* si è osservato un progressivo incremento delle cellule immunoreattive a tali proteine in risposta alla trattamento con il piombo e in stretta correlazione con la gravità delle alterazioni morfologiche osservate. In particolare, abbiamo notato che le regioni più danneggiate presentavano maggiore immunoreattività per la proteina.

L'aumentata sintesi di queste proteine è stata riscontrata in diverse specie di pesci in seguito ad esposizione a metalli pesanti (Linde et al., 1999; Urena et al., 2007; Wu et al., 2009; Brunelli et al., 2011). Le MTs intervengono nel metabolismo di metalli essenziali, ma anche nei processi di detossificazione in seguito ad elevate esposizione a metalli essenziali e non (Sarkar et al., 2006; Alvarado et al., 2007, Wu et al., 2009). Il loro meccanismo d'azione prevede la formazione di legami con queste molecole metalliche limitando l'azione tossica di queste sostanze. Le analisi

dell'espressione delle MTs, coadiuvata da tecniche immunoistochimiche, si rivela un utile biomarker in ecotossicologia, in particolare nello studio degli effetti causati dai metalli pesanti su animali acquatici (Smet et al., 2001; Sarkar et al., 2006; Alvarado et al. 2007).

6.2 Tossicità del chlorpyrifos

Il chlorpyrifos è un pesticida altamente tossico in grado di causare effetti molto deleteri nei pesci quali danni istopatologici, inibizione dell'acetilcolina esterasi, danni neurologici, stress ossidativo, alterazione del sistema ormonale, mutagenicità e deformità (Holcombe et al., 1982; Sandahl et al., 2005; Ali et al., 2008; Oruc, 2010; 2012; Wu et al., 2011; Richendrfer et al., 2012; Xing et al., 2012b; Ma et al., 2013; Nwani et al., 2013).

Il chlorpyrifos ha un'alta affinità per le branchie e tassi di assorbimento nei tessuti branchiali più elevati rispetto ad altri organi (Deb & Das, 2013). Questo fattore potrebbe aumentare ancora di più la sensibilità dei pesci in seguito ad esposizione a tale insetticida (Xing et al., 2012a).

I valori di LC50 dopo 96 ore di esposizione riportati in letteratura (Tab. 6.3) sono piuttosto elevati, e al tempo stesso molto variabili tra le diverse specie. Anche in questo caso, come detto in precedenza per il piombo, potrebbero essere rilevanti la diversa sensibilità specie-specifica e i metodi utilizzati durante le fasi sperimentali.

Secondo le nostre conoscenze, i dati presenti in letteratura si riferiscono solo a pesci di acqua dolce e non esistono altri studi riguardanti pesci di acqua salata.

SPECIE		LC50 – 96h (µg/L)	AUTORI
<i>Cyprinus carpio</i>	FW	149	Ali et al., 2013
		160	Halappa & David, 2009
<i>Oreochromis niloticus</i>	FW	154.01	Oruc, 2010
<i>Carassius auratus</i>	FW	153	Ma et al., 2013
		3270	Wang et al., 2009
<i>Clarias gariepinus</i>	FW	861	Nwani et al., 2013
<i>Gambusia affinis</i>	FW	297	Kavitha & Rao, 2008
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FW	45	Kikuchi et al., 1996
<i>Ictalurus punctatus</i>	FW	806	Phipps & Holcombe, 1985
<i>Tilapia nilotica</i>	FW	26.4	Isaa et al., 2011
<i>Mugil cephalus</i>	FW/SW	5.4	Schimmel et al., 1983
<i>Menidia menidia</i>	FW/SW	1.7	
<i>Cyprinodon variegatus</i>	FW/SW	270	EFED ERA, 2000

Tabella 6.3: Valori di LC50-96h relativi al chlorpyrifos
FW – pesci di acqua dolce; FW/SW – pesci estuarini

6.2.1 Analisi morfologica degli effetti del chlorpyrifos sulle branchie di *Thalassoma pavo*

Dalle nostre osservazioni morfo-ultrastrutturali è emerso che l'esposizione acuta a chlorpyrifos è in grado di indurre precoci alterazioni dell'apparato branchiale in *Thalassoma pavo* come la curvatura dei filamenti principali e secondari, iperplasia e fusione lamellare, lifting dell'epitelio, aneurismi, alterazione delle chloride cells, delle pillar cells e della componente vascolare (Tab. 6.4).

<i>T. pavo</i>	3.5 µg/L		7 µg/L	
	48h	96h	48h	96h
Curvatura fil. primario	++	+++	++	++
Curvatura lamelle	+++	+++	++	+
Fusione lamellare	+++	++	+	
Iperplasia	+	++		++
Lifting epiteliale	+++	++	++	++
Alterazione chloride cells	+++	+++	++	++
Altri danni epiteliali	+++	+++	++	++
Aneurismi	++	+++	+++	++

Tabella 6.4: alterazioni osservate in *T. pavo* in seguito ad esposizione a CPF + bassa frequenza; ++ media frequenza; +++ alta frequenza

Risultati simili a quelli da noi riportati sono stati osservati in pesci di acqua dolce quali *Oreochromis mossambicus* (Rao et al., 2003; Kunjamma et al., 2008) e in *Tilapia nilotica* trattati con una formulazione commerciale di chlorpyrifos (Issa et al., 2011). In generale, alterazioni morfologiche analoghe sono state osservate in altre specie di acqua dolce in seguito ad esposizione anche ad altri tipi di pesticida: *Puntius gonionotus* in seguito ad esposizione a paraquat (Elezaby et al., 2001); *Gambusia affinis* e *Corydoras paleatus* esposti a dimethoato (Cengiz & Ünlü, 2003; Jiraungkoorskul et al., 2003); *Cirrhinus mrigala* esposto a cialotrina (Velmurugan et al., 2007); *Corydoras paleatus* esposto a parathion (Fanta et al., 2003) ed esemplari di *Rasbora caverii* prelevati da canali adiacenti ad aree coltivate trattate con pesticidi (De Silva & Samayawardhena, 2002; Wijeyaratne & Pathiratne, 2006).

Tra le alterazioni osservate, la necrosi delle cellule può essere considerato un fenomeno direttamente indotto dell'esposizione al pesticida (Issa et al., 2011), mentre il sollevamento dell'epitelio, la fusione lamellare e gli aneurismi possono essere interpretati come una risposta difensiva all'ulteriore ingresso di contaminante (Richmonds & Dutta, 1989). La comparsa di lifting dell'epitelio

incrementa la distanza tra le molecole tossiche e il sangue, mentre la fusione delle lamelle potrebbe avere un effetto protettivo, giacché diminuisce la superficie lamellare vulnerabile alla presenza del contaminante (Ortiz et al., 2003).

Per quanto riguarda il sollevamento dell'epitelio, Morrison e collaboratori (2001) affermano che tale alterazione non è dovuta all'esposizione diretta ad un contaminante, ma potrebbe essere provocata dagli edemi generati durante le prime fasi di trattamento; invece, l'iperplasia potrebbe essere un'alterazione successiva derivata dal distaccamento degli strati epiteliali (Machado & Fanta, 2003). La fusione lamellare, di conseguenza, potrebbe essere indotto dall'iperplasia e dai fenomeni di adesione tra i tessuti delle lamelle adiacenti (Morrison et al., 2001). Molte alterazioni che possono essere interpretate come meccanismi difesivi, comportano tuttavia gravi disfunzioni che alterano l'attività branchiale. Di fatto, le alterazioni descritte sopra possono diminuire la superficie utile agli scambi gassosi, causando stati d'ipossia e, in casi più gravi, asfissia dell'animale.

In *Thalassoma pavo*, pertanto, in seguito all'esposizione a chlorpyrifos verrebbe confermato quanto suggerito da Roberts (2001) ovvero che stress chimici molti elevati inducono tre tipologie di alterazioni: edema, iperplasia lamellare e fusione lamellare.

Un dato interessante emerso dal nostro studio e che merita una trattazione a parte è quello che si riferisce all'andamento non lineare delle alterazioni morfo-strutturali da noi osservate. Infatti, abbiamo rilevato che un'esposizione acuta a bassa concentrazione di chlorpyrifos è in grado di indurre alterazioni più severe dell'apparato branchiale di *Thalassoma pavo* rispetto ad una esposizione a concentrazioni maggiori. In particolare la fusione lamellare, il lifting epiteliale e l'aumento di volume delle chloride cells sono risultati più frequenti alla bassa concentrazione da noi testata che a quella più alta; quindi sembrerebbe che le alterazioni indotte da questo pesticida non seguono una classica curva in cui la risposta è proporzionale alla dose, ma al contrario una curva non monotonica.

La non monotonicità è stata già descritta per il chlorpyrifos da altri autori nel corso di esperimenti *in vivo* (Vandenberg et al., 2012). In particolare, alcuni di questi studi hanno evidenziato che il chlorpyrifos influenza il peso di ratti maschi (Lassiter & Brimijoin, 2008) e l'attività dell'acetilcolinaesterasi in esemplari di locuste (Wu et al., 2011) con un andamento non lineare. Recenti studi hanno

evidenziato che molte altre sostanze, tra le quali diversi prodotti agrochimici, presentano una curva dose-risposta non monotonica (Storrs & Kiesecker, 2004; Shelley et al., 2009; EPA, 2013); è stato ipotizzato che quest'andamento possa essere comune alle sostanze che agiscono da distruttori endocrini (Lassiter & Brimijoin, 2008; Birnbaum, 2012). Tra i distruttori endocrini, cioè sostanze in grado di interferire tramite diversi meccanismi, con la corretta codifica del segnale ormonale, è stato di recente incluso anche il chlorpyrifos (Kang et al., 2004; Viswanath et al., 2010; Bernabò et al., 2011b; US EPA, 2011).

Non esiste una spiegazione esaustiva e chiara sui possibili meccanismi coinvolti in una risposta di tipo non monotonica ed i pathway molecolari coinvolti restano ancora sconosciuti; probabilmente la risposta non monotonica è causata da meccanismi multipli, innescati dalla presenza del contaminante, i quali operano con diverse modalità, coinvolgendo il sistema endocrino (Welshons et al., 2003; McMahon et al., 2011),

La non monotonicità mette chiaramente in risalto i possibili effetti causati da esposizioni a basse concentrazioni, in quanto risulta difficile prevederne i possibili rischi (Storrs & Kiesecker, 2004; Shelley et al., 2009; Tyl, 2009). In questa ottica il meccanismo di risposta non monotonica necessita di ulteriori studi al fine di ottenere un quadro esaustivo che valuti le alterazioni indotte da più concentrazioni di contaminante, poiché tali effetti potrebbero avere ripercussioni anche per la salute pubblica (Rice et al., 2003; Tyl, 2010; McMahon et al., 2011).

6.2.2 Analisi funzionale degli effetti del chlorpyrifos sulle branchie di *Thalassoma pavo*

La Na^+/K^+ -ATPasi nelle branchie di *Thalassoma pavo*, in seguito ad esposizione a concentrazioni sub-letali di chlorpyrifos presenta un aumento rilevante della sua espressione dopo 48 ore di esposizione. Il segnale immunofluorescente viene localizzato a livello chloride cells localizzate nel filamento principale alle base delle lamelle secondarie; inoltre è stato possibile confermare l'iperplasia di tale tipologia cellulare emersa dalle osservazioni delle sezioni istologiche, osservata anche in *Oreochromis mossambicus* dopo esposizione a cadmio (Pratap & Wendellar Bonga, 1993).

Un'aumentata sintesi dell'espressione della Na^+/K^+ -ATPasi, correlato ad un aumento dell'attività di tale enzima, è stato osservato nelle branchie di diverse specie di pesci eurialini in seguito all'aumento della salinità del mezzo acquatico

(Tipsmark et al., 2002; Lee et al., 2003; Lin et al., 2004a, b; Kang et al., 2008). L'attività di tale proteina, invece, subisce scarse o nulle variazioni nelle branchie del pesce marino *Limanda limanda* in seguito ad esposizione ad acqua prelevata da siti contaminati (Stagg et al., 1992) e nei pesci di acqua dolce in *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* e *Notemigonus crysoleucas* in seguito ad esposizione acuta a cadmio (Watson & Benson, 1987; Wendelaar Bonga, 1997). Al contrario, la maggior parte dei dati presenti in letteratura riporta che la pompa Na^+/K^+ -ATPasi subisce un intenso effetto inibitorio in seguito ad esposizione a varie tipologie di contaminanti, quali ammonio, nitriti, fosfati, fenoli e metalli pesanti su pesci di acqua dolce e marini (Parveza et al., 2006; Agrahari & Gopal, 2008; David et al., 2014; Olsvik et., al 2014).

L'aumento dell'espressione della pompa Na^+/K^+ -ATPasi, riscontrato solo in seguito da un aumento della salinità, potrebbe indicare, quindi, una risposta compensativa, che coinvolge le chloride cells, al fine di ripristinare l'equilibrio osmotico (Dang et al., 2000; Lin et al., 2003; Kang et al., 2012).

Anche in *Thalassoma pavo* l'aumento dell'immunomarcatura della pompa Na^+/K^+ -ATPasi, dopo un periodo di esposizione a concentrazioni sub-letali di chlorpyrifos, potrebbe essere causato da squilibri osmotici indotti dalla presenza del pesticida nel mezzo acquatico (Uchida et al., 1996; Singh et al., 2002 Kaneko et al., 2008). Questo confermerebbe, ancora una volta, il ruolo principale svolto dalle chloride cells nel mantenere l'equilibrio osmotico, nonostante la presenza di severi danni istologici in tutto il tessuto branchiale.

6.2.3. Analisi morfologica degli effetti del chlorpyrifos sulle branchie di *Carassius auratus*

Usando come modello sperimentale *Carassius auratus* abbiamo condotto esperimenti volti ad indagare oltre che gli effetti sull'apparato branchiale dopo esposizione diretta al chlorpyrifos, anche gli effetti che persistono o appaiono dopo l'input diretto di pesticida e l'eventuale capacità di recupero di questo organo dopo un periodo di depurazione in acqua priva di contaminante.

Dopo l'esposizione acuta a tre concentrazioni sub-letali di chlorpyrifos abbiamo notato che, rispetto a quanto osservato in *Thalassoma pavo*, le alterazioni registrate sono dose dipendenti e seguono un andamento di tipo monotonic. Inoltre, i danni a carico dell'apparato branchiale osservati nel pesce rosso sono

meno intensi rispetto a quanto visto nella donzella pavonina. Le modificazioni più evidenti sono la riduzione della regione interlamellare (ILCM), l'alterazione delle cellule epiteliali e la comparsa di aneurismi (Tab.6.5).

<i>C. auratus</i>	96h Esposizione			7 gg Recupero		
	1 µg/L	4 µg/L	8 µg/L	1 µg/L	4 µg/L	8 µg/L
Riduzione ILCM	+	++	+++	+	++	+++
Lifting epiteliale		+	++		++	++
Alterazioni cellulari		+	++		+	+
Aneurismi		+	++			

Tabella 6.5 Alterazioni osservate in *C. auratus* in seguito ad esposizione a CPF e post esposizione
+ bassa frequenza; ++ media frequenza; +++ alta frequenza

La riduzione dell'ILCM è stata già osservata in *Carassius auratus* dopo esposizione a diversi contaminanti o in seguito a variazioni ambientali, come ipossia o cambiamenti di temperatura (Nero et al., 2005; Staicu & Anca, 2008; Mitrovic et al., 2009).

La capacità di rimodellamento delle branchie, intesa come riduzione dell'ILCM, in seguito a stress ambientali, ha come prima conseguenza un incremento della superficie respiratoria delle lamelle secondarie (Lappivaara et al., 1995; Tuurala et al., 1998; Sollid & Nilsson, 2006; Mitrovic et al., 2009); infatti, in seguito a tale riduzione, le lamelle precedentemente coperte dall'ILCM, risultano direttamente esposte al mezzo acquatico (Leino & McCormick, 1993; Zang, 2005). I processi che intervengono durante la riduzione della regione interlamellare non sono del tutto chiari; alcuni autori hanno suggerito che possano essere causati sia da autolisi delle cellule sia da fenomeni degenerativi indotti dalla presenza delle sostanze inquinanti nel mezzo acquatico (Abel, 1976; Costin et al., 2007).

Il fenomeno di riduzione da noi osservato potrebbe quindi rappresentare un'iniziale risposta adattativa indotta dall'esposizione al chlorpyrifos, in seguito ad un'aumentata richiesta d'ossigeno da parte dell'organismo. Tuttavia, la riduzione

dell'ILCM e l'incremento della superficie respiratoria possono provocare un'alterazione dei flussi dell'acqua e degli ioni attraverso la membrana (Sollid et al., 2003, 2005).

Carassius auratus, quindi, presenta una straordinaria capacità di rimodellamento delle strutture branchiali e di adattamento a diverse tipologie di stress ambientali non comune tra altre specie di teleostei (Sollid & Nilsson, 2005).

Dopo il periodo di recupero in acqua priva di pesticida, l'analisi morfostrutturale dell'epitelio branchiale di *Carassius auratus* ha evidenziato il perdurare di alcune alterazioni indotte dall'esposizione al pesticida soprattutto alle due concentrazioni più alte da noi utilizzate. Dopo sette giorni di recupero, negli esemplari in precedenza esposti a 1 µg/L di chlorpyrifos la componente cellulare dell'ILCM, se pur ancora ridotta, appare, tuttavia, maggiormente compatta rispetto agli esemplari dopo le 96 ore di esposizione diretta. Al contrario, nei gruppi precedentemente esposti a 4 e 8 µg/L di contaminante le alterazioni a carico dell'ILCM risultano ancora presenti. Per quanto riguarda le lamelle secondarie, dopo il periodo di post esposizione, negli esemplari provenienti da tutti e tre i gruppi sperimentali non si osserva più la presenza di aneurismi. Il fenomeno di lifting, invece, anche se meno marcato è ancora presente negli individui in precedenza esposti alle due concentrazioni più alte.

È noto che la maggior parte delle alterazioni, non solo istopatologiche, causate da esposizione ad inquinanti segue un andamento decrescente durante i periodi di post esposizione (Altinok & Capkin, 2002; Crestani et al., 2007), tuttavia è difficile determinare i tempi necessari per un recupero totale dell'integrità strutturale dell'epitelio branchiale. Uno studio condotto sull'apparato branchiale di *Prochilodus scrofa* esposto a concentrazioni sub-letali di rame per 96 ore, ha dimostrato che le alterazioni causate dal metallo, si riducevano fino a scomparire dopo almeno 30-45 giorni di mantenimento in acqua pulita (Cerqueira & Fernandes, 2002).

Alcuni autori suggeriscono che il fattore decisivo nel limitare la capacità di recupero dei tessuti, più che la tipologia dell'inquinante, sia piuttosto la durata dell'esposizione che, nonostante la rimozione del contaminante dal mezzo acquatico, potrebbe aver causato alterazioni divenute ormai irreversibili (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994; Takashima & Hibiya, 1995). Anche in organi diversi

dalle branchie, quali il fegato e il sistema olfattivo, è stato osservato un recupero parziale dai danni morfologici causati dall'esposizione a basse concentrazioni d'inquinanti dopo un periodo di post esposizione (Saucier et al., 1990; Julliard et al., 1993; Zeni et al., 1995).

Nel complesso, i nostri dati suggeriscono che l'apparato branchiale di *Carassius auratus* possiede una certa plasticità morfologica e strutturale in risposta all'esposizione ad un contaminante ambientale; infatti un parziale ripristino delle condizioni basali di questo organo è stata osservata solo negli esemplari esposti alla concentrazione più bassa di pesticida (1 µg/L). Al contrario, le branchie degli esemplari esposti alle due concentrazioni più alte da noi testate (4 e 8 µg/L), hanno subito danni più severi durante il periodo di esposizione al chlorpyrifos e sette giorni di recupero in acqua priva di pesticida non sono stati probabilmente sufficienti per ripristinare l'integrità strutturale dell'apparato respiratorio.

6.2.4. Analisi funzionale degli effetti del chlorpyrifos sulle branchie di *Carassius auratus*

Per quanto riguarda l'analisi funzionale, nelle branchie di *Carassius auratus*, in seguito ad esposizione diretta a chlorpyrifos, l'espressione della pompa Na⁺/K⁺-ATPasi sembra essere strettamente collegata all'integrità strutturale dell'ILCM. Infatti, dopo esposizione alle due concentrazioni più basse (1 e 4 µg/L) l'espressione della proteina permane in parte sui livelli osservati negli esemplari di controllo mentre in seguito ad esposizione alla concentrazione più alta da noi testata (8 µg/L) si osserva una riduzione rilevante del segnale di immunomarcatura. Dopo il periodo di recupero in acqua priva di pesticida, parallelamente alla diminuzione del danno istopatologico, nelle branchie di *Carassius auratus* si osserva un aumento dell'espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi.

In letteratura sono presenti diversi studi che descrivono l'espressione della Na⁺/K⁺-ATPasi che non viene significativamente alterata o si mantiene costante dopo esposizione acuta o cronica a fattori di stress; (Watson & Beamish, 1980; Watson & Benson, 1987; Wendelaar Bonga, 1997). In uno studio condotto sempre su *Carassius auratus* esposto a concentrazioni sub-letali di piombo, non sono stati osservati variazioni considerevoli dell'espressione di questo biomarker, mentre l'effetto inibitorio del metallo era molto più marcato per trasportatori Ca²⁺-ATPasi (Franchini et al., 2009).

Per quanto riguarda gli effetti sull'espressione di questa proteina in teleostei di acqua dolce esposti a inquinanti e successivamente trasferiti in acqua pulita, in letteratura esistono pochi dati e per di più contrastanti. In alcuni casi, è evidente che spostando gli esemplari in acqua priva di contaminanti esiste una chiara tendenza a ritornare a condizioni paragonabili al controllo (De la Torre et al., 1999), mentre in altri casi l'inibizione permane (Verma et al., 1983; De la Torre et al., 2000). Tale variabilità nella risposta potrebbe essere determinata da una somma di cause dirette, come alterazioni della funzionalità e dell'integrità strutturale dell'epitelio di trasporto, e cause indirette, tra le quali il coinvolgimento del sistema endocrino (Hanke et al., 1983; Jensen, 2003). Inoltre, secondo De la Torre e collaboratori (2007) l'espressione della Na^+/K^+ -ATPasi è direttamente dipendente dall'intensità del danno morfologico o funzionale causato dallo stress chimico, piuttosto che dalla sua tipologia (e.g. metalli pesanti, fenoli, nitriti o fosfati e pesticidi).

Dopo il periodo di esposizione diretta a chlorpyrifos, è stata osservata l'espressione dell'iNOS, che risultava assente in condizioni basali. Dopo il periodo di post esposizione in acqua priva di pesticida l'espressione della proteina è divenuta ancora più marcata.

Processi patofisiologici, come tumori, patogeni e la presenza di xenobionti causano un incremento dell'espressione dell'iNOS (Green et al., 1990; Liew et al., 1990; Nathan & Xie, 1994; Xiang & Rice, 2000; Cals-Grierson & Ormerod, 2004; Fenoglio et al., 2006, 2009).

L'espressione di questa proteina nei tessuti dei pesci indica l'innescarsi di un meccanismo di difesa che implica la produzione di ossido nitrico (Barroso et al., 2000). È noto che l'ossido nitrico coadiuva diversi processi tissutali, infatti, può sia indurre sia bloccare i fenomeni apoptotici (Melillo et al., 1995; Dimmeler & Zeiher, 1997; Palmer et al., 1998; Weller, 1999; Sollid et al., 2000), influire sulla proliferazione e la differenziazione delle cellule epidermiche (Bruch-Gerharz et al., 1998; Cals-Grierson & Ormerod, 2004) e intercedere nei processi riparativi (Witte & Barbul, 2002).

I dati presenti in letteratura riguardanti l'espressione nell'iNOS evidenziano che tale proteina risulta maggiormente espressa dopo periodi di esposizione a pesticidi quali chlorpyrifos e l'atrazina nel cervello del pesce di acqua dolce

Cyprinus carpio (Wang et al., 2013) e nel fegato di *Carassius auratus gibelio* esposto a trichlorfon (Xu et al., 2011). In particolare, in esperimenti condotti su *Oncorhynchus mykiss* infettato con *Renibacterium*, le branchie sono risultate l'organo in cui l'incremento dell'espressione dell'iNOS è più veloce rispetto ad altri organi, come il fegato (Campos-Perez et al., 2000).

I dati che si riferiscono al periodo di post esposizione, invece sono contrastanti, infatti, alcuni autori riportano aumentati livelli della proteina in seguito a post esposizione in acqua priva di pesticida (Wang et al., 2013), altri riportano un decremento della stessa (Kim et al., 2005). L'incremento dell'iNOS dopo il periodo di trattamento con chlorpyrifos, può indicare, quindi, l'insorgenza di processi di proliferazione cellulare al fine di ripristinare gli elementi cellulari danneggiati dalla precedente presenza del contaminante (Bernabò et al., 2013).

Per quanto riguarda l'analisi da noi effettuata sullo stato di lipoperossidazione indotto da un'esposizione a chlorpyrifos, i nostri risultati hanno mostrato chiaramente un incremento rilevante dello stress ossidativo a tutte e tre le concentrazioni da noi testate dopo 96 ore di esposizione. Dopo il periodo di post esposizione in acqua priva di pesticida, negli esemplari esposti alle due concentrazioni più basse, 1 e 4 µg/L, il livello di lipoperossidazione è statisticamente comparabile a quello osservato negli animali mantenuti in condizioni basali; al contrario, negli individui esposti alla concentrazione di 8 µg/L, anche dopo il periodo di post esposizione permane una differenza statisticamente significativa rispetto al gruppo di controllo.

La lipoperossidazione è un fenomeno che può essere indotto dalla presenza di xenobionti, come pesticidi e metalli, in ambiente acquatico (Khrer, 1993; Basini et al., 2012; Jin et al., 2012). Nell'organismo esistono degli enzimi che mantengono l'equilibrio fisiologico fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti, ma questi risultano efficienti entro definiti range di valori. Quando i livelli di perossidi e radicali liberi superano questi limiti, infatti, si manifestano gli effetti tossici che causano danno a tutti i componenti della cellula, incluse proteine, lipidi ed acidi nucleici (Ahmad et al., 2000).

È stato dimostrato che il chlorpyrifos, così come altri pesticidi, causa un incremento dello stress ossidativo in *Cyprinus carpio* dopo periodi brevi di esposizione (Xing et al., 2012b); mentre in *Carassius auratus* esposto a ritardanti di

fiamma bromurati è stata evidenziata un'inibizione degli enzimi antiossidanti e, parallelamente, un incremento della lipoperossidazione (Feng et al., 2013).

Nel nostro studio abbiamo rilevato che in *Carassius auratus*, dopo esposizione a chlorpyrifos, la lipoperossidazione dei tessuti branchiali è strettamente correlata alla presenza di danni istologici; risultati simili sono stati riportati per la stessa specie dopo esposizione acuta a tetrabromobisphenol A (Shi et al., 2005), e in *Gobiocypris rarus* dopo esposizione cronica a tetrabromobisphenol A e decabromodiphenylethane (Zhang et al., 2008). L'accumulo delle specie chimiche ossidanti in condizioni di stress chimico, infatti, altera la composizione e la struttura delle membrane lipidiche provocando un iniziale danno ossidativo ai costituenti della cellula e, successivamente, danno all'intera struttura cellulare (Esterbauer et al., 1990; Monteiro et al., 2000).

6.3 Considerazioni conclusive

I cambiamenti morfo-funzionali osservati in *Thalassoma pavo* dopo esposizione a concentrazioni sub-letali di piombo, confermano che tale metallo è da considerarsi una sostanza estremamente tossica; infatti, esso figura al secondo posto nella lista delle sostanze pericolose indicate dall'Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR, 1999). Il piombo, inoltre, influenza in maniera rilevante l'equilibrio ionico come testimoniato dalla modulazione dal pattern di immunomarcatura della Na^+/K^+ -ATPasi e della AQP-3, mentre le MTs si confermano, nei pesci marini, un utile marker di esposizione a metalli pesanti (Langston et al., 2002; De Boeck et al., 2010; Brunelli et al., 2011).

Per quanto riguarda lo studio degli effetti del chlorpyrifos, alle concentrazioni da noi testate, è emerso che questo pesticida è più tossico in *Thalassoma pavo* che in *Carassius auratus*. Questo dato potrebbe essere dovuto ad una maggiore sensibilità della specie marina e conferma allo stesso tempo, l'estrema capacità di adattamento di questa specie come riportato in letteratura in esperimenti condotti su diverse condizioni di stress quali ipossia e basse temperature (Sollid & Nilsson, 2005). È interessante notare anche che le alterazioni morfologiche osservate in *Thalassoma pavo* sembrano seguire un andamento di tipo non monotonic.

Il set up sperimentale usato per *Carassius auratus*, che ha previsto una esposizione breve a chlorpyrifos seguita da un periodo di post esposizione, si è

rivelato un tool molto utile al fine di comprendere meglio non solo gli effetti diretti che si rendono evidenti durante o subito dopo l'esposizione, ma anche i gli effetti che si possono presentare in seguito o persistere dopo il periodo di contatto diretto con il contaminante; le alterazioni istologiche, l'aumento dell'espressione dell'iNOS e gli elevati valori di lipoperossidazione (ad alte concentrazioni) osservati dopo la post esposizione, hanno evidenziato, infatti, che le alterazioni persistono anche dopo l'input diretto di pesticida. In tal modo è stato possibile studiare anche eventuali strategie adattative e la capacità di recupero dallo stress che possono giocare un ruolo molto importante in natura.

Nel monitoraggio delle contaminazioni ambientali, gli indicatori biologici (biomarkers) sono considerati molto importanti per le indagini sugli effetti degli inquinanti chimici (McCarthy & Shugart, 1990; Peakall, 1994). La valutazione delle alterazioni istopatologiche si è dimostrata uno strumento estremamente utile per valutare gli effetti dell'esposizione a contaminanti.

BIBLIOGRAFIA

Abel P D, 1976. Toxic action of several lethal concentration of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L.). J. Fish Biol., 9, 441-446.

Adeyemi J A, Klerks P L, 2012. Salinity acclimation modulates copper toxicity in the sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry Volume 31, Issue 7, pages 1573–1578.

Adeyemi J A, Adewale O O, Oguma A Y, 2014. Mortality, oxidative stress and hepatotoxicity in juvenile African Catfish, *Clarias gariepinus* Burchell, exposed to lead and cypermethrin. Bull Environ Contam Toxicol; 92:529–533.

Agrahari S, Gopal K, 2008. Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to monocrotophos. Pesticide Biochemistry and Physiology 92; 57–60.

Agre P, Preston G M, Smith B L, Jung J S, Raina S, Moon C, Guggino W B, Nielsen S, 1993. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. American Journal of Physiology 265: 463-476.

Agre P, King L S, Yasui M, Guggino W B, Ottersen O P, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S, 2002. Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. The Journal of Physiology 542: 3-16.

Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand H S, Jain S K, Athar M, Raisuddin S, 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. Biochim. Biophys. Acta 1523; 37–48.

Ahmed I, Jhung S H, 2014. Composites of metal–organic frameworks: Preparation and application in adsorption. Materialstoday Volume 17, Issue 3, April 2014, Pages 136–146.

Ahuja SK, 1970. Chloride cell and mucous cell response to chloride and sulphate enriched media in the gills of *Gambusia affinis* and *Catla catla*. Journal of Experimental Biology 173: 231-250.

Alados C N L, Weber D N, 1999. Lead effects on the predictability of reproductive behavior in fathead minnows (*Pimephales promelas*): a mathematical model. Environ. Toxicol. Chem. 18, 2392–2399.

Alavanja M C, Ross M K, Bonner M R, 2013. Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. CA Cancer J Clin 63(2):120-42.

Ali D, Nagpure N S, Kumar S, Kumar R, Kushwaha B, 2008. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell electrophoresis. *Chemosphere* 71(10):1823-31.

Ali D, Nagpure N, Kumar S, Kumar R, Kushwaha B, Lakra W, 2009. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food Chem Toxicol*; 47: 650-656.

Altinok I, Capkin E, 2002. Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. *Toxicologic Pathology*, 35:405–410.

Alvarado N E, Quesada I, Hylland K, Marigomez I, Soto M, 2006. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. *Aquatic Toxicology* 77; 64–77.

Anderson M B, Preslan J E, Jolibois J, Bollinger J E, George W J, 1997. Bioaccumulation of lead nitrate in Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*). *Journal of Hazardous Materials* 54.

Apostol S, 1979. The toxicity of certain pesticides to protozoa. *Proc Symp Environ Biol*; 97-102.

Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto J C, García-Río G, 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources [J]. *Agriculture Ecosystems Environmental*; 123:247-260.

Assis C R, Linhares A G, Oliveira V M, França R C, Carvalho E V, Bezerra R S, de Carvalho L B Jr, 2012. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. *Sci Total Environ* 441:141-50.

ASTM, 2002. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, United States.

Atkins P W, 2000. Elementi di chimica fisica. Bologna: Ed. Zanichelli

Atli G, Canli M, 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*; Volume 145, Issue 2, Pages 282–287.

Atli G, Canli M, 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology* Volume 20, Issue 8, pp 1861-1869.

ATSDR, 1999 Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Lead Toxicity. What Are the Physiologic Effects of Lead Exposure?

Attia A A, ElMazoudy R H, El-Shenawy N S, 2012. Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats. *Pestic Biochem Physiol* 103:87-93.

Au D W T, 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 817-834.

Au D W T, Chen P, Pollino C A, 2004. Cytological changes in association with EROD induction in fish upon dietary exposure to benzo[a]pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1043–1050.

Ay O, Kalay M, Tamer L, Canli M, 1999. Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na^+/K^+ -ATPase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*; 62:160-168.

Banaee M, Haghi N, Zoheiri F, 2013. LC50 and bioaccumulation of lead nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) in Goldfish (*Carassius auratus*). *International Journal of Aquatic Biology* 1(5): 233-239.

Banks K E, Huntera D H, Wachal D J, 2004. Chlorpyrifos in surface waters before and after a federally mandated ban. *Environment International* 31 351– 356.

Barbosa F, Tanus-Santos J E Jr, Gerlach R F, Parsons P J, 2005. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect*; 113(12): 1669–1674.

Barroso J B, Carreras A, Esteban F J, Peinado M A, Martínez-Lara E, Valderrama R, Jiménez A, Rodrigo J, Lupiáñez J A, 2000. Molecular and kinetic characterization and cell type location of inducible nitric oxide synthase in fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 279(2):R650-6.

Basini G, Bianchi F, Bussolati S, Baioni L, Ramoni R, Grolli S, Conti V, Bianchi F, Grasselli F, 2012. Atrazine disrupts steroidogenesis, VEGF and NO production in swine granulosa cells. *Ecotoxicol Environ Saf*; 85:59-63.

Bernabò I, Sperone E, Tripepi S, Brunelli E, 2011a. Toxicity of chlorpyrifos to larval *Rana dalmatina*: acute and chronic effects on survival, development, growth and gill apparatus. *Arch Environ Contam Toxicol* 61(4):704-18.

Bernabò I, Gallo L, Sperone E, Tripepi S, Brunelli E, 2011b. Survival, development, and gonadal differentiation in *Rana dalmatina* chronically exposed to chlorpyrifos. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*;315(5):314-27.

Bernabò I, Guardia A, La Russa D, Madeo G, Tripepi S, Brunelli E, 2013. Exposure and post-exposure effects of endosulfan on *Bufo bufo* tadpoles: morpho-histological and ultrastructural study on epidermis and iNOS localization. *Aquat Toxicol.* 15;142-143:164-75.

Berne R M, Levy M N, 2010. Fisiologia. A cura di Tullio Manzoni, Giuseppe Sesta edizione. Spidaleri.

Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Hol P, Wahli T, 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25-34.

Berrill M, Coulson D, McGillivray L, Pauli B, 1998. Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environ Toxicol Chem* 17:1738-1744.

Bhattacharjee S, Fakhruddin A N, Chowdhury M A, Rahman M A, Alam M K, 2012. Monitoring of selected pesticides residue levels in water samples of paddy fields and removal of cypermethrin and chlorpyrifos residues from water using rice barn. *Bull Environ Contam Toxicol* 89(2):348-53.

Birnbaum L., 2012. Environmental chemicals: evaluating low-dose effects. *Environ Health Perspect* 120(4):a143-4.

Blanchars J, Grossel M, 2006. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish *Fundulus heteroclitus*: Is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities? *Aquatic toxicology* Volume 80, Issue 2, 16, Pages 131–139.

Blanchoud H, Moreau-Guigon E, Farrugia F, Chevreuil M, Mouchel JM, 2007. Contribution by urban and agricultural pesticide uses to water contamination at the scale of the Marne watershed. *Science of the total environment*, 375: 168-179.

Blaskett D R, Boxall D, 1990. Lead and its alloys. Ellis Horwood.

Bonanse R I, Amé M V, Wunderlin D A, 2013. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). *Chemosphere* 90(6):1860-9.

Brennan P A, Moncada S, 2002. From pollutant gas to biological messenger: the diverse actions of nitric oxide in cancer. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 84(2): 75-78.

Brunelli E, Sesso F, Tripepi S, 2004. Flora e fauna dei mari di Calabria. La provincia di Cosenza- Assessorato all'ambiente.

Brunelli E, Talarico E, Corapi B, Perrotta I, Tripepi S, 2008, Effects of a sublethal concentration of sodium lauryl sulphate on the morphology and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gill of the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71; 436–445.

Brunelli E, Mauceri A, Salvatore F, Giannetto A, Maisano M, Tripepi S, 2009. Localization of aquaporin 1 and 3 in the gills of the rainbow wrasse *Coris julis*. *Acta Histochem.*

Brunelli E, Mauceri A, Maisano M, Bernabò I, Giannetto A, DeDomenico E, Corapi B, Tripepi S, Fasulo S, 2011. Ultrastructural and immunohistochemical

investigation on the gills of the teleost, *Thalassoma pavo* L., exposed to cadmium. *Acta histochemica* 113;201–213.

Cairns J, Heath A G, Parker N B C, 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47:135-171.

Calamari D, Marchetti R, Vailati G, 1980. Influence of water hardness on cadmium toxicity to *Salmo Gairdneri*. *Richardson Water Research*. 1421-1426.

Cals-Grierson M M, Ormerod AD, 2004. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 10, 179–193.

Campos-Perez J J, Ward M, Grabowski P S, Ellis A E, Secombes C J, 2000. The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after challenge with the gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *Immunology*; 99(1):153-61.

Capel P D, Larson S J, Winterstein T A, 2001. The behaviour of 39 pesticides in surface waters as a function of scale. *Hydrol. Process.*, 15: 1251–1269.

Carroll J J, Ellis S J, Oliver W S, 1979. Influence of hardness constituents on the acute toxicity of cadmium to brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*; 22(4-5):575-81.

Celine S H, Silvan S, Elumalai E K, 2014. Toxicology study on lead nitrate induced fresh water fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *European Journal of Academic Essays* 1(7): 5-8.

Cengiz E I, Unlü E, 2003. Histopathology of gills in mosquitofish, *Gambusia affinis* after long-term exposure to sublethal concentrations of malathion. *J Environ Sci Health B*, 38(5):581-9.

Cerqueira C C, Fernandes M N, 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol Environ Saf*; 52(2):83-91.

Chamarthi R R, Bangeppagari M, Gooty J M, Mandala S, Tirado J O, Marigoudar S R, 2014. Histopathological alterations in the gill, liver and brain of *Cyprinus carpio* on exposure to Quinalphos. *American Journal of Life Sciences*. Vol. 2, No. 4, pp. 211-216.

Cicik B, Karayakar F, 2004. Effects of lead and cadmium interactions on metal accumulation in tissue and organ of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72:141-148.

Claiborne J B, Heisler N, 1984. Acid-base regulation and ion transfers in the carp (*Cyprinus carpio*) during and after exposure to environmental hypercapnia. *J Exp Biol* 108: 25–43.

Claiborne J B, Heisler N, 1986. Acid-base regulation and ion transfers in the carp (*Cyprinus carpio*): pH compensation during graded long- and short-term environmental hypercapnia, and the effect of bicarbonate infusion. *J. exp. Biol.* 126, 41-61.

Claver A, Ormad P, Rodríguez L, Ovelleiro J L, 2006. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere* 64(9):1437-43.

Cognetti G, Sarà M, Magazzù G, 2004. *Biologia marina. Ed. Calderini*, Bologna.

Colborn T, 2006. A case for revisiting the safety of pesticides: a closer look at neurodevelopment. *Environ Health Perspect* 114(1):10-17.

Coons A H, Leduc E H, Connolly J M, 1955. Studies on antibody. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *Journal of Experimental Medicine* 102:49-59.

Costa F, 2000. *Atlante dei pesci dei mari italiani*. Ed. Mursia, Milano.

Costin D, Staicu A C, Dinu D, Huculeci R., Costache M, Dinischiotu A, 2007. Biochemical and histological effects of deltamethrin exposure on the gills of *Carassius auratus gibelio* (pisces cyprinidae). *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*;VOL 40, NO 1.

Crestani M, Menezes C, Glusczak L, dos Santos Miron D, Spanevello R, Silveira A, Gonçalves F F, Zanella R, Loro V L, 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere*; 67(11):2305-11.

Cutler C P, Cramb G, 2000. Water transport and aquaporin expression in fish. In: Hohmann, S., Nielsen, S. (Eds.), *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*. Kluwer academic press, London, UK, pp. 431–441.

Cutler C P, Cramb G, 2002. Branchial expression of an aquaporin 3 (AQP-3) homologue is downregulated in the European eel (*Anguilla anguilla*) following seawater acclimation. *J. Exp. Biol.* 205, 2643–2651.

Cutler C P, Martinez A S, Cramb G, 2007. The role of aquaporin 3 in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*; Volume 148, Issue 1, Pages 82–91.

DAFF. 2010. Prohibition notice regarding the use of certain agricultural remedy. Government Notices. Department of Agriculture, Forestry and Fisheries No. R. 375. Government Gazette, 14.

Dang Z, Lock R A C, Flik G, Wendelaar Bonga S E, 1999. Metallothionein response in gill of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. *American Journal of Physiology* 277: 320-331.

Dang Z, Lock R A C, Flik G, Wendelaar Bonga S E, 2000. Na⁺/K⁺-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. J. Exp. Biol. 203, 379–387.

Das A C, Debnath A, Mukherjee D, 2000. Effect of the herbicides oxadiazon and oxyfluorfen on phosphates solubilizing microorganisms and their persistence in rice fields. Chemosphere Volume 53, Issue 3, Pages 217–221.

David M, Sangeetha J, Harish E R, Shrinivas J, Naik V R, 2014. Deltamethrin induced alteration in Na⁺-K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ associated ATPases activity in the freshwater fish *Cirrhinus Mrigala*. International Journal of Pure and Applied Zoology Volume 2, Issue 2, pp: 175-181.

De Angelis S, Tassinari R, Maranghi F, Eusepi A, Di Virgilio A, Chiarotti F, Ricceri L, Venerosi Pesciolini A, Gilardi E, Moracci G, Calamandrei G, Olivieri A, Mantovani A, 2009. Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice. Toxicol Sci 108(2):311-9.

De Boeck G, Ngo T T H, Van Campenhout K, Blust, 2003. Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. Aquatic Toxicology 65: 413–424.

de la Torre F R, Ferrari L, Salibian A, 2000. Long-term in situ water toxicity bioassays in the Reconquista River (Argentina) with *Cyprinus carpio* as sentinel organism. Water Air Soil Poll. 121, 205–215.

de la Torre F R, Ferrari L, Salibian A, 2002. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. Comp. Biochem. Physiol. C 131, 271–280.

de la Torre F R, Salibian A, Ferrari L, 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. Chemosphere 68; 1582–1590.

De Silva P M, Samayawardhena L A, 2002. Low concentrations of lorsban in water result in far reaching behavioral and histological effects in early life stages in guppy. Ecotoxicol Environ Saf; 53(2):248-54.

De Smet H, Blust R, 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety 48, 255-262.

Deb N, Das S, 2013. Chlorpyrifos toxicity in fish: A Review. Aquatic Science; Current World Environment Vol. 8(1), 77-84.

Della Croce N, Cattaneo Vietti, Danovaro R, 2001. Ecologia e protezione dell'ambiente marino costiero. Ed. UTET, Torino.

Devi R, Banerjee T K, 2007. Toxicopathological impact of sub-lethal concentration of lead nitrate on the aerial respiratory organs of 'murrel' *Channa*

striata (bloch, pisces). Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering, Vol.4, No. 4, pp. 249-256.

Dezfuli B S, Simoni E, Giari L, Manera M, 2006. Effects of experimental terbuthylazine exposure on the cells of *Dicentrarchus labrax* (L.). Chemosphere 64, 1684-1694.

Dimmeler S, Zeiher A, 1997. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. Nitric Oxide Biol Chem 1(4):275–281.

Doaa M M, Hanan H A E, 2013. Histological changes in selected organs of *Oreochromis niloticus* exposed to doses of lead acetate. J. Life Sci. Biomed. 3(3): 256-263.

Du Preez L H, Jansen van Rensburg P J, Jooste A M, Carr J A, Giesy J P, Gross T S, Kendall R J, Smith E E, Van Der Kraak G, Solomon K R, 2005. Seasonal exposures to triazine and other pesticides in surface waters in the western Highveld corn-production region in South Africa. Environmental Pollution, 135: 131-141.

Dutta H M, Munshi J S D, Roy P K, Singh N K, Adhikari S, Killius J, 1996. Ultrastructural changes in the respiratory lamellae of the catfish, *Heteropneustes fossilis* after sublethal exposure to malathion. Environmental Pollution Volume 92, Issue 3, 1996, Pages 329–341.

Ebbesson L O E, Tipsmark C K, Holmqvist B, Nilsen T, Andersson E, Stefansson S O, Madsen S S, 2005. Nitric oxide synthase in the gill of Atlantic salmon: colocalization with and inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase. Journal of Experimental Biology 208: 1011-1017.

EC, 2005. Review report for the active substance chlorpyrifos. SANCO/3059/99 - rev.1.5. Health and Consumer Protection Directorate-General, European Commission http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.selection.

Echevarria M, Windhager E E, Frindt G, 1996. Selectivity of the renal collecting duct water channel aquaporin-3. Journal of Biological Chemistry 271, 79-82.

Eckert, R. & Randall, D. 1991. Fisiologia animale: meccanismi e adattamenti. Zanichelli Ed., Bologna.

EFED ERA, 2000. Reregistration eligibility science chapter for chlorpyrifos fate and environmental risk assessment chapter; developed by the Environmental Fate and Effects Division of OPP.

EIFAC, 1983. Working party on toxic testing procedures on fish toxicity testing procedures. EIFAC Technical Paper, 24: 1–37.

Eisler R, 2000. Handbook of chemical risk assessment. health hazards to humans, plants, and animals. Volume 2: Organics. Lewis Publishers, Washington, D.C. Chapter 14. pp. 883-902.

Elezaby M M, El-Serafy S, Heckmann R, K Sharf Eldeen, Seddek M M, 2001. Effect of some toxicants on the fresh water fish *Oreochromis niloticus*. J. Egy. Gen. Soci. Zool., 36: 407-434.

Elsharkawy E E, Yahia D, El-Nisr N A, 2013. Sub-chronic exposure to chlorpyrifos induces haematological, metabolic disorders, and oxidative stress in rat: attenuation by glutathione. Environ Toxicol Pharmacol 35(2):218-27.

El-Zaemey S, Fritschi L, Heyworth J, 2013. Occupational pesticide exposure among Yemeni women. Environ Res 122:45-51.

Essumang D K, Togoh G K, Chokky L., 2009. Pesticide residues in the water and fish (Lagoon Tilapia) samples from lagoons in Ghana. Bull Chem Soc Ethiop 23(1):19-27.

Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Puhl H, Tatzber F, 1990. Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation. Biochem Soc Trans; 18(6):1059-61.

Evans D H, 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. EnvironHealthPerspect1987; 71:47-58.

Evans D H, Piermarini P M, Potts W T W, 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. Journal of Experimental Zoology, 283, 641-652.

Evans D H, Piermarini P M, Choe K, 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiological Reviews 85: 97-177.

EXTOXNET (Extension Toxicology Network), 1996. Pesticide Information Profiles Chlorpyrifos. Cornell University, Ithaca, NY. <http://extoxnet.orst.edu/ips/chlorpyrifos.htm>

Ezhilmathy R, Rajalakshmi K, Chezian A, 2014. Ameliorative effect of external calcium on the combined toxicity of pesticide and metal in relation to Ionoregulation of fish, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). International Journal of Research in Biological Sciences; 4(3): 82-88.

Fanta E, Rios F S, Romão S, Vianna A C, Freiberger S, 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicol Environ Saf; 54(2):119-30.

FAO, 1981. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4: bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. FAO Documentos Técnicos de Pesca 164: 1-34.

Fasulo S, Mauceri A, Giannetto A, Maisano M, Bianchi N, Parrino V, 2008. Expression of metallothionein mRNAs by *in situ* hybridization in the gills of *Mytilus galloprovincialis*, from natural polluted environments. Aquatic Toxicology Volume 88, Issue 1, Pages 62–68.

Fasulo S, Maisano M, Sperone E, Mauceri A, Bernabò I, Cappello T, D'agata A, Tripepi S & Brunelli E, 2011. Toxicity of Foroozan crude oil to ornate wrasse (*Thalassoma pavo*, Osteichthyes, Labridae): ultrastructure and cellular biomarkers. Italian Journal of Zoology. DOI:10.1080/11250003.2011.623139

Feng M, Li Y, Qu R, Wang L, Wang Z, 2013. Oxidative stress biomarkers in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to decabromodiphenyl ether and ethane, or their mixture. Ecotoxicology; 22:1101–1110.

Fenoglio C, Grosso A, Boncompagni E, Milanesi G, Gandini C, Barni, 2006. Morphofunctional evidence of changes in principal and mitochondria-rich cells in the epidermis of the frog *Rana kl. esculenta* living in a polluted habitat. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 690–702.

Fernandes M N, Mazon A F, 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish adaptations. Enfield SciencePublish-ers, pp.203–231.

Fernandes A F, Cardoso J V F, Garcia-Santos S, Monteiro S M, Carrola J, Matos P, Fontáinhas-Fernandes A, 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. Pesq. Vet. Bras.vol.27no.3 Rio de Janeiro.

Fernandes C, Fontáinhas Fernandes A, Monteiro SM, Salgado M A, 2008. Histopathological gill changes in wild leaping grey mullet (*Liza saliens*) from the Esmoriz- Paramos Coastal Lagoon, Portugal. Environ.Toxicol.22, 443–448.

Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. 1998. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). FASEB Journal 12:773–790.

Foskett J K, Hubbard G M, 1981. Hormonal control of chloride secretion by teleost opercular membrane. Annals of the New York Academy of Sciences Volume 372, Hormonal Regulation of Epithelial Transport of Ions and Water; page 643.

Franchini A, Alessandrini F, Bolognani Fantin A M, 2009. Gill morphology and ATPase activity in the goldfish *Carassius carassius* var. *auratus* exposed to experimental lead intoxication. Bolletino di zoologia, 61:1, 29-37.

Fritsche R, Schwerte T, Pelster B, 2000. Nitric oxide and vascular reactivity in developing zebrafish, *Danio rerio*. Am. J. Physiol. 279, 2200-2207.

Fuller P L, Nico L G, Williams J D, 1999. Nonindigenous fishes introduced into inland waters of the United States. Special Publication 27, American Fisheries Society. Bethesda, Maryland. 613 pp.

Garcia-Santos S, Fontainhas-Fernandes A, Wilson J M, 2005. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: assessment of some ionoregulatory parameters. Environmental Toxicology Volume 21, Issue 1, pages 33–46.

Gebremariam S Y, Beutel M W, Yonge D R, Flury M, Harsh J B, 2012. Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. Rev Environ Contam Toxicol 215:123-75.

Gharedaash E, Imanpour M R, Taghizade V, 2012. Effect of lead nitrate on the survival rate and growth performance of Caspian Sea Kutum (*Rutilus frisii kutum*). Global Veterinaria 9 (1): 23-27.

Ghosh T K, Konar S K, 1979. Effects of sublethal levels of the insecticide aldrin on fish and fish-food organisms. Proc Symp Environ Biol;103-112.

Gibbins I L, Olsson C, Holmgren S, 1995. Distribution of neurons reactive for NADPH-diaphorase in the branchial nerves of a teleost fish, *Gadus morhua*. Neurosci. Lett. 193, 113-116.

Giesy J P, Solomon K R, Coates J R, Doxon K R, Giddings J M, Kenaga E E, 1999. Chlorpyrifos: Ecological risk assessment in North American environments. Reviews of Environ. Contamination and Toxicol. 160, 1-130.

Giffard-Mena I, Boulo V, Aujoulat F, Fowden H, Castille R, Charmantier G, Cramb G, 2007. Aquaporin molecular characterization in the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*): The effect of salinity on AQP1 and AQP3 expression Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 148; 430–444.

Green S J, Meltzer M S, Hibbs J JB, Nacy C A, 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by a L-arginine dependent killing mechanism. J. Immunol. 144, 278–283.

Halappa R, David M, 2009. Behavioural responses of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) following sublethal exposure to chlorpyrifos. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 9: 233-238.

Hanke W, Guth G, Bubel H, Muller R, 1983. Physiological changes in carps induced by pollution. Ecotoxicol. Environ. Saf. 7, 229–241.

Haraldsen L, Soderstrom-Lauritzsen V, Nilsson G E, 2002. Oxytocin stimulates cerebral blood flow in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through a nitric oxide dependent mechanism. Brain Research 929, 10-14.

Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay M A, Verkman A S, 1994. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *Journal of Biological Chemistry* 269: 5497-5500.

Haviland J A, Butz D E, Porter W P, 2010. Long-term sex selective hormonal and behaviour alterations in mice exposed to low doses of chlorpyrifos in utero. *Reprod Toxicol* 29(1):74-9.

Heath A G, 1987. *Water pollution and fish physiology*. CRC press, Boca Raton, FL.

Hedayati A, Shaluei F, Jahanbakhshi A, Kolangi H Alizadeh M, 2012. Detection of LC50, NOEC and LOEC of some heavy metals (mercury, plumb and zinc) in freshwater fish Roach (*Rutilus rutilus*). *Toxicology and Industrial Health* 1–6.

Hinton De Baumann P C, Gardner G R, Hawkins W E, Hendricks J D, Murchelano R A, Okihiro M S.,1992. Histopathologic markers. In: Huggett R, Kimerle R, Mehrle P, Bergman H (eds) *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Boca Raton: Lewis Publishers. pp.155-209.

Hodgson E, Rose R L, 2008. Metabolic interactions of agrochemicals in humans. *Pest Manag Sci* 64(6):617-21.

Holcombe G W, Phipps G L, Tanner D K, 1982. The acute toxicity of kelthane, dursban, disulfoton, pydrin, and permethrin to fathead minnows *Pimephales promelas* and rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Environ Pollut* 29(3):167-78.

Holeton G F, Neumann P, Heisler N, 1983. Branchial ion exchange and acid-base regulation after strenuous exercise in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Respir Physiol* 51: 303–318, 1983.

Holopainen I J, Hyvärinen H, 1984. Ecology and physiology of Crucian carp (*Carassius carassius* L.) in small Finnish ponds with anoxic conditions in winter. *Verhandlungen. Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie* Vol. 22, No. 4, pp. 2566-2570.

Hootman S R, Philpott C W, 1979. Ultracytochemical localization of Na⁺/K⁺-activated ATPase in chloride cells from gills of euryhaline teleost. *The Anatomical Record* 193: 99-130.

Hughes G M, 1979. Scanning electron microscopy of the respiratory surface of trout gills. *Journal of Zoology*; 188, 443-453.

Humphrey C D, Pittman F E, 1974. A simple methylene blue-azure ii-basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Biotechnic & Histochemistry*, Vol. 49, No. 1 : Pages 9-14.

Huynh H P V, Nugegoda D, 2012. Effects of chlorpyrifos exposure on growth and food utilization in Australian catfish, *Tandanus tandanus*. Bull Environ Contam Toxicol 88(1):25-9.

Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T, Marumo F, 1994. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91: 6269-6273.

Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F, Sasaki S, 1997. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. Journal of Biological Chemistry 272: 20782-20786.

Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Tanaka Y, Marumo F, Sasaki S., 1998. Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. Biochemistry and Biophysics Research Communications 244: 268-274.

Ishibashi K, Morinaga T, Kuwahara M, Sasaki S, Imai M, 2002. Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as aquaglyceroporin. Biochimica et Biophysica Acta 1576:335-340.

ISPRA, 2013. Rapporto nazionale pesticidi nelle acque. Dati 2009-2010.

Issa A M, Gawish A M, Esmail G M, 2011. Histological Hazards of Chlorpyrifos usage on dills and kidneys of *Tilapia nilotica* and the role of vitamin E supplement in Egypt. Life Science Journal; 8(4).

IUPAC, 2012. Pesticide Properties Database. International Union of Pure and Applied Chemistry. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/154.htm>.

Javid A, Muhammad J, Abdullah S, Ali Z, 2007. Bio-accumulation of Lead in the Bodies of Major Carps (*Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhina mrigala*) during 96-h LC50 Exposures. Int. J. Agri. Biol., Vol. 9, No. 6.

Jayawardena U A, Rajakaruna R S, Navaratne A N, Amerasinghe P H, 2010. Toxicity of agrochemicals to common hourglass tree frog (*Polypedates cruciger*) in acute and chronic exposure. Int J Agric Biol 12:641-8.

Jensen F B, 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. Comp. Biochem. Physiol. A 135, 9-24.

Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, Schulz R, 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina Chemosphere 61(6): 817-26.

Jin Y, Zhang X, Shu L, Chen L, Sun L, Qian H, Liu W, Fu Z, 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere* 78 846–852.

Jiraungkoorskul W, Upatham E, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grans S and Pokethitiyook P, 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.*; 18 (4): 260–267.

Julliard A K, Saucier D, Astic L, 1993. Effects of chronic low-level copper exposure on ultrastructure of the olfactory system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Histol. Histopathol.* 8, 655-672.

Jürss K, Bastrop R, 1995. The function of mitochondria-rich cells (chloride cells) in teleost gills. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5: 235-255.

Kalender Y, Kaya S, Durak D, Uzun F G, Demir F, 2012. Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 33(2):141-8.

Kaneko T, Watanabe S, Lee K M, 2002. Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts. *Aqua-BioSci. Monogr. (ABSM)*, Vol. 1, No. 1, pp. 1–62.

Kaneko U K T, Hirano Y K T, 1996. Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill and lamellae and changes in Na^+/K^+ -ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. *The Journal of Experimental Zoology* 276:193-200.

Kang H G, Jeong S H, Cho J H, Kim D G, Park J M, Cho M H, 2004. Chlorpyrifos-methyl shows anti-androgenic activity without estrogenic activity in rats. *Toxicology.* 1; 199(2-3):219-30.

Kang C K, Liu F C, Chang W B, Lee T H, 2012. Effects of low environmental salinity on the cellular profiles and expression of Na^+/K^+ -ATPase and Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter 1 of branchial mitochondrion-rich cells in the juvenile marine fish *Monodactylus argenteus*. *Fish Physiol Biochem*;38(3):665-78.

Karnaky K J Jr, Degnan K J, Garretson L T, Zadunaisky J A, 1984. Identification and quantification of mitochondria-rich cells in transporting epithelia. *American Journal of Physiology*, 246 (Regulatory Integrative Comparative Physiology 15), R770-R775.

Katti S R, Sathyanesan A G, 1986. Lead nitrate induced changes in the brain constituents of the freshwater fish *Clarias batrachus* (L). *Neurotoxicology* 7, 47–51.

Kavitha P, Rao J V, 2008. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environ Toxicol Pharmacol* 26(2):192-8.

Kaya S, Pirincci I, Bilgili A, 2002. Toxicology in Veterinary Medicine (2nd edn), Medisan, Ankara.

Kelderman P, Osman A A, 2007. Effect of redox potential on heavy metal binding forms in polluted canal sediments in Delft (The Netherlands). *Water Res* 41:4251–4261.

Kendall M W, Dale J E, 1979. Scanning and transmission electron microscopic observations of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gill. *Journal of Fish Research. Bosrd Can.*, 36: 1072-1079.

Kent G C., 1997. Anatomia comparata dei vertebrati; a cura di Gerzeli G, Barni S, Gervaso M V. Piccin-Nuova Libreria

Khan H A, Sikdar-Bar M, Kamlesh B, Adil Ahmad W, Ahmed P, 2011. Lead nitrate induced histopathological changes in the gills of the African catfish *Clarias batrachus*. *Journal of Applied Sciences Research*, 7(7): 1087-1092.

Khrrer J P, 1993. Free radicals as mediator of tissue injury and disease, *Crit. Rev. Toxicol.* 23; 21–48.

Kikuchi M, Miyazaki T, Wakabayashi M, 1996. Evaluation of pesticides used in golf links by acute toxicity test on rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 62: 414–419.

Kim J Y, Oh K N, Han E H, Kim D H, Jeong T C, Lee E S, Jeong H G, 2005. Methoxychlor-induced inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokines expression in macrophages via NF-kappa B, ERK, and p38 mitogen-activated protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 1234–1240.

King L S, Kozono D, Agre P, 2004. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 687-698.

Kudo S, Norihiko K, 1983. Transmission electron microscopic studies on bacterial gill disease in rainbow trout fingerlings. *Japanese journal of Ichthyology*, Vol. 30, no.3.

Kunjamma A K P, Philip B, Bhanu S V, Jose J, 2008. Histopathological effects on *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) exposed to chlorpyrifos. *Journal of Environmental Research and Development* Vol. 2 No.4.

Lajmanovich R C, Attademo A M, Peltzer P M, Junges C M, 2009. Inhibition and recovery of cholinesterases in *Odontophrynus americanus* tadpoles exposed to fenitrothion. *Journal of Environmental Biology* 30(5):923-926.

Langston W J, Chesman B S, Burt G R, Pope ND, McEvoy J, 2002. Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? *53 (3):263-293.*

Lappivaara J, Nikinmaa M, Tuurala H, 1995. Arterial oxygentension and the structure of the secondary lamellae of the gills in rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to zinc and during recovery. *Aquat. Toxicol.* 32, 321–331.

Larsson, A., 1976. Some haematological and biochemical effects of cadmium on fish. In: A.P.M. Lockwood (Ed.) *Effects of pollutants on aquatic organisms*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 35-45.

Lassiter T L, Brimijoin S, 2008. Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos. *Neurotoxicol Teratol* 30:125–130 822.

Latif A, Ali M, Sayyed H, Iqbal F, Usman K, Rauf M, Kaoser R, 2013. Effect of copper sulphate and lead nitrate, administered alone or in combination, on the histology of liver and kidney of *Labeo rohita*. *Pakistan J. Zool.*, vol. 45(4), pp. 913-920.

Laurent P, Dunel S, 1980. Morphology of gill epithelia in fish. *American Journal of Physiology*, 238 (Regulatory Integrative Comparative Physiology 7), R147-R159.

Laurent P, 1984. Gill internal morphology. *Fish Physiology* XA, 73 - 183.

Laurent P, Hebibi N, 1989. Gill morphometry and fish osmoregulation. *Canadian Journal of Zoology*, 67(12): 3055-3063, 10.1139/z89-429.

Laurent P, Perry S F, 1991. Environmental effects on fish gill morphology, *Physiol. Zool.*, 64: 4-25.

Lee J E, Park J H, Shin I C, Koh H C, 2012. Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. *Toxicol Appl Pharmacol* 263(2):148-62.

Lee T H, Feng S H, Lin C H, Hwang Y H, Huang C L, Hwang P P, 2003. Ambient salinity modulates the expression of sodium pumps in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zool Sci* 20:29–36.

Lee W J, Blair A, Hoppin J A, Lubin J H, Rusiecki J A, Sandler D P, Dosemeci M, Alavanja M C R, 2004. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. *J Natl Cancer Inst* 96(23):1781-9.

Lehninger, 2005. *Principles of Biochemistry*. David L. Nelson & Michael M. Cox, W.H. Freeman and Company, New York.

Leino R L, McCormick J H, 1993. Responses of juvenile largemouth bass to different pH and aluminum levels at overwintering temperatures – effects on gill

morphology, electrolyte balance, scale calcium, liver glycogen, and depot fat. Canadian J. Zoology-Revue Canadienne De Zoologie 71, 531-543.

Lever C, 1996. Naturalized fishes of the world: Academic Press, 408 p.

Li X, Liu L, Zhang Y, Fang Q, Li Y, Li Y, 2013. Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Chemosphere. (2):428-33.

Liem K F, Bemis W E, Walker W F, Grande L, 2012. Anatomia comparata dei vertebrati: una visione funzionale ed evolutiva. - 2. ed.- Napoli : Edises.

Liew F Y, Milliott S, Parkinson C, Palmer R M J, Moncada S, 1990. Macrophage killing of Leishmania parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. J. Immunol. 144, 4794–4797.

Lignot J H, Cutler C P, Hazon N, Cramb G, 2002. Immunolocalisation of aquaporin 3 in the gill and the gastrointestinal tract of the European eel *Anguilla anguilla* (L.). The Journal of Experimental Biology 205: 2653–2663.

Lin H C, Sung W T, 2003. The distribution of mitochondriarich cells in the gills of air-breathing fishes. Physiol Biochem Zool 76:215–228.

Lin C H, Huang C L, Yang C H, Lee T H, Hwang P P, 2004a. Time-course changes in the expression of Na⁺/K⁺-ATPase and the morphometry of mitochondrion-rich cells in gills of euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during freshwater acclimation. J Exp Zool 301A:85–96.

Lin C H, Tsai R S, Lee T H, 2004b. Expression and distribution of Na⁺/K⁺-ATPase in gills and kidneys of the green spotted pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. Comp Biochem Physiol 138A:287–295.

Linde A R, Sánchez-Galán S, Klein D, García-Vázquez E, Summer K H, 1999. Metallothionein and heavy metals in brown trout (*Salmo trutta*) and European eel (*Anguilla anguilla*): a comparative study. Ecotoxicol Environ Saf. Oct;44(2):168-73.

Lu J L, 2011. Farmers' exposure to pesticides and pesticide residues in soil and crops grown in Benguet Philippines. Phil J Crop Sci 36(3):19-27.

Ma J, Liu Y, Niu D, Li X, 2013. Effects of chlorpyrifos on the transcription of CYP3A cDNA, activity of acetylcholinesterase, and oxidative stress response of goldfish (*Carassius auratus*). Environ Toxicol. doi: 10.1002/tox.21918.

Machado M R, Fanta E, 2003. Effects of the organophosphorus Methyl Parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. Braz Arch Biol Technol; 46:361–72.

Mackay D, Shiu W-Y, Ma K-C, 1999. Physical-chemical Properties and Environmental Fate Handbook. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.

Maetz J, 1972. Branchial sodium exchange and ammonia excretion in the goldfish, *Carassius auratus*. Effects of ammonia loading and temperature change. *J Exp Biol* 56: 601–620.

Maetz J, 1973. $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, Na^+/H^+ exchanges and NH_3 movement across the gill of *Carassius auratus*. *J. Exp. Biol.* 58, 255-275.

Mallatt J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42: 630-648.

Manahan S E, 2000. Chimica dell'ambiente. *Piccin*, Padova.

Martinez C B R, Nagae M Y, Zaia, C T B V, Zaia D A M, 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.*, 64(4): 797-807.

Martini F, 1994. Fondamenti di anatomia e fisiologia. Napoli; Edises.

Mazon A. F, Cerqueira C C C, Fernandes M N, 2000. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environmental Research Section A* 88, 52-63.

McCarthy F, Shugart L R, 1990. Biomarkers of environmental contamination. Lewis Pub. Chelsea USA.

McMahon T A, Halstead N T, Johnson S, Raffel T R, Romansic J M, Crumrine P W, Boughton R K, Martin L B, Rohr J R, 2011. The fungicide chlorothalonil is nonlinearly associated with corticosterone levels, immunity, and mortality in amphibians. *Environ Health Perspect*;119(8):1098-103.

Meire R O, Lee S C, Yao Y, Targino A C, Torres J P, Harner T, 2012. Seasonal and altitudinal variations of legacy and current-use pesticides in the Brazilian tropical and subtropical mountains. *Atmos Environ* 59:108-16.

Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor L S, Cox G W, Varesio L, 1995. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* 182(6):1683–1693.

Mishra A, Devi Y., 2014. Histopathological alterations in the brain (optic tectum) of the freshwater teleost *Channa punctatus* in response to acute and subchronic exposure to the pesticide Chlorpyrifos. *Acta Histochemica* 116 176–181.

Mitchell L G, Mutchmor J A, Dolphin W D, 1991. *Zoologia*. Ed. Zanichelli, Bologna.

Mitrovic D, Dymowska A, Nilsson G E, Perry S F, 2009. Physiological consequences of gill remodeling in goldfish (*Carassius auratus*) during exposure to long-term hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 297(1):R224-34.

Mohamed F A S, 2008. Bioaccumulation of selected metals in and histopathological alterations in tissues of *Oreochromis niloticus* from Lake Nasser. *Egypt, J. Global Veterinaria*, 2 (4): 205-218.

Mojetta A, Ghisotti A., 2000. *Flora e fauna del Mediterraneo*. Ed. Mondadori, Milano.

Monteiro D A, Rantin F T, Kalinin A, 2010. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology* 19:105–123.

Morrison R, Nowak B, Carson J, 2001. The histopathological effects of a levamisole-adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*; 195: 23-33.

Muddasir B, Dhar J K, Shafiq A, Sabia Q, Ahmad I, 2012. Contamination of freshwater fish “*Schizothorax niger*” with chlorpyrifos from “Dal Lake” basins, India. *Int J Pharma Sci Res* 3(12):535-42.

Muley D Y, Mane U H, 1986. Toxicity of endosulfan 35 EC to estuarine edible clam *Katelysia opima* (Gmelin) from west coast of India. *Proc Natl Symp Environ Biol*; 117-123.

Murty A S, 1986. *Toxicity of Pesticides to Fish, Vol. II*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Muus B J, Dahlstrom P, 1978. *Collins guide to the freshwater fishes of Britain and Europe*. Collins, London, England. 222 pp.

Nathan C, Xie Q, 1994. Nitric oxide 3 synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915–918.

Nekoubin H, Gharedaashi E, Hatefi S, Sudagar M, Shahriari R, Asgharimoghadam A, 2012a. Determination of LC50 of copper sulfate and lead (II) nitrate and behavioral responses of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Walailak Journal of Science and Technology* Vol 9, No 4.

Nekoubin H, Gharedaashi E, Hosseinzadeh M, Imanpour M R, 2012b. Determination of LC50 of lead nitrate and copper sulphate in common carp (*Ciprinus carpio*). *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* 4 (2): 60-63.

Nero V, Farwell A, Lister A, Van der Kraak G, Lee L E, Van Meer T, MacKinnon M D, Dixon D G, 2006. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicol Environ Saf*;63(3):365-77.

Nonnotte G, Kirsch R, 1978. Cutaneous respiration in seven seawater teleosts. *Respiration Physiology* 35: 111-118. *International Review of Cytology* 130: 191-232.

NRA, 2000. The NRA Review of Chlorpyrifos September 2000 Volume 1. NRA Review Series 00.5. National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, Canberra
http://www.apvma.gov.au/products/review/docs/chlorpyrifos_summary.pdf

NPIC, 2009. Chlorpyrifos Technical Factsheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University, Corvallis.
<http://npic.orst.edu/factsheets/chlorptech.pdf>.

Nwani C D, Ugwu D O, Okeke O C, Onyishi G C, Ekeh F N, Atama C, Eneje L O, 2013. Toxicity of the chlorpyrifos-based pesticide Termifos®: effects on behaviour and biochemical and haematological parameters of African catfish *Clarias gariepinus* *African Journal of Aquatic Science* Volume 38, Issue 3.

Olsvik P A, Ørnsrud R, Lunestad B T, Steine N, Fredriksen B N, 2014. Transcriptional responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to deltamethrin, alone or in combination with azamethiphos. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*; 162:23-33.

Ortiz J B, De Canales M LG, Sarasquete C, 2003. Histopathological changes induced by lindane (gamma-HCH) in various organs of fishes. *Sci. Mar.* 67 (1), 53–61.

Oruc E O, 2010. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pestic Biochem Physiol* 96(3):160-6.

Oruc E O, 2012. Oxidative stress responses and recovery patterns in the liver of *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos-ethyl. *Bull Environ Contam Toxicol* 88(5):678-84.

Padoa E, 1986. *Manuale di anatomia comparata dei vertebrati* - ed. Feltrinelli, Milano.

Palaniappan P L, Sabhanayakam S, Krishnakumar N, Vadivelu M, 2008. Morphological changes due to lead exposure and the influence of DMSA on the gill tissues of the freshwater fish, *Catla catla*. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 2440-2444.

Palmer L A, Semenza G L, Stoler M H, Johns R A, 1998. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol-Lung C* 18(2):L212–L219.

PAN UK, 2001. Chlorpyrifos pollution kills fish. *Pestic News* 53:11.

PAN (Pesticide Action Network), 2007. Chlorpyrifos Factsheet. Pesticide Action Network North America, 49 Powell St #500, San Francisco, CA 94102 www.panna.org.

PAN (Pesticide Action Network), 2011. PAN International List of Highly Hazardous Pesticides (PAN List of HHP). Pesticide International. http://www.pan-germany.org/download/PAN_HHP-List_1101.pdf.

Pandey S, Parvez S, Ansari R A, Ali M, Kaur M, Hayat F, Ahmad F, Raisuddin S, 2008. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chemico-Biological Interactions* 174 183–192.

Panuwet P, Prapamontol T, Chantara S, Barr D B, 2009. Urinary pesticide metabolites in school students from northern Thailand. *Int J Hyg Environ Health* 212(3):288-97.

Parashar R S, Banerjee T K, 1999. Histopathological analysis of sublethal toxicity induced by lead nitrate to the accessory respiratory organs of the air-breathing teleost, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) Pol. *Arch. Hydrobiol.* 46, 194-205.

Parashar R S, Banerjee T K, 2002. Toxic impact of lethal concentration of lead nitrate on the gills of air-breathing catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Veterinarski Arhiv* 72 (3), 167-183.

Parvez S, Sayeed I, Raisuddin S, 2006. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. *Ecotoxicol Environ Saf*;65(1):62-6.

Pascoe D, Evans S A, Woodworth J, 1986. Heavy metal toxicity to fish and the influence of water hardness. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 15 (5):481-487.

Patel M, Rogers J T, Pane E F, Wood C M, 2006. Renal responses to acute lead waterborne exposure in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 80 362–371.

Peakall D B, 1992. *Animal biomarkers as pollution indicators*. Chapman and Hall, New York.

Peakall D B, 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). *Introduction to Ecotoxicology* 3: 157–160.

Pelgrom S M, Lamers L P, Lock R A, Balm P H, Bonga SE, 1995. Interactions between copper and cadmium modify metal organ distribution in mature tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Environ Pollut*; 90(3):415-23.

Penttinen O P, Holopainen I J, 1992. Seasonal feeding activity and ontogenetic dietary shifts in Crucian carp, *Carassius carassius*. *Environmental Biology of Fishes* Vol. 33, Nos. 1-2, pp. 215-221.

Perry S F, 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishs. *Annual Review of Physiology* 59: 325- 347.

Perry S F, Malone S, Ewing D, 1986. Hypercapnic acidosis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Branchial ionic fluxes and blood acid-base status. *Can J Zool* 65: 888–895, 1986.

Perugini M, Visciano P, Manera M, Zaccaroni A, Olivieri V, Amorena M, 2014. Heavy metal (As, Cd, Hg, Pb, Cu, Zn, Se) concentrations in muscle and bone of four commercial fish caught in the central Adriatic Sea, Italy *Environ Monit Assess* (2014) 186:2205–2213.

Phillips M J, Roberts R J, Stewart J A, Codd G A, 1985. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Richardson. J Fish Dis* 1985; 8:339-344.

Phipps G L, Holcombe G W, 1985. A method for aquatic multiple species toxicant testing: acute toxicity of 10 chemicals to 5 vertebrates and 2 invertebrates. *Environ. Pollut.* 38A:141-157.

Phung D T, Connell D, Miller G, Chu C, 2012. Probabilistic assessment of chlorpyrifos exposure to rice farmers in Viet Nam. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 22(4):417-23.

Pisam, M, Rambourg, A, 1991. Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of Teleost fishes: an ultrastructural approach. *International Review of Cytology* 130: 191-232.

PMRA (Pest Management Regulatory Agency), 2000. Environmental Assessment of Chlorpyrifos. Environmental Assessment Division, Pest Management Regulatory Agency, Ottawa, Ontario. (unpublished)

Poleksic V, Mitrovic-Tutundzic, V, 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish* (R. Muller & R. Lloyd, eds.), pp 339–352. FAO, Fishing News Books, Oxford, UK.

Poli A, 2006. *Fisiologia degli animali. Regolazione Diversità Adattamento*. Zanichelli Ed., Bologna.

Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E, 2011. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Rev Environ Contam Toxicol*; 213:113-36.

Pratap H B, Wendellar Bonga S. E. 1993. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gills of freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambientwater. *Aquatic Toxicology* 26: 133-150.

Pritz C M F, Schrlau J E, Simonich S L M, Blett T F, 2014. Contaminants of emerging concern in fish from western U.S. and Alaskan National Parks —

spatial distribution and health thresholds. Journal of the American Water Resources Association Vol. 50, no. 2: 309-323.

Provini A, Galassi S, Marchetti R., 1998. Ecologia Applicata. Città Studi Ed., Milano.

Qiang J, Wang H, Kpundeh M D, Hea J, Xua P, 2013. Effect of water temperature, salinity, and their interaction on growth, plasma osmolality, and gill Na^+ , K^+ -ATPase activity in juvenile GIFT tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). Journal of Thermal Biology 38; 331–338.

Rabiet M, Margoum C, Gouy V, Carluer N, Coquery M, 2010. Assessing pesticide concentrations and fluxes in the stream of a small vineyard catchment – Effect of sampling frequency. Environmental Pollution, 158: 737–748.

Racke K D, 1993. Environmental fate of chlorpyrifos. Rev Environ Contam Toxicol 131:1-150.

Rademacher D J, Steinpreis R E, Weber DN, 2001. Short-term exposure to dietary Pb and/or DMSA affects dopamine and dopamine metabolite levels in the medulla, optic tectum, and cerebellum of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pharmacol. Biochem. Behav. 70, 199–207.

Rademacher D J., Steinpreis R E, Weber D N, 2003. Effects of dietary lead and/or dimercaptosuccinic acid exposure on regional serotonin and serotonin metabolite content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Neurosci. Lett. 339, 156–160.

Raina S, Preston G M, Guggino W B, Agre P, 1995. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. Journal of Biological Chemistry 270: 1908-1912.

Rajkumar J S I, 2012. Marine organisms in toxicological approach for the assessment of environmental risk associated with Cd, Cu, Pb and Zn. Universal Journal of Environmental Research and Technology Volume 2, Issue 2: 19-25.

Ramesh M, Saravanan M, Kavitha C, 2009. Hormonal responses of the fish, *Cyprinus carpio*, to environmental lead exposure. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (17), pp. 4154-4158.

Rand A S P, Monserrat J M, Rodriguez E M, Romano L A, 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae) Journal of Fish Diseases 19, 311-322.

Randall D, Burggren W, French K, 1999. Fisiologia animale. Meccanismi e adattamenti (illustrato). Zanichelli Ed., Bologna.

Randi A S, Monserrat J M, Rodriguez E M, Romano L A, 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish,

Macropsobrycon uruguayanae Eigenmann (Pisces, Atherinidae). Journal of Fish Diseases; 19, 311-322.

Rao V J, Kavitha S D, Madhavendra P, 2003. Toxic effects of profenofos on tissue acetylcholinesterase and gill morphology in a euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. Arch. Toxicol, 77(4), 227-232.

Rao J V, Begum G, Pallela R, Usman P K, Rao RN, 2005. Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish, *Gambusia affinis* in response to the sub-lethal exposure to chlorpyrifos. Int J Environ Res Public Health;2(3-4):478-83.

Rawlings N C, Cook S J, Waldbillig D, 1998. Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2,4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. J Toxicol Environ Health A 54(1):21-36.

Reigart J R, Roberts JR, 1999. Recognition and Management of Pesticide Poisoning. Fifth Edition. U.S. Environmental Protection Agency, Washington. <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/healthcare/handbook/handbook.htm>

Rice C, Birnbaum L S, Cogliano J, Mahaffey K, Needham L, Rogan W J, vom Saal F S, 2003. Exposure assessment for endocrine disruptors: some considerations in the design of studies. Environ Health Perspect 111:1683–1690.

Richards S M. Kendall R J, 2003. Physical effects of chlorpyrifos on two stages of *Xenopus laevis*. J Toxicol Environ Health A 66(1):75-91.

Richendrfer H, Pelkowski S D, Colwill R M, Créton R, 2012. Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behaviour in zebrafish larvae. Neurotoxicol Teratol 34(4):458-65.

Richmonds C, Dutta H M, 1989. Histopathological changes induced by malathion in the gills of bluegill *Lepomis macrochirus*. Bull Environ Contam Toxicol;43(1):123-30.

Riise G, Lundekvam H, Wu QL, Haugen LE, Mulder J, 2004. Loss of pesticides from agricultural fields in SE Norway—runoff through surface and drainage water. Environmental geochemistry and health. 26: 269-276.

Roberts R J, 2001. Fish Pathology. 3rd (Ed.), W.B. Saunders, New York.

Robles-Mendoza C, García-Basilio C, Cram-Heydrich S, Hernández-Quiroz M, Vanegas-Pérez C, 2009. Organophosphorus pesticides effect on early stages of the axolotl *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Caudata). Chemosphere 74:703–710.

Rodrigo B, Leal A, Ribeiro S J, Possern T, Cordova F M, Rigon A P, Zaniboni Filho E, Bairy A C D, 2006. Modulation of ERK1/2 and p38MAPK by lead in the cerebellum of Brazilian catfish *Rhamdia quelen*. Aquatic Toxicology 77

(2006) 98–104.

Rodriguez A L, Bellinaso M L, Dick T, 1989. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinate dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* Volume 94, Issue 1, 1989, Pages 65–69.

Rogers J T, Richards J G Wood C M, 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* Volume 64, Issue 2, 16, Pages 215–234.

Rogers J T, Wood C M, 2004. Characterization of branchial lead-calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 207, 813-825.

Rogers J T, Patel M, Gilmour Wood C M, 2005. Mechanisms behind Pb-induced disruption of Na⁺ and Cl⁻ in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol.* 2.

Rohr J R, Sager T, Sesterhenn T M, Palmer B D, 2006. Exposure, Postexposure, and density-mediated effects of atrazine on amphibians: breaking down net effects into their parts. *Environ Health Perspect* 114:46–50.

Roncero V, Vincente J A, Redondo E, Gazquez A, Duran E, 1990. Microscopic and ultrastructural study of the gills of tench (*Tinca tinca*, L.). *Environmental Health Perspectives* Vol. 89, pp. 137-144.

Roy S, Chatteraj A, Bhattacharya S, 2006. Arsenic-induced changes in optictectal histoarchitecture acetylcholinesterase–acetylcholineprofile in *Channa punctatus*: amelioration by selenium. *ComputBiochem Physiol C*; 144:16–24.

Salati A P, Ferrando S, Movahedinia A, Gambardella C, Gallus L, 2014. Effect of different levels of salinity on immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase and Aquaporin 3 in kidney of common carp *Cyprinus carpio*. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University* Vol. 15, No. 1, Ser. No. 46, Pages 45-49.

Sandahl J F, Baldwin D H, Jenkins J J, Scholz N L, 2005. Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem* 24(1):136-45.

Sapozhnikova Y, Bawardi O, Schlenk D., 2004. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere* 55(6):797-809.

Sarkar A, Ray D, Shrivastava A E, Sarker S, 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15:333–340.

Saucier D, Astic L, Rioux P, Godinot F, 1990. Histopathological changes in the olfactory organ of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by early chronic exposure to a sublethal copper concentration. *Can. J. Zool.* 69, 2239-2245.

Schimmel S C, Garnas R L, Patrick J M Jr, Moore J C, 1983. Acute toxicity, bioconcentration, and persistence of AC 222,705, benthocarb, chlorpyrifos, fenvalerate, methyl parathion, and permethrin in the estuarine environment. *J Agric Food Chem.* 1983;31(1):104-13.

Schoor W P, Plumb J A, 1994. Induction of nitric oxide syntase in channel catfish, *Ictalurus punctatus* by *Edwardsiella ictaluri*. *Disease of Aquatic Organism* 19: 153-155.

Schwartz J, 1994. Low-level lead exposure and children's IQ: a metaanalysis and search for a threshold. *Environmental Research* Volume 65, Issue 1, April 1994, Pages 42–55.

Sedlavec V, 1986. Non ferrous metals and alloys, Elsevier.

Segeman J J, Brouwer M, Di Giulio R T, Forlin L, Fowler B A, Sanders B M, Van Veld P A, 1992. Molecular response to environmental contamination: enzyme and protein system as indicator of chemical exposure and effect. – In: Huggett R J, Kimerle R A, Mehrle P M Jr, Bergman H L (eds.), *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress.* Lewis Publisher, MI, USA: 253-336.

Shah S L, Altindaú A, 2005. Effects of heavy metal accumulation on the 96-h LC50 values in tench *Tinca tinca* L., 1758. *Turk J Vet Anim Sci* 29; 139-144.

Shelley L K, Balfry S K, Ross P S, Kennedy C J, 2009. Immunotoxicological effects of a sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 92:95–103.

Shi H H, Wang X R, Luo Y, Su Y, 2005. Electron paramagnetic resonance evidence of hydroxyl radical generation and oxidative damage induced by tetrabromobisphenol A in *Carassius auratus*. *Aquat Toxicol* 74:365–371.

Singh N N, Das V K, Srivastava A K, 2002. Insecticides and ionic regulation in teleosts: a review. *Zoologica Poloniae*; 47/3-4: 21-36.

Slotkin T A, Seidler F J, 2009. Oxidative and excitatory mechanisms of developmental neurotoxicity: transcriptional profiles for chlorpyrifos, diazinon, dieldrin, and divalent nickel in PC12 cells. *Environ Health Perspect* 117(4):587-96.

Smith J L, Boyer G L, Zimba P V, 2008. A review of cyanobacterial odours and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*; 280:5–20.

Sollid J, Nilsson G E, 2006. Plasticity of respiratory structures--adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Respir Physiol Neurobiol*;154(1-2):241-51.

Sollid J, Rissanen E, Tranberg H K, Thorstensen T, Vuori K A, Nikinmaa M, Nilsson G E, 2000. HIF-1 α and iNOS levels in crucian carp gills during hypoxia-induced transformation. *J Comp Physiol B*; 176(4):359-69. Epub 2005 Dec 14.

Sollid J, De Angelis P, Gundersen K, Nilsson G E, 2003. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *J. Exp. Biol.* 206, 3667-3673.

Sollid J, Weber R E, Nilsson G E, 2005. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. *J Exp Biol*;208 (Pt 6):1109-16.

Sorensen E.M.B., 1991. Lead. In: *Metal Poisoning in Fish*. CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 95–11889, R463–R472.

Sparling D W, Fellers G M, 2009. Toxicity of two insecticides to California, USA, Anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environ Toxicol Chem* 28(8):1696-1703.

Sparling D W, Fellers G M, McConnell L L, 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environ Toxicol Chem* 20(7):1591-5.

Sprague J B, 1969. Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water research* 3:793-821.

Staggl R, Goksoyr A, Rodger G, 1992. Changes in branchial Na⁺/K⁺-ATPase, metallothionein and P450 1A1 in dab *Limanda limanda* in the German Bight: indicators of sediment contamination? *Marine Ecology Progress Series* Vol. 91: 105-115.

Staicu A C, Munteanu M C, Dinischiotu A, 2008. Malathion induced histological modifications in gills and kidney of *Carassius auratus gibelio*. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*; Vol 41, No 1.

Stegeman J J, Brouwer M, Richard T D G, Forlin L, Fowler B A, Sanders B M, van Veld P A, 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R J, Kimerly R A, Mehrle P M Jr, Bergman H L (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 235/335.

Storrs S I, Kiesecker J M, 2004. Survivorship patterns of larval amphibians exposed to low concentrations of atrazine. *Environ Health Perspect* 112:1054–1057.

Sun F, Chen H S, 2008. Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: investigation of possible sources. *Chemosphere* 71(10):1866-9.

Takashima F, Hibiya T, 1995. An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features, 2nd ed. Kodansha, Tokyo.

Thornton I, Rautiu R, Brush S, 2001. Lead: the facts, IC Consultants Ltd.

Tipsmark C K, Madsen S S, Seidelin M, Christensen A S, Cutler C P, Cramb G, 2002. Dynamics of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter and Na⁺/K⁺-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Zool* 293:106–118.

Tiwari P, Ansari B A, 2013. Histopathological alterations in the gill, liver and brain of *Cyprinus carpio* on exposure to quinalphos. *American Journal of Life Sciences*; 2(4): 211-216.

Tiwari P, Ansari B A, 2014. Comparative Study of Acute Toxicities of Endosulfan, Chlorpyrifos and Permethrin to Zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB) Sch. Acad. J. Biosci; 2(7): 404-409.

Tripepi S, Mauceri A, Brunelli E, Corapi B, Limetti F, Fasulo S, 2006. Tolleranza al Cadmio in *Thalassoma pavo*: valutazione di alcuni parametri morfo-funzionali dell'apparato branchiale. 67°Congresso Nazionale UZI. Napoli 12-15.

Tuncel S G, Oztas N B, Erduran M S, 2008. Air and groundwater pollution in an agricultural region of the Turkish Mediterranean coast. *J Air Waste Manag Assoc* 58(9):1240-9.

Tuurala H, Egginton S, Soivio A, 1998. Cold exposure increases branchial water–blood barrier thickness in the eel. *J. Fish. Biol.* 53, 451–455.

Tyl R W, 2009. Basic exploratory research versus guideline compliant studies used for hazard evaluation and risk assessment: bisphenol A as a case study. *Environ Health Perspect* 117:1644–1651.

Tyl R W, 2010. In honor of the Teratology Society's 50th anniversary: the role of Teratology Society members in the development and evolution of in vivo developmental toxicity test guidelines. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90:99–102.

Ureña R, Peri S, del Ramo J, Torreblanca A, 2007. Metal and metallothionein content in tissues from wild and farmed *Anguilla anguilla* at commercial size. *Environ Int.*;33(4):532-9.

US-EPA, 1997. Interim Reregistration Decision for Chlorpyrifos. EPA 738-R-01-007. US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.

US-EPA, 2004. Overview of the Ecological Risk Assessment Process in the Office of Pesticide Programs. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances. Office of Pesticide Programs. Washington, D.C.

US-EPA. 2006. Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos. United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

US-EPA, 2009. Chlorpyrifos Summary Document Registration Review: Initial Docket March 2009. Docket Number: EPA-HQOPP- 2008-0850. Case #0100. United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

US-EPA, 2011. Memorandum. Chlorpyrifos: Preliminary Human Health Risk Assessment for Registration Review. DP No.D388070. June 30th. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

US-EPA, 2013. Chlorpyrifos: Preliminary Evaluation of the Potential Risks from Volatilization. Document ID: EPA-HQOPP-2008-0850-0114. United States Environmental Protection Agency, Washington.

Van de Oost R, Beber J, Vermeulen N P E, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13 (57–149).

van den Heuvel M R, Power M, Richards J, MacKinnon M, Dixon D G, 2000. Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters. *Ecotoxicol Environ Saf*; 46(3):334-41.

Vandenberg L N, Colborn T, Hayes T B, Heindel J J, Jacobs D R Jr, Lee D H, Shioda T, Soto A M, vom Saal F S, Welshons W V, Zoeller R T, Myers JP, 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*;33(3):378-455.

Vandenberg L., 2012. State of the science in non-monotonic dose responses. Presentation at Workshop 'Low Dose Effects and Non-Monotonic Dose Responses for Endocrine Active Chemicals'. Berlin 11-13 September. Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection, European Commission. http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/food-cons-prod/endocrine_disrupters/presentations-workshop-low-dose-effects-endocrine-activechemicals

Velmurugan B, Selvanayagam M, Cengiz E, Unlu E, 2007. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environ Toxicol Pharmacol*;24(3):286-91.

Velmurugan B, Mathews T, Cengiz E I., 2009. Histopathological effects of cypermethrin on gill, liver and kidney of fresh water fish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), and recovery after exposure. *Environ Technol*; 30:1453–60.

Ventura C, Núñez M, Miret N, Lamas D M, Randi A, Venturino A, Rivera E, Cocca C, 2012. Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide. *Toxicol Lett* 213(2):184-93.

Verma R S, Mehta A, Srivastava N, 2009. Comparative studies on chlorpyrifos and methyl parathion induced oxidative stress in different parts of rat brain: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pestic Biochem Physiol* 95(3):152-8.

Verma S A, Jain M, Tonk I P, 1983. *In vivo* effects of mercuric chloride on tissue ATPases of *Notopterus notopterus*. *Toxicol. Lett.* 16, 305–309.

Vinodhini R, Narayana M, 2009. Heavy metal induced histopathological alterations in selected organs of the *Cyprinus carpio* L. (common carp). *Int J Environ Res*; 3:95–100.

Virabhadrachari V, 1961. Structural changes in the gills, intestine and kidney of *Etroplus maculatus* (Teleostei) adapted to different salinities. *Journal Microscopic Science* 102:361-369.

Viswanath G, Chatterjee S, Dabral S, Nanguneri S R, Divya G, Roy P., 2010. Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120(1):22-9.

Wang C, Lu G, Cui J, 2010 Responses of AChE and GST Activities to insecticide coexposure in *Carassius auratus*. *Environ Toxicol* 27: 50–57, 2012.

Wang C, Lu G, Cui J, Wang P, 2009. Sublethal effects of pesticide mixtures on selected biomarkers of *Carassius auratus*. *Environ Toxicol Pharmacol.*; 28(3):414-9.

Wang N, Yi L, Shi L, Kong D, Cai D, Wang D, Shan Z, 2012. Pollution level and human health risk assessment of some pesticides and polychlorinated biphenyls in Nantong of Southeast China. *J Environ Sci* 24(10):1854-60.

Wang L L, Liu T, Wang C, Zhao F Q, Zhang Z W, Yao H D, Xing H J, Xu SW, 2013. Effects of atrazine and chlorpyrifos on the production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in the brain of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicol Environ Saf*; 93:7-12. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.03.007.

Wast N, Gaherwal S, Prakash M M, 2012. Short term toxic effect of lead nitrate, lead acetate and mercuric acetate on tadpole of *Rana tigrina*. *Journal of Environmental Research and Development* Vol. 6 No. 3A.

Watanabe S, Kaneko T, Aida K, 2005. Aquaporin-3 expressed in the basolateral membrane of gill chloride cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* adapted to freshwater and seawater. *The Journal of Experimental Biology* 208: 2673-2682

Watson C F, Beamish F W H, 1980. Effects of zinc on branchial ATPase activity in vivo in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Compos. Biochem. Physiol.* 66, 77–82.

Watson C F, Benson W H, 1987. Comparative activity of gill ATPase in three freshwater teleosts exposed to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 14, 252–259.

Watts M, 2013. Chlorpyrifos. Pesticide Action Network Asia and the Pacific; (PAN AP)

Weber D N, 1993. Exposure to sublethal levels of waterborne lead alters reproductive behavior patterns in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Neurotoxicology* 14, 347–358.

Weber D N, Russo A, Seale D B, Spieler RE, 1991. Waterborne lead affects feeding abilities and neurotransmitter levels of juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 21, 71–80.

Weller R, 1999. Nitric oxide, skin growth and differentiation: more questions than answers? *Clin. Exp. Dermatol.* 24, 388–391.

Welshons W V, Thayer K A, Judy B M, Taylor J A, Curran E M, vom Saal F S, 2003. Large effects from small exposures: I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 111:994–1006.

Wendelaar Bonga S E, 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev* vol. 77 no. 3 591-625

Whitehead A, Roach J L, Zhang S, Galvez F., 2011. Salinity- and population-dependent genome regulatory response during osmotic acclimation in the killifish (*Fundulus heteroclitus*) gill. *The Journal of Experimental Biology* 215, 1293-1305

WHO, 2009. WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides. Chlorpyrifos O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate. World Health Organization, Geneva. http://www.who.int/whopes/quality/Chlorpyrifos_WHO_specs_eval_Mar_2009.pdf.

WHO (World Health Organization), 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disrupters. WHO/PCS/EDC/02.2. International Programme of Chemical Safety (IPCS) Geneva, Switzerland.

Wijeyaratne W, Pathiratne A, 2006. Acetylcholinesterase inhibition and gill lesions in an indigenous fish inhabiting rice associated waterbodies in Sri Lanka. *Ecotoxicology*; Volume 15, Issue 7, pp 609-619 609-619.

Wood C M, 2001. Influence of feeding, exercise, and temperature on nitrogen metabolism and excretion. In: Nitrogen Excretion, edited by Wright E, Wright P, and Anderson P. San Diego, CA: Academic, 2001, p. 201–218.

Woudneh M B, Ou Z, Sekela M, Tuominen T, Gledhill M, 2009. Pesticide multiresidues in waters of the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. Part 1. Surface water. *J Environ Qual* 38(3):940-7.

Wu S M, Chou Y Y, Deng A N, 2002. Effects of exogenous cortisol and progesterone on metallothionein expression and tolerance to waterborne cadmium in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Zoological Studies*, 41(1), 111-118.

Wu H, Zhang R, Liu J, Guo Y, Ma E, 2011 Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). *Chemosphere* 83:599–604.

Wu Y, Zhou Q, Li H, Liu W, Wang T, Jiang G, 2010. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. *Aquat Toxicol.* 15;100(2):160-7.

Xiang Y, Rice C D, 2000. Expression of fish iNOS is increased by proinflammatory signals and xenobiotics. *Abstracts/Mar. Environ. Res.* 50, 465–472.

Xing H, Li S, Wang Z, Gao X, Xu S, Wang X, 2012a. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pestic Biochem Physiol* 103(1):74-80.

Xing H, Li S, Wang Z, Gao X, Xu S, Wang X, 2012b. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Chemosphere*; 88(4):377-83.

Xu W, Liu W, Lu K, Jiang Y, Li G, 2011. Effect of trichlorfon on oxidative stress and hepatocyte apoptosis of *Carassius auratus gibelio* in vivo. *Fish. Physiol. Biochem.* 38,769–775.

Yang B, Verkman A S, 1997. Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry* 272: 16140-16146.

Yarsan E, Yipel M, 2013. The important terms of marine pollution “Biomarkers and Biomonitoring, Bioaccumulation, Bioconcentration, Biomagnification”. *J Mol Biomark Diagn.*

Yasui M, Hazama A, Kwon T H, Nielsen S, Guggino W B, Agre, P, 1999a. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402, 184-187.

Yasui M, Kwon T H, Knepper M A, Nielsen S, Agre P, 1999b. Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96: 5808-5813.

Zelenina M, Tritto S, Bondar A A, Zelenin S, Aperia A., 2004. Copper inhibits the water and glycerol permeability of aquaporin-3. J Biol Chem. 10;279(50):51939-43.

Zeni C, Caliguri A S, Bovolenta M R, 1995. Damage and recovery of *Ictalurus* sp barbel taste buds exposed to sublethal concentrations of an anionic detergent. Aquat. Toxicol. 31, 113-123.

Zeuthen T, Klaerke D A, 1999. Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁺. The Journal of Biological Chemistry, 274, 21631-21636

Zhang X, Yang F X, Zhang X L, Xu Y, Liao T, Song S B, Wang J W, 2008. Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). Aquat Toxicol; 86:4-11.

Zhang Y M, Huang D J, Wang Y Q, Liu J H, Yu R L, Long J, 2005. Heavy metal accumulation and tissue damage in goldfish *Carassius auratus*. Bull Environ Contam Toxicol; 75(6):1191-9.

Zhong G, Xie Z, Cai M, Möller A, Sturm R, Tang J, Zhang G, He J, Ebinghaus R, 2012. Distribution and air-sea exchange of current-use pesticides (CUPs) from East Asia to the high Arctic Ocean. Environ Sci Technol 46(1):259-67.

Zizza M, Giusi G, Crudo M, Canonaco M, Facciolo R M, 2013. Lead-induced neurodegenerative events and abnormal behaviors occur via ORXRergic/GABAergic mechanisms in a marine teleost. Aquatic Toxicology Volume 126, 15, Pages 231-241.

La presente tesi è cofinanziata con il sostegno della Commissione Europea, Fondo Sociale Europeo e della Regione Calabria.

L'autore è il solo responsabile di questa tesi e la Commissione Europea e la Regione Calabria declinano ogni responsabilità sull'uso che potrà essere fatto delle informazioni in essa contenute.