

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



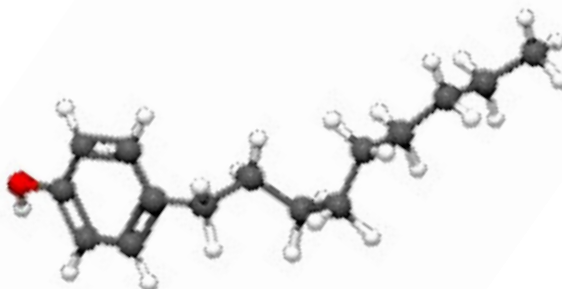
Dottorato di Ricerca in Biologia Animale

(Settore disciplinare BIO-05)

XXIV Ciclo

(2008-2011)

Effetti dell'Esposizione a Breve Termine
a Nonilfenolo Etossilato sul Fegato e
sull'Epidermide del Tritone italiano
Lissotriton italicus



Dott.ssa Patrizia BIASONE

Coordinatore

Prof.ssa Maria Carmela CERRA

Docenti Tutor

Prof. Sandro TRIPEPI

Dott.ssa Elvira BRUNELLI

*A Salvatore
Al mio papà
Alla mia mamma
Ad Alessia & Nadia
Alla mia nonnina*

INDICE

Summary	pag.	I
Introduzione	»	1

CAPITOLO I NONILFENOLO ETOSSILATO

1.1 Cenni storici	»	3
1.2 Campo d'impiego	»	4
1.3 Struttura e funzione	»	4
1.3.1 Effetti non estrogenici	»	6
1.4 Caratteristiche chimico-fisiche	»	6
1.5 Classificazione e status	»	9
1.6 Degradazione e destino ambientale	»	10
1.6.1 Effetto della temperatura	»	11
1.6.2 Effetto della salinità	»	11
1.7 Limiti di campionamento e determinazione delle concentrazioni in natura	»	12
1.8 Concentrazioni in natura	»	12
1.9 Metabolismo e bioconcentrazione	»	14
1.10 Tossicità acuta in organismi acquatici	»	15
1.11 Tossicità cronica in organismi acquatici	»	16
1.11.1 Invertebrati acquatico	»	16
1.11.2 Pesci	»	16
1.12 Tossicità in organismi terrestri	»	18
1.13 NPE e Anfibi	»	19
1.13.1 Tossicità acuta	»	20
1.13.2 Effetto della temperatura	»	20

CAPITOLO II SPECIE STUDIATA

2.1 Tassonomia	»	22
2.2 Geonemia	»	22
2.3 Morfologia	»	23
2.4 Valore ecologico delle misure biometriche per le popolazioni calabresi di Tritone italiano	»	25
2.5 Habitat	»	25
2.5.1 Preferenze altitudinali	»	26
2.6 Alimentazione	»	26
2.7 Anatomia interna	»	26

2.7.1	Apparato scheletrico	»	26
2.7.2	Apparato tegumentario	»	27
2.7.3	Apparato respiratorio	»	28
2.7.4	Apparato circolatorio	»	28
2.7.5	Apparato digerente	»	29
2.7.6	Sistema nervoso ed organi di senso	»	29
2.7.7	Apparato urogenitale	»	30
2.7.8	Apparato riproduttivo	»	30
2.8	Sviluppo e metamorfosi	»	31
2.8.1	Uovo	»	31
2.8.2	Sviluppo embrionale	»	31
2.8.3	Sviluppo larvale e metamorfosi	»	32
2.8.4	Influenza dei parametri ambientali sullo sviluppo	»	32
2.8.5	Neotenia	»	33
2.9	Importanza delle variazioni stagionali degli ormoni sessuali nello studio degli effetti degli EDC sugli Anfibi	»	34

CAPITOLO III MATERIALI e METODI

3.1	Raccolta e mantenimento degli animali	»	37
3.2	Testi di tossicità acuta	»	37
3.2.1	Calcolo delle concentrazioni	»	38
3.3	Prelievo degli organi target	»	38
3.4	Allestimento dei preparati per la microscopia ottica e microscopia elettronica a trasmissione ed a scansione	»	39
3.4.1	Fissazione	»	40
3.4.2	Disidratazione	»	41
3.4.3	Infiltrazione e inclusione (solo per MO e TEM)	»	41
3.4.4	Taglio e colorazione (solo per MO e TEM)	»	42
3.4.5	Essiccamento e ricopertura (solo per SEM)	»	43
3.5	Allestimento dei preparati per la microscopia confocale	»	43
3.5.1	Fissazione	»	44
3.5.2	Disidratazione	»	44
3.5.3	Inclusione	»	44
3.5.4	Taglio al microtomo	»	45
3.5.5	Metodo dell'immunofluorescenza	»	45
3.6	Citocromo P-450	»	46
3.6.1	CYP-1A	»	48
3.6.2	CYP-3A	»	50
3.7	Caspasi-3	»	50
3.7.1	Struttura e funzione	»	50
3.7.2	Coinvolgimento della caspasi-3 nell'apoptosi	»	52
3.7.3	Coinvolgimento dell'NP nei processi apoptotici	»	55

CAPITOLO IV

RISULTATI

4.1 Anatomia macroscopica del fegato	»	56
4.2 Morfologia ed ultrastruttura del fegato degli esemplari di controllo	»	56
4.3 Morfologia ed ultrastruttura del fegato dopo esposizione a 50 µg/l di NP10E	»	58
4.4 Morfologia ed ultrastruttura del fegato dopo esposizione a 100 µg/l di NP10E	»	59
4.5 Citocromo P-450 1A	»	60
4.6 Citocromo P-450 3A	»	60
4.7 Caspasi-3	»	61
4.8 Morfologia ed ultrastruttura dell'epidermide degli esemplari di controllo	»	61
4.9 Morfologia ed ultrastruttura dell'epidermide dopo esposizione a 50 µg/l di NP10E	»	63
4.10 Morfologia ed ultrastruttura del fegato dopo esposizione a 100 µg/l di NP10E	»	64

CAPITOLO V

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

5.1 Morfologia ed ultrastruttura del fegato degli esemplari di controllo	»	65
5.2 Morfologia ed ultrastruttura del fegato dopo esposizione ad NPE	»	65
5.3 Citocromo P-450 1A e 3A	»	68
5.4 Caspasi 3	»	70
5.5 Morfologia ed ultrastruttura dell'epidermide degli esemplari di controllo	»	71
Tavole	»	73
Bibliografia	»	92

Summary

Introduction

Global amphibian decline is one of the facets of the more complex issue of biodiversity crisis (Blaustein and Kiesecker, 2002). Although the exact number of species being lost is not known (Blaustein and Kiesecker, 2002), the calculations provided by McCallum (2007) suggest that the current amphibians extinction rate could be 211 times the background amphibians extinction rate.

Currently it is known that, in most cases, amphibian populations decline is the result of complex interactions among multiple factors, often resulting from anthropogenic activities including introduction of alien species, habitat destruction and environmental contamination (Blaustein and Wake, 1990; Wake, 1991; Carey and Bryant, 1995; Sparling *et al.*, 2000; Kiesecker *et al.*, 2001; Davidson *et al.*, 2001, 2002; Blaustein and Kiesecker, 2002; Blaustein *et al.*, 2003; Little *et al.*, 2003; Beebee and Griffiths, 2005).

Surfactants are one of the more ubiquitous contaminants in aquatic environments such as shallow and temporary water bodies, which represent an ideal habitat for many amphibian species (Tyler, 1994; Mann and Bidwell, 2000; Mann and Bidwell, 2001). This contaminants may be spread globally, or act on a local scale; furthermore, they may be transported atmospherically, potentially damaging amphibians living in remote and relatively undisturbed environments (Blaustein *et al.*, 2003).

Nonylphenol ethoxylates (NPEs) are non-ionic surfactants widely produced for domestic, industrial, and agricultural uses such as the production of pesticides (Lee, 1999; Dréze and Monod, 2000; Matozzo *et al.*, 2003). As a consequence of their widespread application, NPEs are discharged in large quantities into aquatic environments, predominantly as industrial and domestic waste and as effluent from waste treatment plants, but contamination also occurs directly via pesticide practices (Ekelund *et al.*, 1993; Maguire, 1999; Cakal Arslan and Parlak, 2007).

Concentrations of nonylphenolic compounds in the environment are extremely variable (Di Corcia and Samperi, 1994; Blackburn and Waldock, 1995; Snyder *et al.*, 1999; Barber *et al.*, 2000; Isobe *et al.*, 2001; Patrolecco *et al.*, 2006), reaching values higher than 13,7 mg/L in Italy (Marcomini *et al.*, 1990).

In the environment and during the aerobic treatment of wastewater, NPEs are decomposed into compounds with shorter ethylene oxide groups (Ferrara *et al.*, 2001); Servos (1999) reports an increase in NPEs toxicity depending on the decreasing ethoxylate unit chain lengths.

Due to the high toxicity documented for these surfactants, European Countries started to take action against nonylphenolic compounds, introducing voluntary agreements between

industry and governments to reduce the use and the production of nonylphenol derivatives (PARCOM 92/8, 2000). Subsequently, NPEs were designated as priority hazardous substances (PHS) in the Water Framework Directive (Directive 2000/60/EC, 2000) and most of their uses are currently regulated (Directive 2003/53/EC, 2003) (Soares *et al.*, 2008).

The most thoroughly characterized mechanism of action for NPEs involves interactions with steroid receptors such as competitive binding either as agonists or antagonists, alterations in steroid receptors levels and/or post-receptor signaling pathways and changes in metabolism of hormones, but additional non-estrogenic mechanisms have been proposed (Laurenzana *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2004). The NPEs metabolite nonylphenol (NP), for example, is able to mimic the action of the natural hormone 17 β -estradiol.

Several studies showed that NPEs can significantly affect the reproductive system in both aquatic and terrestrial organisms, and they may also damage other organs and tissues (Madsen *et al.*, 1997; Burkhardt-Holm *et al.*, 2000; Dréze and Monod, 2000; Casini *et al.*, 2002; Chitra *et al.*, 2002; Kawana *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Arukwe and Røe, 2008; Hara *et al.*, 2007; El-Dakdoky and Helal, 2007; XueFei *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010).

At this time, the knowledge on the effects of NPEs on amphibians is limited (Bögi *et al.*, 2003); for this reason, in the present study we investigated the effects of ecologically relevant concentrations of nonylphenolic compounds (50, 100 $\mu\text{g/L}$) on liver and skin of *Lissotriton italicus*, an highly endemic urodele in Calabria, using a morphological and ultrastructural approach and evaluating biomarkers of stress. Preliminary histological and ultrastructural analysis on liver and skin of control animals were carried out to identify the physiological setting of the two organs. Then, using the same approach, the alterations induced by NPEs exposure have been evaluated.

Afterwards, in parallel with the ultrastructural evaluation, the expression of two isoforms of cytochrome P-450 (CYP-1A and CYP-3A), involved in the hepatic metabolism of xenobiotics and the expression of caspase-3, a crucial mediator of programmed cell death, have been studied in liver using immunohistochemical techniques applied to confocal microscopy.

Material and Methods

Adult newts of both sexes were collected from a temporary pond near Cosenza. Animals were caught using a close-mesh net, transported to the laboratory and acclimatized in 50 liters aquaria with tap water for 7 days prior to start the experimental protocol. Then, two male and two female newts for each experimental unit were transferred in 15 liters aquaria and exposed to contaminant; exposure solution were prepared by dissolving NPE standard mixture with an ethoxylation number (euAV) of 10 (Carlo Erba Reagenti, Milano, Italy) in

dechlorinated tap water to obtain two nominal concentrations of 50 and 100 µg/L. The control group was kept in tap water.

During the experimental protocol, newts were not fed and were kept under controlled conditions of 12:12 h light-dark cycles and water temperature of $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Exposure solution was renewed every 24 h.

Liver and skin were removed after 24, 48 and 96 h of exposure. Newts were anesthetized with tricaine methane sulfonate MS-222 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and handled according to the recommendations of the Ethical Committee.

Samples for light and transmission electron microscopy (about 1 mm³) were immediately fixed for 24 h at 4°C by direct immersion in 3% glutaraldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Subsequently, samples were subjected to a post-fixation in osmium tetroxide (1% in phosphate buffer), dehydrated in graded acetone and embedded in Epon-Araldite (Fluka, Buchs, Switzerland). Semithin sections (1-2 mm) were stained using toluidine blue for hepatic samples and the technique described by Humphrey and Pittman (1974) (methylene blue, azure II and basic fuchsin) for epidermal samples; these sections were observed and photographed by an LM LEITZ Dialux EB 20 light microscope. Ultrathin sections (600-900 Å) were treated with uranyl acetate and lead citrate and observed by a Zeiss EM 10 electron microscope.

Skin samples for scanning electron microscopy were fixed in 3% glutaraldehyde for 24 h at 4°C and dehydrated in graded ethanol. Specimens were dried according to the critical point method, covered with gold and observed by Zeiss DSM 940 scanning electron microscope.

Liver samples for confocal microscopy were immersed in Bouin liquid in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.1) for 24 h, and then in graded ethanol. Immunofluorescence staining was performed as described by Coons *et al.* (1955). After being washed three times in PBS, the sections were incubated with normal serum for 10 min. Unwashed sections were incubated overnight at 4°C with three different primary antibody shown in the table below:

Antibody	Species host	Producer house	Dilution
CYP-1A	Mouse	Biosense Lab	1:100
CYP-3A	Rabbit	Abcam	1:100
Caspase-3	Rabbit	Sigma	1:100

In order to examine non-specific binding (negative control), primary antibody was substituted with non-immune normal serum in one section for each experimental condition.

After several washes in PBS, samples were incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody (diluted 1:20) for 30 min at room temperature. Nuclei were stained in red with propidium iodide.

Sections were analyzed with Leica TCS SP2 Confocal Laser Scanning Microscope.

In the table below experimental setup is shown:

Liver	Light microscopy
	TEM
	Confocal microscopi
Epidermis	Light microscopy (CYP-1A - CYP-3A - Caspase-3)
	TEM
	SEM

Results

Liver morphology and ultrastructure

The liver of the Italian newt is a very compact organ with a tubular structure. It contains pigmented cells which impart the black pigmentation (*Tab. 1, fig. A*).

The histological analysis showed that hepatocytes were arranged in clusters and cords separated by a meshwork of sinusoids (*Tab. 1, fig. B*). These cells showed uniform size and possess round centrally-located nuclei (*Tab. 1, fig. B*). Bile ducts originated by adjacent hepatocytes (*Tab. 1, fig. C*); the lumen of the bile ducts was filled with many microvilli from the apical plasma membrane of hepatocytes (*Tab. 1, fig. D*). In the lateral portion of plasma membrane there were complex junctional systems (*Tab. 1, fig. D*).

Within the cytoplasm of hepatocytes we observed a well developed rough endoplasmic reticulum (RER) that reaches the apical portion of the cells (*Tab. 1, fig. C*). Mitochondria were usually found in close association with the RER and they showed circular or elongated shape with inconspicuous cristae (*Tab. 1, fig. C*). Smooth endoplasmic reticulum (SER) was rarely observed in these cells.

In addition, the cytoplasm was filled with glycogen; glycogen was always found to be associated with lipid droplets (*Tab. 1, fig. E*).

In the basal portion, hepatocytes along with endothelial cells created the space of Disse or perisinusoidal space (*Tab. 2, fig. A*). In this space we observed a fine granular substance, some microvilli and collagenous fibrils (*Tab. 2, fig. B*).

In the parenchyma we also observed some pigmented cells containing melanin (*Tab. 2, fig. C*). In addition, within the lumen of sinusoids many macrophages were found: these cells, called Kupffer cells, were variable in shape and size and exhibited endocytotic activity (*Tab. 2, fig. D*).

After 24 h of exposure to a NP10E concentration of 50 µg/l, liver showed the same morphology of untreated animals (*Tab. 3, fig. A*). In some areas of the parenchyma this condition was confirmed by electron microscopy observations that showed well-organized junction and bile ducts (*Tab. 3, fig. B*). However, we also observed alterations in bile ducts (*Tab. 3, fig. C*) and in some cells we noted significant changes in RER: in treated animals it appeared fragmented and not compacted as in control sample (*Tab. 3, fig. D*).

After 48 h of exposure, is evident a disorganization in hepatic parenchyma (*Tab. 4, fig. A*). We observed large intercellular spaces (*Tab. 4, fig. B*) and an increase in lipid droplets (*Tab. 4, fig. C*). We also noted an increase in bile ducts changes and, in some cases, we observed the almost complete loss of microvilli within the lumen of ducts (*Tab. 4, fig. D*). Mitochondria appeared swollen and RER was fragmented and its cisternae were dilated (*Tab. 4, fig. B*).

After 96 h to the same concentration, liver parenchyma appeared very uneven due to the increased size of intercellular spaces (*Tab. 5, fig. A*). In addition, the nuclei of some cells showed remarks of alteration, RER showed vesiculation of the cisternae and mitochondrial changes were intensified (*Tab. 5, figs. B-C-D*).

At the highest concentration of 100 µg/l, degenerative phenomena occurred early and were intense already after the first 24 h (*Tab. 6, fig. A*). The expansion of the intercellular spaces gave the liver a loosed appearance (*Tab. 6, fig. B*). The microvilli in bile ducts adhered to each other (*Tab. 6, fig. C*). We could be also noted an early increase in the RER and changes in mitochondrial morphology (*Tab. 6, fig. C*). Moreover, we observed Kupffer cells in activity (*Tab. 6, fig. D*).

After 48 h there was a significant increase in lipid granules (*Tab. 7, fig. A*); ultrastructural observations confirmed this phenomenon of steatosis (*Tab. 7, fig. B*). The organization of the bile ducts was severely impaired (*Tab. 7, fig. C*) and in some cases the canals were completely occluded (*Tab. 7, fig. D*). There were also clear signs of nuclear degeneration (*Tab. 7, fig. E*) and many cells showed strong evidences of disorganization in the endomembrane system (*Tab. 7, fig. E*).

After 96 h the degenerative process was in an advanced stage and involved cellular and extracellular systems. In fact, it was not possible to distinguish the original structural setting of

liver parenchyma (Tab. 8, figs. A-B-C-D). Endothelial cells also showed remarks of alteration (Tab. 8, fig. E) and there were widespread phenomena of macrophage infiltration (Tab. 8, fig. F).

Confocal analysis

With regard to the functional changes induced by nonylphenol ethoxylates on the liver, the expression of two cytochrome isoforms CYP-1A and 3A and the expression of caspase-3 have been evaluated.

CYP-1A

At the lowest concentration of 50 µg/L, there was not an increase of labelling for CYP-1A during the first 48 h of treatment (Tab. 9, figs. A-B-C). After 96 h, however, a significant increase in CYP-1A expression was observed (Tab. 9, fig. D).

Situation changed at highest concentrations of 100 µg/l; in this case an increasing in the expression was observed already after the first 24 h (Tab. 9, fig. E). Labelling evolved over time reaching a peak after 48 h (Tab. 9, fig. F). After 96 h, it was difficult to observe the expression of CYP-1A due to the degeneration of tissue in fact, also the nuclei labeled in red with propidium iodide appeared weakly stained (Tab. 9, fig. G).

CYP-3A

With regard to the expression of CYP-3A, at the lowest concentration of 50 µg/L there was not an increase in the expression during the first 48 h of exposure (Tab. 10, figs. A-B), but after 96 h we observed a slight increase in labeling (Tab. 10, fig. C).

Also for this second isoform the situation changed at the highest concentration of 100 µg/L; in fact, we observed an increase in the expression of CYP-3A already after 24 h of treatment (Tab. 10, fig. D) that evolved over time reaching a peak after 48 h of exposure (Tab. 10, fig. E). After 96 h labelling was reduced (Tab. 10, fig. F).

Caspase-3

To confirm the presence of apoptosis, as supposed during the ultrastructural observations, the expression of the caspase-3 has been evaluated.

Caspases are crucial mediators of programmed cell death. Among them, caspase-3 is a frequently activated death protease, catalyzing the specific cleavage of many key cellular proteins.

At the lowest concentration of 50 µg/L, a slight increase in the expression was observed after the first 24 h of treatment (Tab. 11, figs. A-B) and labelling evolved over time reaching a peak after 96 h (Tab. 11, fig. C-D).

A similar condition was also observed for the highest concentration of 100 µg/L. However, in this case, the increase of the expression was more intense already after the first 24

h (Tab. 11, fig. E) and reached a peak after 96 h (Tab. 11, figs. F-G). At this time, images obtained by confocal analysis also showed remarkable sign of nuclear degeneration, evidenced by staining with propidium iodide (Tab. 11, fig. G).

Epidermal morphology and ultrastructure

We chose skin as target organ because it is the interface between the animal and its external environment. Moreover it is exposed to the pollutants and, for this reason, is one of the main site of pollutant penetration.

The skin of the untreated newts showed the same general arrangement found in other Urodela species, with an organization in well-distinct layers (Tab. 12, fig. A). The basal germinative layer was composed by columnar cells resting on a connectival basement membrane, that separated epidermis from derma (Tab. 12, fig. B). This layer was followed by the stratum spinosum, consisted of tightly packed cells with large and rounded nuclei (Tab. 12, fig. C); the cytoplasm was still rich in ribosomes, RER, Golgi apparatus, multivesicular bodies and bundles of tonofilaments (Tab. 12, fig. D). The stratum spinosum was followed by the stratum granulosum. In this layer cells showed an advanced degree of maturation, possess pycnotic nuclei and contained densely packed tonofilaments (Tab. 12, fig. E). In these cells different type of granules were distinguished but both Golgi apparatus and RER were rarely observed (Tab. 12, fig. F).

The most external layer was the stratum corneum. Observation performed by SEM showed polygonal-shaped cells with evident junctional margins (Tab. 13, fig. A) whose continuity was interrupted by horny tubercles and by the apertures of dermal glands (Tab. 13, fig. B). Observed by TEM these cells appeared flattened and consisted almost entirely of keratin filaments; no cellular structures were distinguished (Tab. 13, fig. C). Finally, some melanocytes (Tab. 5, fig. D), Flask cells (Tab. 5, fig. E) and Merkel cells (Tab. 5, fig. F) were present within epidermal thickness.

After 24 h of exposure to a NP10E concentration of 50 µg/l, images obtained by SEM showed the first signs of superficial alteration (Tab. 14, figs. A-B). Although epidermis was undamaged at light microscopy observations (Tab. 14, fig. C), transmission electron microscopy observations revealed continuous processes of moult (Tab. 5, fig. D). In physiological condition, in fact, in the stratum subcorneum we found mature cells whereas, in treated animals the increased turnover led to the formation of a layer of immature cells (Tab. 14, fig. E).

In addition, we noted electronclear granules within the cytoplasm of the basal cells (Tab. 14, fig. F)

After 48 h of exposure, scanning electron microscopy observations showed an increase in mucous secretions (Tab. 15, fig. B) and after 96 h of treatment mucus covered a surface altered (Tab. 16, fig. A-B). Images obtained by TEM showed a flattening of the epithelium (Tab. 15, fig. D); this phenomenon increased after 96 h of treatment (Tab. 16, fig. D). At this time it

was difficult to distinguish the different cell layers (Tab. 16, fig. D). Moreover, granules in cytoplasm of the basal cells increased (Tab. 15, fig. E; Tab. 16, fig. E).

After 24 h of exposure to the highest concentration of 100 µg/l, we observed an early increase in mucous secretion (Tab. 16, fig. F). Although the ultrastructural setting was maintained, we noted an early appearance of electron-clear granules in the cells of deep layers (Tab. 16, fig. G).

After exposure for 48 h, the epithelial surface appeared completely altered by the presence of a mucous coat and by the lift of epithelial cells (Tab. 17, figs. A-B). These phenomena were more intense after 96 h (Tab. 18, figs. A-B-C); in fact we noted the thickening of cell margins (Tab. 18, fig. A). Light and TEM observations showed continuous processes of moult (Tab. 17, figs. C-D) and a degeneration in the layer below the statum corneum (Tab. 17, fig. E).

After 96 h it was difficult to distinguish the different cell types (Tab. 18, fig. D) and the fusion of some areas of the epidermal surface was often observed (Tab. 18, fig. E).

Discussion

Our results show that, in *Lissotriton italicus*, the organization of liver is similar of that reported for other amphibian (Spornitz, 1975; Guida *et al.*, 1998; Sichel *et al.*, 1997) and vertebrate (Hacking *et al.*, 1978; Sivarajah *et al.*, 1978; Köhler, 1990; Hugla and Thomé, 1999; Islinger, 2003). For what concern SER is interesting to notice that, in our control samples, this is not well developed; this condition was previously reported only by Haar and Hightower (1976) in the newt *Notophthalmus viridescens* and in teleost (Chapman, 1981; Hugla and Thomé, 1999).

In addition our data show, according to some authors (Berg, 1920; Kremer, 1932; Spornitz, 1974), changes in lipid and glycogen depending on metabolic and nutritional state of the animals.

Observations performed on treated newts showed a progressive degeneration depending on both doses and time of exposure. Although ultrastructural sites of damage are the same in all experimental units, alteration degree depends on time of exposure and doses. Some of these alterations have been previously reported for amphibian and teleost species after exposure to other chemical related substances (Nicholls, 1968; Hugla and Thomé, 1999; Islinger *et al.*, 2003)

According to the data reported in scientific literature (Watanabe *et al.* 2004; Yang *et al.* 2008), we suppose that the increasing of rough endoplasmic reticulum may be linked with an increase in the synthesis of both proteins involved in xenobiotics metabolism (Lee *et al.*, 1996; Masuyama *et al.*, 2000; Laurenzana *et al.*, 2002; Hasselberg *et al.*, 2004; 2005; Hernandez *et al.*, 2006) and proteins activated by estrogens as vitellogenin; this condition may represent a

response of hepatocytes to surfactant (Kloas *et al.*, 1999; Mosconi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2006).

Moreover, it has been studied the comparative effects induced by NP and estradiol in liver and it has been demonstrated that nonylphenol induces the expression of more genes than estradiol; this fact led to suppose a no-estrogenic activities of NP and NPEs in general in liver (Watanabe *et al.*, 2004). These no-estrogenic effects include the production of free radicals (ROS) (Obata and Kubota, 2000; Chitra and Mathur, 2004; Okai *et al.*, 2004; Gong and Han, 2006; El-Dakdoky and Helal, 2007; Hsieh *et al.*, 2009) that may be the cause of some alterations observed in *Lissotriton italicus* such as the loss of junctional contact associated with the increased size of intercellular spaces and the alteration in mitochondrial morphology (Meador and Cheville, 2009).

For what concern functional effects induced by NPEs on liver, the ultrastructural analysis has been associated with the confocal analysis on the expression of CYP-1A and 3A, that have shown the presence of a specific mechanism of response.

In physiological conditions cytochromes present low levels of expression in the liver of Italian newt, so the increase in the expression of the two considered isoforms may represent an attempt to metabolize the accumulation of NPEs in tissues. However literature data are very different (Masuyama *et al.*, 2000; Laurenzana *et al.*, 2002; Hasselberg *et al.*, 2004; 2005; Hernandez *et al.*, 2006; Meucci and Arukwe, 2006; Suzuki and Iwata, 2010) and the effects induced by endocrine chemicals disrupting on the expression and activity of cytochromes are not clear.

In addition, according to Ishibashi *et al.* (2004) our observations led us to suppose the presence of a “threshold effect”: the increase in expression of cytochromes, in fact, was observed only for high concentrations or, for low concentrations, only after long time of exposure.

Finally, evaluation of caspase-3 expression reveals a marked phenomenon of apoptosis. The increase in the expression of caspase-3, in relation to both time of exposure and doses, underlines the noxious effect of nonylphenol ethoxylates, previously described in different organs and tissues (Weber *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2004; Bechi *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2006; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2007; Kaptaner and Ünal, 2010), also on the hepatic system.

Skins alterations appeared less serious than liver alterations even after long time exposure to the highest NPE concentration. Probably this fact depends on the intrinsic ability of skin, always subjected to a continuous cellular turnover.

However our studies showed that the turnover mechanism cannot totally compensate the loss of cells that happens for continuous moult processes, in particular after a long time exposure.

According to some data showed by Burkhardt-Holm *et al.* (2000), after 48 and 96 h of exposure epithelium appear very uneven and is evident the loss of the typical stratification.

Immature subcorneal cells are forced to reach the external layers, and it is difficult to distinguish stratum granulosum from stratum spinosum.

The surface appears totally altered and mucous secretion may represent a protection mechanism to surfactant penetration; in physiological condition, in fact, the function of the mucus coating is probably to facilitate the exchange of gases and to protect skin from mechanical damages. In addition, the numerous electron-clear granules observed by TEM may also represent a defensive response of the epithelial cells (Burkhardt-Holm *et al.*, 2000).

At the present, in scientific literature, there is only one study on amphibians skin's response to NPEs (Park *et al.*, 2010), but these data are not comparable with our results in *Lissotriton italicus*.

To conclude, this work is only a part of a more important project about the protection of amphibians. The presence of all these effects led us to hypothesize that other organs and tissues may be altered, and underlines the lethal effects of NPEs for long time of exposure; this condition is easy to find in nature, where these animals are continuously exposed to the aggression of these contaminants.

INTRODUZIONE

La biologia e fisiologia degli Anfibi fanno sì che tali organismi siano degli ottimi bioindicatori dello stato di salute ambientale. Ciò che rende i membri di questa classe di Vertebrati target ideali per studi ecotossicologici, è la loro capacità di assorbire sostanze chimiche attraverso le superfici altamente permeabili destinate agli scambi gassosi: la pelle e, durante la fase larvale, le branchie (Materna *et al.*, 1995). Inoltre gli Anfibi sono potenzialmente esposti ai fattori inquinanti sia in ambiente terrestre che in ambiente acquatico, dove la maggior parte di essi depone e porta a termine lo sviluppo embrionale e larvale, le cui fasi risultano particolarmente critiche.

Negli ultimi decenni, i fenomeni di declino delle popolazioni di Anfibi hanno assunto notevole rilevanza all'interno del più ampio problema della riduzione della biodiversità su scala globale (Davidson *et al.*, 2002). Nonostante ciò, da un recente lavoro condotto da Sparling e collaboratori (2002) è emerso che solo il 2,7% degli studi tossicologici pubblicati utilizza questi delicati organismi quali oggetto di sperimentazione (Sparling *et al.*, 2000) e i dati ad essi relativi risultano molto limitati se confrontati con le informazioni disponibili per altri Vertebrati.

E' oggi noto che i processi di estinzione di massa che stanno interessando gli Anfibi sono il risultato di complesse interazioni tra fattori multipli, spesso derivanti da attività antropiche, tra cui figurano l'introduzione di specie aliene, la distruzione degli habitat e l'utilizzo massiccio di pesticidi ed altri composti chimici (Blaustein and Wake, 1990; Wake, 1991; Carey and Bryant, 1995; Sparling *et al.*, 2000; Kiesecker *et al.*, 2001; Davidson *et al.*, 2001; 2002; Blaustein and Kiesecker, 2002; Blaustein *et al.*, 2003; Little *et al.*, 2003; Beebee and Griffiths, 2005).

I surfattanti sono tra i contaminanti più diffusi in ambiente acquatico e sono spesso riscontrati in pozze e corpi d'acqua temporanei che rappresentano l'habitat ideale per molte specie di Anfibi (Tyler, 1994; Mann and Bidwell, 2000; Mann and Bidwell, 2001).

A questa classe di composti appartengono i nonilfenoli etossilati (NPE), derivati alchilici sintetizzati su scala globale per usi domestici, industriali e agricoli, che comprendono la produzione di pesticidi (Lee, 1999; Dréze and Monod, 2000; Matozzo *et al.*, 2003). A causa della loro vasta applicazione, gli NPE raggiungono in larga quantità i corpi d'acqua attraverso gli effluenti provenienti dagli impianti di depurazione fognaria o per scarico diretto di acque reflue domestiche e industriali; tuttavia, la contaminazione ad opera di questi composti può avvenire anche attraverso l'aspersione diretta come componenti dei pesticidi (Ekelund *et al.*, 1993; Maguire, 1999; Cakal Arslan and Parlak, 2007).

Le concentrazioni di composti nonilfenolici a livello ambientale sono estremamente variabili (Di Corcia and Samperi, 1994; Blackburn and Waldock, 1995; Snyder *et al.*, 1999; Barber *et al.*, 2000; Isobe *et al.*, 2001; Patrolecco *et al.*, 2006) e in Italia raggiungono valori di circa 13,7 mg/l (Marcomini *et al.*, 1990).

Nell'ambiente esterno e durante il trattamento aerobico delle acque reflue gli NPE vengono degradati in composti a catena etossilica ridotta maggiormente idrofobici, persistenti e tossici (Servos, 1999; Ferrara *et al.*, 2001);

In letteratura è documentato che tali composti agiscono principalmente come distruttori endocrini, interferendo con le normali funzioni ormonali (Laurenzana *et al.*, 2002); tuttavia, alcuni autori hanno proposto il coinvolgimento di pathways non estrogenici nell'esplicamento della loro azione nociva (Watanabe *et al.*, 2004).

Sia in organismi acquatici che terrestri, i principali target colpiti dall'azione degli NPE sono rappresentati dagli apparati riproduttivi maschile e femminile, che registrano alterazioni sia nella morfologia che nella funzionalità; non mancano tuttavia dati relativi al coinvolgimento di altri organi e tessuti (Madsen *et al.*, 1997; Burkhardt-Holm *et al.*, 2000; Dréze and Monod, 2000; Casini *et al.*, 2002; Chitra *et al.*, 2002; Kawana *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Arukwe and Røe, 2008; Hara *et al.*, 2007; El-Dakdoky and Helal, 2007; XueFei *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010).

A causa della loro elevata tossicità, i composti nonilfenolici sono ad oggi considerati "priority hazardous substances" (PHS) (Direttiva 2003/53/EC, 2003). Nonostante ciò e sebbene la maggior parte dei loro usi sia regolamentata, in molti paesi la produzione di questi composti è ancora diffusa (Soares *et al.*, 2008).

Attualmente, i dati tossicologici relativi agli effetti dell'esposizione ad NPE sugli Anfibi sono limitati (Bögi *et al.*, 2003); per tale ragione nello svolgimento del presente lavoro di dottorato abbiamo focalizzato la nostra attenzione sui danni indotti dal trattamento a concentrazioni di NPE rilevabili in natura (50 e 100 µg/l) sul fegato e sull'epidermide del Tritone italiano (*Lissotriton italicus*), un urodelo endemico della regione Calabria.

L'esperimento, della durata di 4 giorni, ha previsto il sacrificio degli animali dopo 24, 48 e 96 h di esposizione, e il lavoro di analisi è stato articolato in una fase di studio morfologico ed ultrastrutturale delle alterazioni riportate dagli individui trattati, ed una fase di valutazione di markers di stress, ottenuta con il supporto della microscopia confocale.

Le osservazioni condotte sugli esemplari di controllo hanno permesso di ottenere informazioni preliminari sul normale assetto organizzativo dei due organi considerati. Sulla base di questi dati è stato poi possibile effettuare un confronto con le informazioni provenienti dai campioni trattati, che hanno mostrato l'insorgenza di progressivi fenomeni degenerativi dipendenti dalla dose testata e dal tempo di permanenza all'interno del contaminante. Sul tessuto epatico è stata inoltre condotta l'analisi immunoistochimica che ha previsto l'impiego di anticorpi diretti contro due diverse isoforme del citocromo P-450, CYP-1A e CYP-3A, notoriamente coinvolte nel metabolismo ossidativo di numerosi xenobionti, e contro la caspasi-3, un mediatore cruciale dei processi apoptotici.

INTRODUZIONE

La biologia e fisiologia degli Anfibi fanno sì che tali organismi siano degli ottimi bioindicatori dello stato di salute ambientale. Ciò che rende i membri di questa classe di Vertebrati target ideali per studi ecotossicologici, è la loro capacità di assorbire sostanze chimiche attraverso le superfici altamente permeabili destinate agli scambi gassosi: la pelle e, durante la fase larvale, le branchie (Materna *et al.*, 1995). Inoltre gli Anfibi sono potenzialmente esposti ai fattori inquinanti sia in ambiente terrestre che in ambiente acquatico, dove la maggior parte di essi depone e porta a termine lo sviluppo embrionale e larvale, le cui fasi risultano particolarmente critiche.

Negli ultimi decenni, i fenomeni di declino delle popolazioni di Anfibi hanno assunto notevole rilevanza all'interno del più ampio problema della riduzione della biodiversità su scala globale (Davidson *et al.*, 2002). Nonostante ciò, da un recente lavoro condotto da Sparling e collaboratori (2002) è emerso che solo il 2,7% degli studi tossicologici pubblicati utilizza questi delicati organismi quali oggetto di sperimentazione (Sparling *et al.*, 2000) e i dati ad essi relativi risultano molto limitati se confrontati con le informazioni disponibili per altri Vertebrati.

E' oggi noto che i processi di estinzione di massa che stanno interessando gli Anfibi sono il risultato di complesse interazioni tra fattori multipli, spesso derivanti da attività antropiche, tra cui figurano l'introduzione di specie aliene, la distruzione degli habitat e l'utilizzo massiccio di pesticidi ed altri composti chimici (Blaustein and Wake, 1990; Wake, 1991; Carey and Bryant, 1995; Sparling *et al.*, 2000; Kiesecker *et al.*, 2001; Davidson *et al.*, 2001; 2002; Blaustein and Kiesecker, 2002; Blaustein *et al.*, 2003; Little *et al.*, 2003; Beebee and Griffiths, 2005).

I surfattanti sono tra i contaminanti più diffusi in ambiente acquatico e sono spesso riscontrati in pozze e corpi d'acqua temporanei che rappresentano l'habitat ideale per molte specie di Anfibi (Tyler, 1994; Mann and Bidwell, 2000; Mann and Bidwell, 2001).

A questa classe di composti appartengono i nonilfenoli etossilati (NPE), derivati alchilici sintetizzati su scala globale per usi domestici, industriali e agricoli, che comprendono la produzione di pesticidi (Lee, 1999; Dréze and Monod, 2000; Matozzo *et al.*, 2003). A causa della loro vasta applicazione, gli NPE raggiungono in larga quantità i corpi d'acqua attraverso gli effluenti provenienti dagli impianti di depurazione fognaria o per scarico diretto di acque reflue domestiche e industriali; tuttavia, la contaminazione ad opera di questi composti può avvenire anche attraverso l'aspersione diretta come componenti dei pesticidi (Ekelund *et al.*, 1993; Maguire, 1999; Cakal Arslan and Parlak, 2007).

Le concentrazioni di composti nonilfenolici a livello ambientale sono estremamente variabili (Di Corcia and Samperi, 1994; Blackburn and Waldock, 1995; Snyder *et al.*, 1999; Barber *et al.*, 2000; Isobe *et al.*, 2001; Patrolecco *et al.*, 2006) e in Italia raggiungono valori di circa 13,7 mg/l (Marcomini *et al.*, 1990).

Nell'ambiente esterno e durante il trattamento aerobico delle acque reflue gli NPE vengono degradati in composti a catena etossilica ridotta maggiormente idrofobici, persistenti e tossici (Servos, 1999; Ferrara *et al.*, 2001);

In letteratura è documentato che tali composti agiscono principalmente come distruttori endocrini, interferendo con le normali funzioni ormonali (Laurenzana *et al.*, 2002); tuttavia, alcuni autori hanno proposto il coinvolgimento di pathways non estrogenici nell'esplicamento della loro azione nociva (Watanabe *et al.*, 2004).

Sia in organismi acquatici che terrestri, i principali target colpiti dall'azione degli NPE sono rappresentati dagli apparati riproduttivi maschile e femminile, che registrano alterazioni sia nella morfologia che nella funzionalità; non mancano tuttavia dati relativi al coinvolgimento di altri organi e tessuti (Madsen *et al.*, 1997; Burkhardt-Holm *et al.*, 2000; Dréze and Monod, 2000; Casini *et al.*, 2002; Chitra *et al.*, 2002; Kawana *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Arukwe and Røe, 2008; Hara *et al.*, 2007; El-Dakdoky and Helal, 2007; XueFei *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010).

A causa della loro elevata tossicità, i composti nonilfenolici sono ad oggi considerati "priority hazardous substances" (PHS) (Direttiva 2003/53/EC, 2003). Nonostante ciò e sebbene la maggior parte dei loro usi sia regolamentata, in molti paesi la produzione di questi composti è ancora diffusa (Soares *et al.*, 2008).

Attualmente, i dati tossicologici relativi agli effetti dell'esposizione ad NPE sugli Anfibi sono limitati (Bögi *et al.*, 2003); per tale ragione nello svolgimento del presente lavoro di dottorato abbiamo focalizzato la nostra attenzione sui danni indotti dal trattamento a concentrazioni di NPE rilevabili in natura (50 e 100 µg/l) sul fegato e sull'epidermide del Tritone italiano (*Lissotriton italicus*), un urodelo endemico della regione Calabria.

L'esperimento, della durata di 4 giorni, ha previsto il sacrificio degli animali dopo 24, 48 e 96 h di esposizione, e il lavoro di analisi è stato articolato in una fase di studio morfologico ed ultrastrutturale delle alterazioni riportate dagli individui trattati, ed una fase di valutazione di markers di stress, ottenuta con il supporto della microscopia confocale.

Le osservazioni condotte sugli esemplari di controllo hanno permesso di ottenere informazioni preliminari sul normale assetto organizzativo dei due organi considerati. Sulla base di questi dati è stato poi possibile effettuare un confronto con le informazioni provenienti dai campioni trattati, che hanno mostrato l'insorgenza di progressivi fenomeni degenerativi dipendenti dalla dose testata e dal tempo di permanenza all'interno del contaminante. Sul tessuto epatico è stata inoltre condotta l'analisi immunoistochimica che ha previsto l'impiego di anticorpi diretti contro due diverse isoforme del citocromo P-450, CYP-1A e CYP-3A, notoriamente coinvolte nel metabolismo ossidativo di numerosi xenobionti, e contro la caspasi-3, un mediatore cruciale dei processi apoptotici.

NONILFENOLO ETOSSILATO

Gli alchilfenoli etossilati (APE) sono tensioattivi non ionici di ampio utilizzo, che occupano la terza posizione nella classifica dei surfattanti maggiormente prodotti a livello mondiale (Greek and Layman, 1989); da oltre 50 anni, infatti, gli APE vengono utilizzati in numerose applicazioni, con una produzione annua di circa 500,000 tonnellate (Ashley *et al.*, 2003).

I nonilfenoli etossilati (NPE) sono i composti commercialmente più importanti tra gli alchilfenoli; dati recenti riportano un'immissione sul mercato di 154,200 tonnellate negli USA, 73,500 tonnellate in Europa, 16,500 tonnellate in Giappone e 16,000 tonnellate in Cina (Soares *et al.*, 2008).

La sintesi degli NPE risale al 1940 e da allora la loro produzione ha subito un incremento quasi esponenziale nel tempo (Soares *et al.*, 2008), con una domanda che cresce annualmente del 2% circa (USEPA, 2003); tali composti hanno infatti un alto costo effettivo ma manifestano performance eccezionali che li rendono idonei all'impiego in numerosi settori, da quello industriale a quelli domestico e agricolo (Soares *et al.*, 2008).

Basse concentrazioni di composti nonilfenolici risultano ubiquitarie nell'ambiente; nonostante i moderati livelli di contaminazione, i potenziali rischi per la salute umana e per gli ecosistemi sono ancora da chiarire e l'argomento suscita considerevoli dibattiti (Porter and Hayden, 2001).

1.1 Cenni storici

La prima evidenza che gli alchilfenoli etossilati potessero esibire attività estrogenica risale al 1938 (Dodds and Lawson, 1938); l'interesse scientifico per il nonilfenolo (NP) nasce però tra il 1983 e il 1984, quando Giger e collaboratori (1984) riscontrano per la prima volta effetti a carico di funzioni endocrine nei vertebrati acquatici. Sono tuttavia necessari circa 8 anni perché Soto *et al.* (1991) forniscano la prima chiara evidenza del coinvolgimento dei composti nonilfenolici in attività estrogeniche, osservando accidentalmente che il nonilfenolo, impiegato nella produzione delle provette, era in grado di promuovere la proliferazione cellulare nel tumore al seno, in maniera del tutto simile alla presenza di estrogeni.

1.2 Campo d'impiego

La sintesi degli NPE si basa sulla reazione di condensazione, in presenza di un catalizzatore alcalino (KOH/etanolo), tra una miscela di isomeri del nonilfenolo e l'ossido di etilene (Porter and Hayden, 2001).

In base al loro comportamento caratteristico, i composti nonilfenolici vengono suddivisi in quattro classi (Ahel *et al.*, 1994b):

- 1) Composti con un numero di unità etossiliche da 3 a 18 (NP3E-NP18E);
- 2) Nonilfenolo 1-etossilato e nonilfenolo 2-etossilato (NPE1+NPE2);
- 3) Nonilfenolo privo di catena etossilica;
- 4) Derivati carbossilati NP1EC (nonylphenoxy acetic acid) e NP2EC (nonylphenoxy-ethoxy-acetic acid), intermedi di degradazione caratterizzati dalla presenza, alla fine della catena etossilica, di un gruppo funzionale carbossilico ottenuto per carbossilazione microbica dell'NPE1 e dell'NPE2 rispettivamente.

I prodotti di condensazione con 4 unità ossietileniche sono utilizzati come emulsionanti e detergenti olio solubili o come materie prime nella produzione di tensioattivi non ionici. Miscele contenenti catene ossietileniche di 8-10 unità sono principalmente usate nei detergenti delle industrie tessile e conciaria, come componenti nei fluidi lubro-refrigeranti, nelle cartiere e nei processi di lavorazione del carbone, mentre i composti a catena più lunga vengono impiegati come emulsionanti nei solventi e come disperdenti nei pesticidi ad uso agricolo e domestico, oltre che nella produzione di materie plastiche.

1.3 Struttura e funzione

La struttura base del nonilfenolo è rappresentata da una catena alchilica contenente 9 atomi di carbonio, lineare o ramificata, legata ad un anello fenolico in posizione para rispetto al gruppo OH (Porter and Hayden, 2001). Nei derivati etossilati di tale composto, a livello del gruppo OH del fenolo si lega una catena etossilica (Fig. 1.1) (Hager, 1998); è dunque chiaro che le diverse combinazioni spaziali che la struttura descritta può assumere rappresentano isomeri del medesimo composto (Porter and Hayden, 2001).

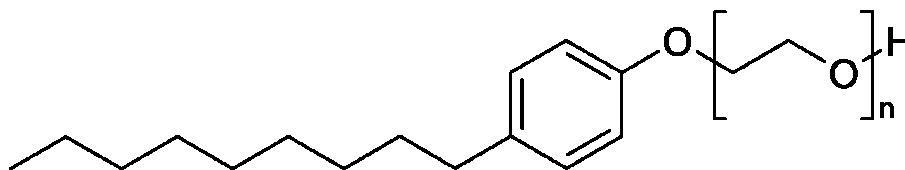


Fig. 1.1 Struttura del nonilfenolo etossilato

I meccanismi d'azione principalmente documentati per gli NPE coinvolgono interazioni con i recettori steroidei che comprendono il legame competitivo sia come agonisti che come antagonisti, l'induzione di alterazioni nell'espressione dei recettori stessi e/o nei signalling pathways post-recettoriali e, in definitiva, cambiamenti nel metabolismo ormonale; tuttavia alcuni autori hanno proposto che gli effetti indotti dagli NPE possano essere determinati dal coinvolgimento di meccanismi aggiuntivi non estrogenici (Laurenzana *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2004).

Oggi è ormai noto che l'NP è in grado di mimare l'azione dell'ormone naturale 17 β -estradiolo coinvolto nello sviluppo e nel mantenimento dei caratteri sessuali femminili, nella maturazione e nel funzionamento degli organi sessuali accessori e in altre funzioni neuroendocrine e del sistema scheletrico (Alberts *et al.*, 1983). Risulta dunque chiaro che i principali target potenzialmente interessati dall'azione di questi distruttori endocrini (EDC) sono rappresentati dalle gonadi, dai genitali esterni, dal cervello, dalla tiroide, dall'apparato scheletrico, dal fegato, dal rene e dal sistema immunitario (Lee and Lee, 1996).

Poichè la classe degli NPE comprende un ampio range di composti diversi, è stato necessario indagare su quali fossero le caratteristiche strutturali in grado di determinare il legame di questi contaminanti ai recettori estrogenici. A tale scopo è stata esaminata la capacità di una serie di fenoli con gruppi alchilici saturi in posizione para HO-C₆H₄-C_nH_{2n+1} (n=0 \pm 12) di competere con l'ormone naturale 17 β -estradiolo per il legame ad un recettore estrogenico umano ricombinante. I risultati di questa sperimentazione hanno dimostrato che tutti i para-alchilfenoli testati legano il recettore in maniera dose-dipendente, e che il legame al recettore diviene più forte all'aumentare del numero dei carboni alchilici, raggiungendo un picco massimo per n=9 (nonilfenolo). Il fenolo (n=0) esibisce un legame debole ma completo con il recettore mentre l'anisolo, con gruppi etossilati protetti, risulta completamente inattivo (Tabira *et al.*, 1999). Il comportamento esibito dai diversi composti ha quindi permesso di dedurre che il legame al recettore estrogenico sia il risultato di un'interazione covalente di due differenti costituenti delle molecole, quali fenolo e gruppo alchilico; queste due strutture corrispondono rispettivamente all'A-ring e alla porzione idrofobica della struttura degli steroidi (Fig. 1.2) e permettono agli alchilfenoli di imitarne l'azione biologica (Tabira *et al.*, 1999).

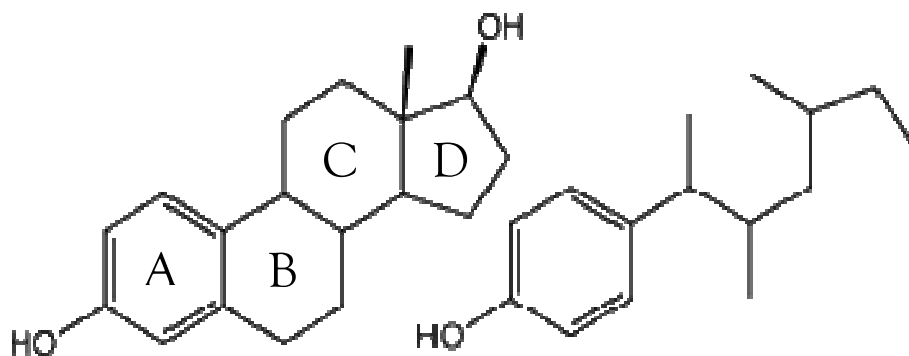


Fig. 1.2 Confronto tra la struttura del 17 β -estradiolo (a sinistra) ed il nonilfenolo (a destra)

I dati ottenuti hanno inoltre suggerito che le porzioni ramificate e non ramificate degli alchilfenoli interagiscono in maniera differente con la cavità lipofila del recettore estrogenico adibita al legame con il ligando (Tabira *et al.*, 1999).

Recentemente è stato dimostrato che il nonilfenolo è in grado di interferire anche con le funzioni androgeniche, rappresentate essenzialmente dal normale sviluppo del fenotipo maschile (Lee *et al.*, 2003); in questo caso, tuttavia, l'azione svolta dal contaminante non si esplicherebbe in una diretta competizione per il recettore androgenico ma in complessi fenomeni di attivazione del recettore stesso (Lee *et al.*, 2003).

1.3.1 Effetti non estrogenici

Watanabe e collaboratori (2004) hanno effettuato un'analisi dell'espressione genica nell'utero e nel fegato di topi di laboratorio dopo esposizione a nonilfenolo ed estradiolo. L'analisi di DNA microarray ha rivelato che nell'utero la maggior parte dei geni attivati da alte dosi di nonilfenolo (50 mg/Kg) sono azionati anche dall'estradiolo; a bassi dosaggi (0,5 mg/Kg e 5 mg/Kg), invece, il contaminante non produce effetti di attivazione genica. Il dato più interessante è stato però registrato a livello epatico, dove l'NP è in grado di attivare un numero maggiore di geni rispetto all'estradiolo; questo risultato prova non solo che il contaminante ha azione tessuto specifica, ma sottolinea il coinvolgimento di loci diversi da quelli responsivi agli estrogeni, aprendo la strada all'ipotesi del coinvolgimento di pathways molecolari che non implicano l'azione ormono-simile.

1.4 Caratteristiche chimico-fisiche

Dal punto di vista chimico-fisico risulta complesso e difficoltoso generalizzare circa le caratteristiche di una così ampia classe di composti quali sono gli NPE, soprattutto se si considera che la maggior parte dei lavori presenti in letteratura impiega come contaminante oggetto di studio il nonilfenolo, derivato privo della catena etossilica, che rappresenta il prodotto finale della degradazione dei suoi precursori etossilati. Di seguito sono dunque riportate le caratteristiche chimico-fisiche note per il nonilfenolo, e solo alcuni dati relativi al nonilfenolo 10 etossilato (NP10E) utilizzato nel presente lavoro, forniti dalla Carlo Erba reagenti.

Il nonilfenolo si presenta in forma di liquido viscoso dal colore giallo pallido, con un leggero odore fenolico. Il peso molecolare del composto è stimato tra i 215,0 e i 220,4 g/mole, mentre il peso specifico a 20°C è di 0,953 g/ml. La pressione di vapore calcolata per l'NP è di $4,55 \times 10^3$ Pa e la costante di dissociazione (pK_a) è di $10,7 \pm 1,0$. La solubilità del composto è determinata dalla capacità del gruppo idrossilico attaccato al fenolo di dissociarsi a pH elevati (Hellyer, 1991); i valori calcolati sono pari a 4,600 µg/l a pH 5,0, 6,237 µg/l a pH 7,0 e 11,897 µg/l a pH 9,0.

L'indice di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}) è un parametro spesso utilizzato in studi ambientali nel tentativo di determinare il destino di sostanze chimiche in natura o come coefficiente di predizione del grado di bioaccumulo di un contaminante nei pesci; esso è dato dal rapporto tra la concentrazione dell'agente chimico disciolto in ottanolo e la concentrazione della medesima sostanza in acqua ad una specifica temperatura. L'alto coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, riportato in tabella, rivela la natura idrofobica del nonilfenolo e ne influenza il destino ambientale; il contaminante tende, infatti, ad aderire ai sedimenti e ad attaccarsi ai solidi durante il trattamento delle acque reflue.

Le caratteristiche lipofile del nonilfenolo lo rendono inoltre un composto resistente alla biodegradazione; esiste dunque un rischio potenziale di accumulo nei tessuti degli animali superiori. Il BAF (fattore di bioaccumulazione) è un parametro che si basa sull'assunzione di un agente chimico dall'ambiente circostante e dagli alimenti ed è dato dal rapporto, in condizioni di equilibrio, tra la concentrazione di una sostanza chimica all'interno di un organismo e la concentrazione della medesima sostanza in acqua. Il BCF (fattore di bioconcentrazione predetto) si basa invece esclusivamente sulla captazione del contaminante dall'ambiente circostante, senza comprendere l'assorbimento dal cibo; BCF o BAF maggiori di 1000 sono generalmente considerati indici di bioaccumulo. Servos (1999) riporta per il nonilfenolo BCF e BAF in un range di valori tra 0,9 e 3400, definendo da basso a moderato il rischio relativo di bioaccumulo per tale composto.

Pur presentando una pressione di vapore (pressione parziale del vapore della sostanza all'equilibrio fra la fase liquida e la fase gassosa) relativamente bassa, il nonilfenolo risulta essere un composto moderatamente volatile, il cui passaggio dall'acqua all'atmosfera genera notevole preoccupazione. Tale caratteristica è determinata dalla costante della legge di Henry, che indica il rapporto tra la concentrazione di un composto in aria e la sua concentrazione in acqua in condizioni di equilibrio. Lyman e collaboratori (1990) riportano, per sostanze moderatamente volatili, valori della costante di Henry tra 10^5 e 10^7 atm·m³/mole, range nel quale rientrano i dati riportati per il nonilfenolo (da $1,51 \times 10^5$ a 4×10^5) (Shiu *et al.*, 1994; Dachs *et al.*, 1999; Van Ry *et al.*, 2000).

Nella tabella di seguito sono riassunte le proprietà chimico-fisiche generali del nonilfenolo finora discusse.

Proprietà	Valore	Bibliografia
Formula	C ₁₅ H ₂₄ O	Shiu <i>et al.</i> , 1994
Peso molecolare	220,36	Shiu <i>et al.</i> , 1994
Peso specifico	0,950	Verschueren, 1983
Punto di ebollizione (°C)	315	Verschueren, 1983
Punto di congelamento (°C)	-10	Verschueren, 1983
Temperatura di melting (°C)	42	Shiu <i>et al.</i> , 1994
Pressione di vapore a 25°C (Pa)	0,3	Muller and Schlatter, 1998
pKa	10,28	Muller and Schlatter, 1998

Log K _{ow}	> 4,0	Thiele <i>et al.</i> , 1997
Log K _{ow}	da 3,80 a >4,75	Romano, 1991
Log K _{ow}	4,48	Shiu <i>et al.</i> , 1994
Log K _{ow}	4,48	Ahel and Giger, 1993b
Log K _{oc}	4,4	Porter and Hayden, 2001
Log K _{oc}	4,7	Sekela <i>et al.</i> , 1999
Solubilità (mg/l)	da 5,43 a 6	Ahel and Giger, 1993a; Muller and Schlatter, 1998
Solubilità (mg/l) a pH 5, 7, 9	4,6 - 6,24 - 11,9	Hellyer, 1991
Solubilità in acqua distillata 2°C, 25°C	4,600 µg/l - 6,350 µg/L	Ahel and Giger, 1993°
Costante della legge di Henry (Pa·m ³ /mol)	da 1,51 a 4,05	Shiu <i>et al.</i> , 1994; Dachs <i>et al.</i> , 1999; Van Ry <i>et al.</i> , 2000
BCF (fattore di bioconcentrazione), trota	da 24 a 98	Lewis and Lech, 1996
BAF (fattore di bioaccumulazione), pesci	da <1 a 1250	Staples <i>et al.</i> , 1998
BAF, invertebrati	da 1 a 3400	Staples <i>et al.</i> , 1998
BAF, valori di campo	da 6 to 487	Staples <i>et al.</i> , 1998
Tossicità in organismi acquatici (µg/l)	da 20 a 3000	Staples <i>et al.</i> , 1998

Alcune delle caratteristiche chimico-fisiche riportate per il nonilfenolo sono comuni anche ai suoi precursori etossilati.

Nella tabella di seguito sono riportati alcuni dati relativi all'NP10E forniti dalla Carlo Erba Reagenti:

Formula	CH ₃ -(CH ₂) ₈ -C ₆ H ₄ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₀ -OH
Temperatura di fusione	5 - 15 °C
Punto di infiammabilità	150°C
Densità a 20°C	1,06 g/cm ³
Solubilità in acqua	Completamente solubile
Solubilità in solventi organici	Solubile in molti solventi organici
LD ₅₀ ratto	<2000 mg/Kg
LD ₅₀ coniglio	>2000 mg/Kg
LC ₅₀ pesci	1,0 mg/l

1.5 Classificazione e status

A causa degli effetti tossici manifestati dagli NPE, a metà degli anni 90 i Paesi Europei hanno avviato piani di azione contro tali sostanze, introducendo inizialmente accordi volontari tra le industrie e i governi al fine di ridurre l'uso e la produzione (PARCOM 92/8, 2000). Queste iniziative promosse dall'Unione Europea hanno indotto la United States Chemical Manufacturers Association (USCMA) e la United States Environmental Protection Agency (USEPA) ad avviare una serie di studi volti a valutare il grado di contaminazione dei fiumi e delle acque reflue negli Stati Uniti. Da tali studi è inizialmente emerso che la degradazione degli NPE risultava più efficiente negli impianti di depurazione fognaria degli Stati Uniti rispetto ai corrispettivi europei, dstando reazioni nei confronti dell'Europa accusata di essere intervenuta drasticamente in relazione ad una questione che richiedeva ulteriori approfondimenti (Renner, 1997, 2000). Dati prodotti in seguito hanno però dimostrato che gli NPE sono presenti in concentrazioni rilevanti nei fiumi e nelle acque reflue degli Stati Uniti (Bennett and Metcalfe, 1998; Hale *et al.*, 2000; La Guardia *et al.*, 2001; Pryor *et al.*, 2002). Con la direttiva 2000/60/EC (Water Framework Directive) i composti nonilfenolici sono stati dunque classificati come "priority hazardous substances" e il loro uso è stato regolamentato (Direttiva 2003/53/EC, 2003). Un ulteriore sostegno alla causa è stato fornito dall'European Commission, che nel 2001 ha introdotto l'NP tra i 32 "priority pollutants of surface waters" e tra gli 11 contaminanti per i quali è necessario implementare la già drastica politica di riduzione dell'emissione in Europa (European Commission, 2001).

Attualmente l'USEPA ha accettato i rischi tossicologici associati ai composti nonilfenolici ed ha fornito le linee guida per la qualità degli ambienti acquatici, raccomandando concentrazioni di nonilfenolo inferiori a 6,6 mg/l in acqua dolce ed a 1,7 mg/l in acqua salata (Brooke and Thursby, 2005).

Nonostante ciò, in paesi come la Cina, l'India e alcune zone del Sud America, gli NPE vengono ancora prodotti e consumati in grandi quantità e non è stata intrapresa alcuna azione per ridurre o eliminarne l'utilizzo (Soares *et al.*, 2008). Di fatto tali composti potrebbero essere sostituiti da altri tensioattivi che, nei mercati europei, canadesi e giapponesi, sono per lo più rappresentati da alcoli etossilati; tuttavia, sebbene tali sostanze vengano degradate più rapidamente e risultino, a livello teorico, più sicure per l'ambiente, esse manifestano una minore efficienza rispetto ai composti nonilfenolici (Campbell, 2002) e poche sono attualmente le conoscenze sui metaboliti che potrebbero produrre. Recentemente è stato sottolineato che alcuni derivati della degradazione degli alcoli etossilati potrebbero manifestare bassa solubilità in acqua ed essere assorbiti dai fanghi solidi (Soares, 2005).

1.6 Degradazione e destino ambientale

La presenza dei composti nonilfenolici nell'ambiente è chiaramente correlata alle attività antropiche; di fatto questi contaminanti raggiungono i corpi d'acqua naturali (fiumi, mari e raccolte d'acqua di ogni genere) prevalentemente attraverso lo scarico industriale e domestico, ma la contaminazione può avvenire anche per via diretta attraverso l'aspirazione di pesticidi nell'ambiente (Cakal Arslan and Parlak, 2007).

La percentuale di eliminazione antropica dei prodotti primari (NPE) va dal 63% (Okpokwasili and Olisa, 1991) a quasi il 100% (Patoczka and Pulliam, 1990), con una mineralizzazione (trasformazione in anidride carbonica ed acqua) che varia da percentuali molto basse (Patoczka and Pulliam, 1990) ad oltre il 90% (Fuka and Pitter, 1980). In Canada nel 1996 lo scarico diretto di derivati nonilfenolici da parte delle industrie è stato stimato essere circa 96 tonnellate (Servos *et al.*, 2003).

A causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche quali bassa solubilità ed elevata idrofobicità, gli NPE tendono ad accumularsi nei compartimenti ambientali caratterizzati da un'alta componente organica, tipicamente rappresentati dai sedimenti fluviali e dalle acque di scarico (Soares *et al.*, 2008), dove si instaurano le condizioni necessarie alla degradazione in composti a catena etossilica ridotta.

Nel 1981, Sundaram e Szeto hanno stimato l'emivita dei composti nonilfenolici a 2,5 giorni in sistemi sperimentali aperti, in cui intervengono fenomeni di volatilizzazione. La permanenza del composto in acqua raggiunge però i 16 giorni circa in sistemi sperimentali chiusi, in cui l'allontanamento del composto per via aerea non è concesso. Nello stesso lavoro, gli autori hanno valutato gli effetti della degradazione del nonilfenolo etossilato in acque miste a sedimento; i dati ottenuti in questo secondo caso hanno dimostrato che dopo 10 giorni il 50% del contaminante era ancora presente e, dopo 70 giorni, solo l'80% era stato degradato (Sundaram and Szeto, 1981).

La comprensione dei meccanismi alla base della degradazione degli NPE rappresenta dunque un importante passo verso una corretta interpretazione del comportamento di tali composti nell'ambiente. La biodegradazione primaria, che può avvenire sia per via aerobica che per via anaerobica, comporta l'idrolisi dei gruppi ossietilenici che sono rimossi progressivamente dalla molecola; questo passaggio, relativamente veloce, conduce alla formazione di differenti prodotti intermedi a mano a mano che la catena etossilica viene accorciata. La completa mineralizzazione dei prodotti intermedi avviene invece molto lentamente e il meccanismo e l'entità con cui si verifica non sono stati del tutto chiariti (Porter and Hyden, 2002).

Poche sono le informazioni a nostra disposizione circa le reazioni metaboliche che si instaurano in condizioni di anaerobiosi (ad esempio negli impianti di depurazione fognari) mentre maggiori dati si conoscono sugli eventi che si verificano in condizioni aerobiche. In questi casi, durante le fasi di degradazione sono stati osservati due tipi di reazioni: il taglio della

catena etossilica e l'aggiunta di gruppi carbossilici a livello di questa. L'ordine in cui tali processi si verificano non è ancora chiaro; i primi dati riportati da Manzano e collaboratori (1999) hanno documentato una degradazione primaria dei nonilfenoli etossilati a catena lunga in nonilfenoli etossilati a catena etossilica corta (1 o 2 gruppi etossilici), seguita dalla carbossilazione delle catene etossiliche brevi che determina la formazione di nonilfenoli etossicarbossilati. Nel 2001 Jonkers ha invece dimostrato che, nella degradazione degli NPE, si verifica prima la carbossilazione delle catene etossiliche lunghe, seguita solo successivamente dal taglio della catena stessa (Jonkers *et al.*, 2001).

E' importante sottolineare che negli studi condotti in laboratorio il nonilfenolo non è stato mai identificato tra i prodotti della degradazione aerobica degli NPE, ma dati di campo hanno rivelato la presenza di tale composto in ambienti ben areati originariamente contaminati da nonilfenoli etossilati, indicando le probabili difficoltà di simulazione dei processi di degradazione in esperimenti di "bench-scale" (Corsi *et al.*, 2003; Koh *et al.*, 2005).

1.6.1 Effetto della temperatura

La temperatura rappresenta un ulteriore parametro ambientale in grado di influire fortemente sul tasso di biodegradazione degli NPE; è stato infatti dimostrato che la biotrasformazione di questi composti è da 2 a 10 volte più alta ad una temperatura di 22,5°C rispetto a quanto si verifica a 13°C (Kravetz *et al.*, 1983; Ahel *et al.*, 1994b; Manzano *et al.*, 1999). Questo dato si trova in accordo con le variazioni stagionali registrate per le concentrazioni ambientali di contaminante che risultano maggiori nei mesi invernali, quando la temperatura atmosferica è minore, mentre decrescono in estate, quando il composto esposto ai raggi solari presenta un'emivita di circa 10-15 ore (Ahel *et al.*, 1994c).

1.6.2 Effetto della salinità

Studi condotti sulla biodegradazione degli NPE in acqua di mare e in sedimenti provenienti da fondali di corpi d'acqua salata, hanno permesso di ipotizzare che in tali condizioni i processi di metabolizzazione risultino rallentati rispetto a quanto si verifica nelle acque dolci e nei sedimenti ad esse annessi. Ekelund e collaboratori (1993) riportano, in acqua di mare, una percentuale di degradazione del nonilfenolo etossilato del 50% dopo 58 giorni. Ulteriori dati relativi ai sedimenti marini documentano, per gli NPE, un'emivita di 60 giorni (Shang *et al.*, 1999).

In aggiunta, Ferguson e Brownawell (2003) hanno dimostrato che in ambiente marino la degradazione dei composti alchilfenolici si verifica sia in presenza di ossigeno che in condizioni anossiche.

1.7 Limiti di campionamento e determinazione delle concentrazioni in natura

Esistono due approcci di base per affrontare il problema della contaminazione ambientale da parte di sostanze chimiche; il primo approccio è quello di dimostrare la sicurezza di un composto e dei suoi potenziali sottoprodotti prima che se ne permetta l'uso e lo scarico nell'ambiente. Il secondo approccio è quello di permettere l'utilizzo di sostanze chimiche la cui tossicità e rischio per gli ecosistemi e per la salute umana non siano chiaramente provati e, successivamente, valutarne gli effetti nel tempo.

A partire dal 1980, i Paesi Europei hanno adottato il primo approccio limitando, e in alcuni casi vietando, l'uso dei nonilfenoli etossilati (Renner, 1997).

Gli Stati Uniti hanno invece adottato il secondo approccio, consentendo l'impiego di questi composti per i quali non sono tuttora chiari, anche a basse concentrazioni, gli effetti sulla salute degli ecosistemi. Il problema che si riscontra in questo secondo caso è dato dal fatto che gli effetti indotti da basse concentrazioni di agenti contaminanti sull'ambiente possono essere così complessi e di difficile determinazione da non consentire una chiara prova scientifica di tossicità (Porter and Hayden, 2002).

E' importante ad esempio sottolineare che, quando si determina l'impatto di contaminanti idrofobici quali sono ad esempio gli NPE, il campionamento deve essere fatto in un mezzo in cui la sostanza chimica idrofobica è facilmente riscontrabile; nel caso del nonilfenolo, ad esempio, fenomeni di sottostima delle concentrazioni si possono avere se ci si riferisce a campionamenti effettuati in acqua di fiume senza che se ne associ una stima a livello dei sedimenti annessi al corpo d'acqua.

Inoltre, difficoltà associate al campionamento, al maneggiamento e all'analisi del nonilfenolo, sono determinate dalla mancanza di informazioni circa il comportamento del composto stesso; durante il prelievo, la conservazione e il processamento dei campioni, infatti, il composto può essere facilmente perso per volatilizzazione o per assorbimento, con conseguente sottostima della reale concentrazione del contaminante (Porter and Hayden, 2002).

La tecnica dell'estrazione in fase solida da campioni di acqua contaminata permette di ottenere un buon recupero della quantità di nonilfenolo presente nel bacino idrico; contrariamente, passare da un campione analitico al successivo può causare maggiori probabilità di errore nella determinazione della concentrazione del composto (Porter and Hayden, 2001).

1.8 Concentrazioni in natura

I nonilfenoli etossilati sono i composti più abbondanti negli effluenti primari degli impianti di depurazione (82,4%), ma i vari prodotti metabolici recano comunque un

contributo considerevole (17,6%): infatti, l'11,5% spetta all'NP1E e all'NP2E, mentre il resto è ripartito equamente tra NP ed NP1EC più NP2EC (Ahel *et al.*, 1994b).

Gli effluenti secondari mostrano un andamento molto diverso: gli oligomeri più pesanti non sono presenti e oltre il 70% dei composti nonilfenolici è rappresentato da prodotti metabolici (Ahel *et al.*, 1994b); la classe più abbondante (46,1%) è quella dei composti carbossilati (NP1EC ed NP2EC), mentre i metaboliti lipofili, ossia NP1E più NP2E ed NP, costituiscono il 21,8 e il 3,9% rispettivamente (Ahel *et al.*, 1994b). Si tratta, tuttavia, di valori medi che possono variare soprattutto in relazione alla concentrazione dei composti originari e ai comuni parametri organici quali BOD (domanda di ossigeno biologico), COD (richiesta chimica di ossigeno) e DOC (carbonio organico disciolto).

I cambiamenti di concentrazione degli NPE originari sono inoltre seguiti da analoghi andamenti delle concentrazioni di NP, NP1E ed NP2E; contrariamente, la produzione di NP1EC ed NP2EC diminuisce durante i periodi di carico massimo negli scarichi, a causa della riduzione dell'ossigeno necessario alla trasformazione aerobica che li origina (Ahel *et al.*, 1994b).

L'eliminazione degli NPE dall'acqua è dunque influenzata dai processi chimico-fisici e dalla ripartizione tra le fasi acquosa e solida (adsorbimento); di conseguenza, considerare solamente le acque rilasciate da un impianto di depurazione conduce ad una sovrastima dell'efficienza di abbattimento degli NPE e ad una sottostima del carico inquinante rilasciato nell'ambiente.

Da analisi congiunte delle acque e dei fanghi è infatti emerso che almeno il 60-65% di tutti i composti nonilfenolici in ingresso negli impianti di depurazione vengono, al termine del processo di purificazione, rilasciati nell'ambiente (Ahel *et al.*, 1994b).

In Italia dati relativi alle concentrazioni di composti nonilfenolici sono stati riportati da Marcomini e collaboratori (1990), che hanno riscontrato valori di nonilfenolo tra 0,15 e 13,7 mg/l nelle acque superficiali della laguna di Venezia; inoltre, la concentrazione di nonilfenolo estratta dai sedimenti è risultata maggiore in aree caratterizzate da grandi masse di macroalghe decomposte (principalmente *Ulva rigida*) rispetto alle zone non associate a fenomeni di decomposizione (Marcomini *et al.*, 1990).

Di Corcia e Samperi (1994) riportano per le acque italiane concentrazioni medie di NPE tra 0,7 e 4 µg/l e di NP tra 2 e 27 µg/l.

Nelle acque del Lago Maggiore (nord Italia), è stata registrata una concentrazione di NP pari a 15 ng/l; per i metaboliti carbossilati le quantità rilevate sono state di 120 ng/l per l'NPE1C, 7 ng/l per l'NPE2C e 15 ng/l per l'NPE3C, mentre per gli NPE la concentrazione raggiunge i 300 ng/l (Loos *et al.*, 2007).

Patrolecco e collaboratori (2006) riportano per le acque romane valori di NP da 0,06 a 0,48 µg/l per l'NP1E e da 0,04 a 0,42 µg/l per l'NP2E.

In un lavoro condotto su acque di scarico provenienti da industrie tessili localizzate in Italia e in Belgio, sono state rilevate concentrazioni di NPE1C e NP2E maggiori di 4,5 µg/l, mentre per l'NP è stato riportato il valore massimo di 2,5 µg/l (Loos *et al.*, 2007).

Per la Spagna, le concentrazioni di NPE variano tra 6 e 600 µg/l (Solé *et al.*, 2000; Ying *et al.*, 2002) mentre quelle di NP vanno da valori al di sotto del limite di detection (LOD) a 644 µg/l (Solé *et al.*, 2000).

Ahel *et al.* (1994b) riportano per gli NPE concentrazioni comprese tra 45 e 71 µg/l in acque superficiali provenienti da bacini inglesi. Un dato risalente all'anno successivo relativo al Regno Unito, documenta invece per l'NP concentrazioni che variano da valori inferiori a 0,03 µg/l a 53 µg/l, fino ad arrivare a concentrazioni pari a 330 µg/l nelle acque dell'Aire River (Blackburn and Waldock, 1995).

In Svizzera sono state riscontrate concentrazioni di NP, NP1E e NP2E di 7-26 µg/l, 2,0-20 µg/l e 0,8-21 µg/l rispettivamente (Ahel *et al.*, 1996; Ahel *et al.*, 2000). Barber *et al.* (2000) hanno rinvenuto i medesimi composti nelle acque di scarico di effluenti di Zurigo in concentrazioni che si aggirano tra 100 e 300 µg/l.

Snyder *et al.* (1999) riportano in acque di scarico domestiche del Michigan concentrazioni di NP tra 0,017 e 37 µg/l.

In uno studio prodotto da Koplín (Koplín *et al.* 2002) tra il 1999 e il 2000 è stata indagata la presenza di 95 contaminanti organici nelle acque reflue provenienti da 139 corsi d'acqua degli Stati Uniti; i dati ottenuti hanno dimostrato che NP, NP1E, ed NP2E sono tra i composti più comuni, con un range di concentrazioni molto alte. Sempre negli USA, Ying e collaboratori (2002) hanno misurato concentrazioni di NP tra 0,18 e 15,9 µg/l e di NP3E tra 8,77 e 78,8 µg/l.

Nel 1978 la Japanese Environmental Agency ha calcolato i livelli di APE in acque di fiume, ottenendo valori tra 0,13 e 0,93 µg/l (Yoshimura, 1986). In un lavoro del 2001 sono invece riportate, per il Giappone, concentrazioni di NP tra 0,05 e 308 µg/l (Isobe *et al.*, 2001).

In Cina le concentrazioni di NPE vanno da 2,5 a 97,6 µg/l, mentre per l'NP il range va da 1,7 a 7,3 µg/l. (Shao *et al.*, 2005).

Nell'isola di Taiwan le quantità di composti nonilfenolici ritrovate nei corpi idrici raggiungono i 310 µg/l per l'NP, i 27,2 µg/l per l'NP1E e i 27,5 µg/l per l'NP2E (Chen and Yeh, 2010).

1.9 Metabolismo e bioconcentrazione

I composti nonilfenolici sono metabolizzati a livello epatico dal sistema enzimatico del citocromo P-450 (Porter and Hayden, 2002).

Sebbene per questa classe di contaminanti sia stata in precedenza sottolineata una capacità moderata di bioaccumulo, studi di laboratorio e di campo hanno dimostrato che gli

NPE vengono metabolizzati solo parzialmente all'interno dei tessuti. McLeese (1980a) ha stimato che il fattore di bioconcentrazione in *Mytilus edulis* varia da 1,4 a 7,9, mentre raggiunge il valore 75 nel Salmone atlantico (*Salmo salar*) (McLeese *et al.*, 1981).

Hecht *et al.* (2004) riportano per tre specie di anfipodi marini, *Eohaustorius estuarium*, *Grandidierella japonica* e *Corophidium salmonis*, BCF pari a 154, 185 e da 46 a 133 rispettivamente.

Keith e collaboratori (2001) hanno misurato la concentrazione di composti nonilfenolici nei tessuti di pesci appartenenti a sette specie diverse provenienti dal fiume Kalamazoo e dalle acque presenti alla confluenza con il lago Michigan rilevando, nel 41% dei campioni, una concentrazione di contaminante tra 3,3 e 29,1 µg/Kg.

1.10 Tossicità acuta in organismi acquatici

I test di tossicità acuta condotti su organismi acquatici esposti a composti nonilfenolici, hanno permesso di ottenere per diverse specie i valori di LC₅₀; alcuni di questi dati sono riassunti nella tabella di seguito.

Specie	Composto	LC50/24h µg/l	LC50/48h µg/l	LC50/96h µg/l	Bibliografia
<i>Pimephales promelas</i>	NP			136	TenEyck and Markee, 2007
	NP1E			218	
	NP2E			323	
<i>Pimephales promelas</i>		330		270	Dwyer <i>et al.</i> , 2005
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	NP		92,4		TenEyck and Markee, 2007
	NP1E		328		
	NP2E		716		
<i>Oncorhyncus mykiss</i>	NP	300		190	Dwyer <i>et al.</i> , 2005
<i>Oncorhyncus apache</i>	NP	240		170	Dwyer <i>et al.</i> , 2005
<i>Oncorhyncus clarki stomais</i>	NP	300		150	Dwyer <i>et al.</i> , 2005
<i>Oncorhyncus clarki henshawi</i>	NP	250		180	Dwyer <i>et al.</i> , 2005
<i>Gila elegans</i>	NP	490		290	Dwyer <i>et al.</i> , 2005
<i>Ptychocheilus lucius</i>	NP	280		260	Dwyer <i>et al.</i> , 2005
<i>Xyrauchen texanus</i>	NP	220		170	Dwyer <i>et al.</i> ,

					2005
<i>Pleuronectes americanus</i>	NP			17	Lussier, 2000
<i>Mulinia lateralis</i>	NP		37,9		Lussier, 2000
<i>Paleomonetes Vulgaris</i>	NP		59,4		Lussier, 2000
<i>Homarus americanus</i>	NP		71		Lussier, 2000
<i>Americamysis bahia</i>	NP		60,6		Lussier, 2000
<i>Leptocheirus plumulosos</i>	NP		61,6		Lussier, 2000
<i>Menidia beryllina</i>	NP		70		Lussier, 2000
<i>Homarus americanus</i>	NP		71		Lussier, 2000
<i>Cyprinodon variegates</i>	NP		142		Lussier, 2000
<i>Dyspanopius sayii</i>	NP		> 195		Lussier, 2000

1.11 Tossicità cronica in organismi acquatici

1.11.1 Invertebrati acquatici

In *Daphnia magna* l'esposizione a 4-nonilfenolo (10 µg/l) determina una riduzione della sopravvivenza, ritardo riproduttivo e decremento della taglia degli organismi che raggiungono la maturità sessuale (Beklioglu *et al.*, 2010).

Effetti genotossici sono stati riportati da Park e Choi (2009) nel crostaceo d'acqua dolce *Chironomus riparius*, mentre nel riccio di mare *Arbacia lixula*, sono state osservate malformazioni del sistema scheletrico dopo esposizione a basse concentrazioni di NP (0,937 µg/l), e fenomeni di inibizione della crescita degli embrioni nei primi stadi di vita nel trattamento con alte concentrazioni (18,74 µg/l) (Cakal Arslan and Parlak, 2007).

1.11.2 Pesci

Nei Pesci il monitoraggio degli ormoni sessuali steroidei come il 17β-estradiolo e l'11-chetotestosterone è spesso utilizzato per valutare gli effetti biologici dell'esposizione a contaminanti ambientali. In aggiunta ai valori ormonali, un ulteriore biomarker particolarmente utilizzato nell'esposizione ad EDC sia nei Pesci che in altri Vertebrati ovipari è rappresentato dalla vitellogenina (Vtg), una fosfoproteina estrogeno-inducibile, precursore della proteina del tuorlo (Ishibashi *et al.*, 2004).

In condizioni fisiologiche la vitellogenina è secreta dal fegato sotto diretto controllo estrogenico (Ho, 1987) ma, soprattutto negli esemplari di sesso maschile, può essere indotta dalla presenza di xenoestrogeni (Silversand *et al.*, 1993; Lech *et al.*, 1996).

In un lavoro del 2007 condotto su *Salmo salar*, Arukwe e Røe (2008) hanno valutato le alterazioni indotte dall'esposizione cronica (3, 7 e 10 giorni) a 2 concentrazioni di nonilfenolo (10 e 60 µg/l) sui livelli di espressione di diversi target quali i recettori estrogenici epidermici ed epatici ER α ed ER β , la vitellogenina e la proteina della zona radiata. I dati ottenuti nelle diverse condizioni sperimentali hanno rivelato un incremento di espressione dose/tempo dipendente in tutti i target presi in considerazione.

Un incremento dell'espressione della vitellogenina è stata riportata anche in un lavoro prodotto da Madsen sulla medesima specie, dopo 24 h di esposizione ad una concentrazione di NP pari a 13,6 µmol (Madsen *et al.*, 1997). Un incremento del 61% nell'espressione di questa proteina è stato inoltre osservato da Casini su *Cyprinus carpio* per concentrazioni di nonilfenolo di 100 mg/Kg (Casini *et al.*, 2002)

I dati forniti da Huang *et al.* (2010) per *Oreochromis niloticus*, hanno rivelato un incremento dell'espressione del recettore estrogenico α a livello testicolare dopo 2-4 settimane di esposizione a nonilfenolo. Essi hanno inoltre osservato che, mentre i livelli di mRNA del recettore ER β 1 rimangono inalterati, quelli di ER β 2 subiscono un decremento, suggerendo che l'esposizione al contaminante potrebbe attivare, nelle tre diverse isoforme recettoriali, meccanismi molecolari di diverso tipo.

In *Psetta maxima* l'esposizione ad NP induce decremento dei livelli di androstenedione e 11-ketotestosterone (Labadie and Budzinski, 2006).

Un decremento dei livelli androgenici (20-30%) è stato osservato anche in *Carassius auratus* dopo esposizione a concentrazioni di nonilfenolo superiori a 10 mg/l (Yang *et al.*, 2008), in associazione ad un incremento dei livelli sierici di estrogeni (circa 2 volte i valori normali).

Un dato correlabile è stato ottenuto in *Gambusia holbrooki*, in cui l'esposizione a 4-NP (50 mg/L) ha determinato femminilizzazione e sottosviluppo gonadico, accompagnati da riduzione della crescita e insorgenza di fenomeni istopatologici a livello epatico (Drèze and Monod, 2000).

Hara e collaboratori (2007) hanno registrato un decremento nella velocità di nuoto degli spermatozoi di *Oryzias latipes* esposti, per 60 secondi, ad una concentrazione di nonilfenolo di 100 µmol/l.

Negli embrioni di Zebrafish (*Danio rerio*) l'NP determina malformazioni della regione caudale della spina dorsale e alterazioni nella forma della coda (Kamman *et al.*, 2009).

In *Oncorhynchus mykiss* il trattamento con il contaminante (1 µg/l e 10 µg/l) causa alterazioni nel normale assetto organizzativo dell'epidermide; le cellule dell'endotelio mostrano vacuolizzazione del citoplasma e deformazione nucleare. La presenza dell'NP determina, inoltre,

distacco delle cellule pavimentose e modificazioni nel pattern di granulazione delle cellule mucose, in associazione a fenomeni di infiltrazione leucocitaria (Burkhardt-Holm *et al.*, 2000).

1.12 Tossicità in organismi terrestri

Dati bibliografici riportano alterazioni causate dall'esposizione ad NP anche in organismi terrestri. In un esperimento condotto da Qiu *et al.* (2005) su ratti di sesso maschile esposti al contaminante (200 mg/kg) durante il periodo di maturazione sessuale, sono state osservate alterazioni nel normale sviluppo degli organi sessuali.

Utilizzando lo stesso organismo target, Chitra e collaboratori (2002) hanno messo in evidenza che la somministrazione orale di NP (1, 10 e 100 µg/kg) determina un significativo decremento del peso dei testicoli e dell'epididimo, accompagnato dalla diminuzione del numero di spermatozoi. Nello stesso lavoro è stato inoltre registrato un decremento nell'attività antiossidante degli enzimi superossido dismutasi, catalasi, glutatione reduttasi e glutatione perossidasi, con conseguente incremento dello stress ossidativo, reso evidente dall'aumento della produzione di H₂O₂ e della perossidazione lipidica. Dati confrontabili figurano in un esperimento condotto nel 2007 da El-Dakdoky ed Helal (2007) che, in aggiunta, riportano fenomeni degenerativi e necrotici (formazioni vacuolari) a carico delle cellule dello strato germinativo dei tubuli seminiferi, accompagnati da diminuzione del diametro cellulare.

Fenomeni di stress ossidativo con formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono stati riportati nel 2009 anche da Hsieh in ratti esposti a nonilfenolo.

Nel 2004 Han e collaboratori hanno osservato che, nella stessa specie target, trattamenti quotidiani con una quantità di NP pari a 250 mg/kg, determinano un incremento delle dimensioni dei reni e del fegato del 14 e del 22% rispettivamente. Essi hanno inoltre registrato un drammatico decremento del peso assoluto e relativo dell'epididimo, accompagnato da una diminuzione della densità spermatica e da fenomeni apoptotici nell'epitelio seminifero; tali alterazioni risultano associate, a livello ormonale, ad un decremento dei livelli di testosterone e ad un aumento dei livelli degli ormoni luteinizzante (LH) e follicolo-stimolante (FSH) (Han *et al.*, 2004).

Questi risultati confermano i dati precedentemente forniti da Lee e colleghi (1998), che hanno riportato una riduzione delle dimensioni degli organi riproduttivi (testicoli, epididimo, vescichette seminali e prostata) in ratti maschio "Sprague Dawley" sottoposti, in età neonatale, al trattamento con NP (8 mg/l) (Lee, 1998).

Gli effetti del nonilfenolo sono stati saggiati anche in ratti "offspring" durante le fasi di differenziazione sessuale. Da questo lavoro è emerso che la somministrazione di alte dosi di contaminante (60, 600 and 3000 ppm) causa un decremento del peso corporeo materno con un ritardo nella crescita dei neonati, senza determinare apparentemente alterazioni nei cicli ormonali dei piccoli (Takagi *et al.*, 2004).

Kyselova *et al.* (2003) hanno studiato gli effetti multi generazionali dell'esposizione ad NP in topi di laboratorio; i dati ottenuti hanno dimostrato l'insorgenza di alterazioni nella spermatogenesi e nella qualità dei gameti maschili.

A livello dei tubuli renali, il trattamento con NP induce un incremento del calcio citosolico $[Ca^{2+}]_i$ nella linea cellulare *Madin Darby Canine Kidney*, sia attraverso l'attivazione del canale per il calcio regolato dalla proteina chinasi C, sia attraverso il rilascio del catione bivalente dal reticolo endoplasmatico rugoso e da altri compartimenti di riserva, ad opera della fosfolipasi C; l'attivazione di questi meccanismi determina infine l'instaurarsi di processi di morte cellulare (Tsai *et al.*, 2009).

Un ulteriore dato è stato fornito da Vivaqua *et al.* (2003), i quali hanno provato il coinvolgimento dell'NP nella proliferazione cellulare del tumore al seno attraverso attivazione del recettore estrogenico β .

1.13 NPE e Anfibi

Sebbene sia stato spesso suggerito che gli Anfibi siano particolarmente suscettibili ai contaminanti ambientali, i dati a supporto di tale ipotesi sono molto limitati se confrontati con le informazioni riportate in letteratura scientifica su altri organismi. In un recente lavoro è stato riportato che solo il 2,7% degli studi tossicologici pubblicati utilizza questi Vertebrati quali oggetto di sperimentazione (Sparling *et al.*, 2000).

In uno studio prodotto nel 2002, Bridges e collaboratori hanno effettuato un confronto tra Anfibi e Pesci in relazione al grado di sensibilità ai chemical stressors; dal lavoro è emerso che le larve di anfibio sono circa il 64% più sensibili (Bridge *et al.*, 2002). Va tuttavia sottolineata la parziale veridicità di questo dato, poiché esistono in letteratura evidenze discordanti con quanto detto sinora.

Nel caso dell'NP, Dwyer e collaboratori (1999a) hanno riportato valori di LC_{50} maggiori per girini di *Rana sphenoccephala* rispetto a quelli riportati per 2 specie di pesci messe a confronto. I dati relativi a questo esperimento sono riportati nella tabella di seguito:

Specie	LC_{50} - 96 h µg/l
<i>Rana sphenoccephala</i>	340
<i>Bufo boreas</i>	120
<i>Pimephales promelas</i>	270
<i>Oncorhyncus mykiss</i>	190

Nel 2005 Trumbo ha studiato su larve di *Rana pipiens* gli effetti dell'esposizione al surfattante non ionico R-11[®], contenente come ingrediente attivo l'NPE. Un'ora dopo il

trattamento, l'acqua utilizzata nel test conteneva una concentrazione di NPE pari a 1,10 mg/l ed una concentrazione di NP di 0,02 mg/l; questo ha permesso di ottenere per il nonilfenolo etossilato un valore di LC₅₀ a 96 h di 1,7 mg/l.

1.13.1 Tossicità acuta

I dati relativi a test di tossicità acuta condotti su Anfibi esposti a composti nonilfenolici sono realmente scarsi. Di seguito sono riportati i valori di LC₅₀ calcolati per alcune specie.

Specie	Composto	LC ₅₀ - µg/l	Bibliografia
<i>Xenopus laevis</i>	NP8E	3900 (96 h)	Mann and Bidwell, 2000
<i>Litoria adelaidensis</i>	NP8E	9200 (140 h)	Mann and Bidwell, 2000
<i>Crinia insignifera</i>	NP8E	6400 (134 h)	Mann and Bidwell, 2000
<i>Bombina orientalis</i>	NP	240 (96 h)	Park et al., 2010

1.13.2 Tossicità cronica

In letteratura è ben noto che negli Anfibi il processo di metamorfosi è strettamente correlato all'azione dell'asse tiroideo (Gray et al., 2002). Nel loro lavoro, Yang e Wen (2005) hanno riportato un'inibizione della tiroxina totale (TT4) in girini di *Rana nigromaculata* esposti per 60 giorni a 3 diverse concentrazioni di NP (2, 20 e 200 µg/l); questa condizione potrebbe essere stata determinata dalla capacità del composto di legare la transtiretina (TTR), una proteina prodotta dal fegato che trasporta gli ormoni tiroidei. E' stato ipotizzato che questa condizione comporti un aumento della clearance plasmatica dell'L-tiroxina (T4), cui conseguenza è il decremento della concentrazione sierica dell'ormone (Morse et al., 1996). Nello stesso lavoro è stata inoltre riportata una diminuzione della concentrazione di testosterone al di sotto dei limiti di detection (LOD=0,1 ng/ml) ed un aumento dell'espressione della vitellogenina (Yang and Wen, 2005).

Mann e Bidwell (2000) hanno riportato, per tre differenti specie di anfibi esposti a NP8E, *Xenopus laevis*, *Litoria adelaidensis* e *Crinia insignifera*, un grave arresto della crescita, malformazioni cardiache, alterazioni nello sviluppo della coda, microftalmia ed edema diffuso.

In un recente lavoro condotto su *Bombina orientalis*, il trattamento con tre diverse concentrazioni di NP (0,1/10/100 µg/l) ha determinato un decremento significativo della sopravvivenza degli embrioni. Gli animali sopravvissuti hanno sviluppato diverse anomalie quali edema ventrale, riduzione nella lunghezza di corpo e coda, distorsione del tronco, displasia cefalica e degli occhi. I girini hanno inoltre manifestato, a livello dell'epidermide caudale, alterazioni del normale pattern di pigmentazione; le analisi effettuate hanno rivelato una diminuzione delle dimensioni dei melanofori associata, inaspettatamente, ad un aumento del numero di queste cellule (Park et al., 2010). Per la stessa specie è stato anche documentato un incremento dose-dipendente dell'mRNA codificante per la Vtg dopo esposizione a diversi dosaggi di NP (0,01/1/10/100 mg/Kg BW) (Kang et al., 2006).

Lo stesso dato è stato riscontrato in esemplari di sesso maschile di *Rana esculenta* e *Triturus cristatus*, in cui il contaminante determina un incremento dose-dipendente dei livelli plasmatici di vitellogenina. In *Rana esculenta*, inoltre, è stato osservato un drammatico decremento della gonadotropina plasmatica e della prolattina, che suggerisce un feedback inibitorio del surfattante sulla ghiandola pituitaria. Nei maschi di Tritone crestato, invece, a livello della *pars distalis* della ghiandola pituitaria è stato registrato un accumulo di prolattina, probabilmente determinato da una riduzione del rilascio ormonale (Mosconi *et al.*, 2002).

Anche in esperimenti in vitro su colture primarie di epatociti di anfibio è stato osservato che l'incubazione con NP a concentrazioni 10^{-8} M è in grado di stimolare la trascrizione dell'mRNA che codifica per la vitellogenina (Kloas *et al.*, 1999).

In *Xenopus laevis* il trattamento con NP interferisce con il differenziamento sessuale, determinando fenomeni di femminilizzazione che si esplicano in un aumento della percentuale di fenotipi femminili (Kloas *et al.*, 1999; Mosconi *et al.*, 2002).

Yang e Wen (2005) riportano alterazioni nella capacità di flettere la coda in girini di *Rana nigromaculata* esposti a differenti miscele di nonilfenolo (NP), bisfenolo A (BPA) e p,p'-DDE. La percentuale di malformazione riportata è del 16,7% nel trattamento con NP (200 µg/l) e del 13,3 % sia nel trattamento con BPA+NP (200+200 µg/l) che nel trattamento con la miscela BPA+NP+p,p'-DDE (200+200+50 µg/l).

SPECIE STUDIATA

2.1 Tassonomia

Per lungo tempo considerato una sottospecie del Tritone punteggiato, *Triturus vulgaris*, il Tritone italiano, *Lissotriton italicus* (Peracca, 1898), è oggi una specie a se stante (Mancino, 1968), all'interno della quale è possibile identificare due gruppi di popolazioni ben distinte geneticamente (Bucci *et al.*, 1983; Raghianti and Wake, 1986; Scillitani, 1992; Scillitani *et al.*, 1992): un primo gruppo, situato nell'Italia centrale e sul versante tirrenico dell'Italia meridionale, ed un secondo gruppo localizzato in Calabria, nella Puglia centrale e settentrionale, in Basilicata, in Campania e in Molise.

Queste popolazioni sembrano differire a livello fenotipico nella taglia massima raggiunta e nell'entità del dimorfismo sessuale.

<i>Lissotriton italicus</i> (Peracca, 1898) - <i>Tritone italiano</i>	
Phylum	<i>Chordata</i>
Classe	<i>Amphibia</i>
Ordine	<i>Urodela</i>
Famiglia	<i>Salamandridae</i>
Genere	<i>Lissotriton</i>
Specie	<i>Lissotriton italicus</i>

2.2 Geonemia

Il Tritone italiano è un urodelo endemico dell'Appennino meridionale; lungo il versante adriatico la specie è presente a sud di Ancona, nei bacini idrografici marchigiani ed abruzzesi, in Molise e in Puglia, mentre lungo il versante tirrenico, essa si localizza nella parte meridionale delle province di Frosinone e Latina, proseguendo poi in Campania, Basilicata e Calabria dove, a differenza delle altre specie di tritoni presenti (Giacoma *et al.*, 1988; Tripepi *et al.*, 1999a; 1999b) si spinge fino al massiccio montuoso dell'Aspromonte, che ne rappresenta il limite meridionale dell'areale (Sperone and Tripepi, 2003).

Sulla base della localizzazione territoriale, all'interno della popolazione calabrese è stato possibile individuare cinque grossi nuclei, che colonizzano rispettivamente il Pollino, la Catena Costiera, il versante ionico crotonese e catanzarese, le Serre vibonesi e catanzaresi ed il massiccio dell'Aspromonte; quest'ultimo nucleo, risulta più consistente lungo il versante orientale rispetto a quello occidentale, a livello del quale appare molto rarefatto.

Tale condizione è probabilmente determinata dalla geonomia del territorio, caratterizzato da ripide pareti che scendono fino al mare, che non favoriscono la formazione dei corpi d'acqua ferma necessari per le fasi di riproduzione.

Va inoltre sottolineato che a livello dell'altopiano silano, la specie è quasi completamente assente.

Anche in Puglia, come in Calabria, il Tritone italiano risulta endemico (Scillitani *et al.*, 1996; SHI sez. Puglia, 2002), manifestando una maggiore frequenza verso sud, probabilmente dovuta alla presenza di diverse pozze sul fondo delle doline. Nelle province di Foggia e Bari la specie appare invece in rarefazione.

In Abruzzo e Molise *Lissotriton italicus* è piuttosto comune (SHI, 1996), così come frequente sembra essere in Campania (Guarino *et al.*, 1992) ed in Basilicata (Tripepi *et al.*, 2002).

Nel Lazio, la specie presenta una distribuzione limitata a sole venti località delle province di Latina e Frosinone, localizzate al confine con la Campania (Bologna *et al.*, 2000).

2.3 Morfologia

Con una lunghezza media di 70-83 mm (Lanza, 1983), il Tritone italiano risulta essere il più piccolo tra le specie presenti in Europa.

Il corpo ha un aspetto tozzo, con capo arrotondato e tronco subquadrangolare. La coda è lunga, schiacciata sui lati ed appuntita all'estremità; durante la stagione riproduttiva, quando gli animali sono in fase acquatica, essa porta in posizione terminale un filamento chiamato mucrone, molto evidente nei maschi.

Gli arti differiscono per il numero di dita, quattro per quelli anteriori e cinque per i posteriori e, nonostante gli ampi lassi di tempo trascorsi in acqua, esse non sono mai palmate.

Il capo non presenta striature, ma dietro l'occhio è spesso osservabile una macchia scura; inoltre, in fase acquatica, sono facilmente visibili ai lati della bocca pliche di pelle dette lobi labiali, coinvolte nell'alimentazione.

A livello del dorso, il corpo è attraversato longitudinalmente da un solco mediano ed è assente la cresta che caratterizza altre specie. Durante i periodi di permanenza in acqua la pelle appare liscia e priva di verruche, ed assume un aspetto ancor più vellutato in fase terrestre.

La pigmentazione del corpo è variabile; tuttavia, il dorso appare in genere brunastro con macchie scure, mentre il ventre manifesta una colorazione più brillante che va dal giallo all'arancio, con piccole chiazze di forma circolare. Come osservato in altre specie di tritone, è possibile che anche nel Tritone italiano la colorazione vivace del ventre abbia valenza aposematica (Denton, 1990). La regione della gola risulta in genere di colore più scuro rispetto al resto del ventre e le macchie divengono più piccole e rade, localizzandosi prevalentemente ai margini.

Il dimorfismo sessuale non è di tipo dicromico (differenza nella colorazione) e, se pur di facile osservazione, risulta comunque meno evidente di quello manifestato da altre specie.

Il maschio di *Lissotriton italicus* presenta sempre dimensioni inferiori rispetto alla femmina, ma il carattere dimorfico più evidente è rappresentato dal rigonfiamento cloacale, sporgente e di forma emisferica, reso ancor più visibile dalla bordatura nera posta sull'apertura. Il corpo ha inoltre sezione quadrangolare e presenta due ispessimenti laterali che lo percorrono longitudinalmente. Il mucrone è molto evidente e presenta colorazione bianca o talvolta grigiasta.

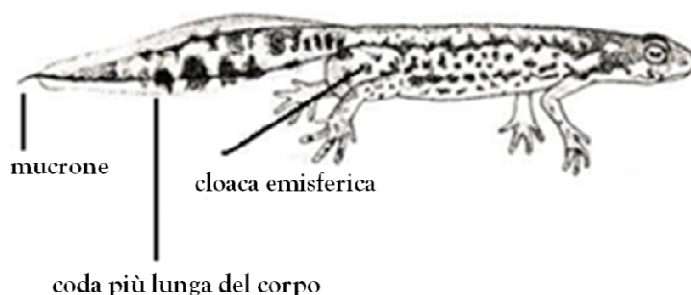


Fig. 2.1 Esemplare di *Lissotriton italicus* di sesso maschile

La femmina di *Lissotriton italicus* è molto più grande del maschio e se ne differenzia in maniera piuttosto evidente per le dimensioni ridotte del rigonfiamento cloacale che, in questo caso, presenta forma tronco-conica ed è privo di pigmentazione nera. Il corpo, inoltre, non mostra sezione quadrangolare ma circolare, con i fianchi convessi.

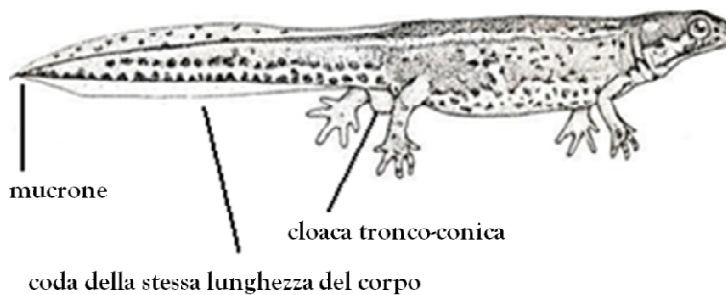


Fig. 2.2 Esemplare di *Lissotriton italicus* di sesso femminile

2.4 Valore ecologico delle misure biometriche per le popolazioni calabresi di Tritone italiano

Oltre ad essere un importante elemento per la discriminazione del sesso, le misure biometriche (peso, lunghezza totale dell'animale, lunghezza della coda, altezza della coda e lunghezza del corpo) hanno un interessante valore ecologico che permette di valutare l'adattamento di una specie al proprio ambiente.

Alcuni dati riportati su popolazioni calabresi (Sperone and Tripepi, 2003) hanno messo in evidenza l'esistenza di una relazione statisticamente significativa tra le dimensioni biometriche medie degli esemplari di ciascuna popolazione e la quota alla quale essi vivono; tale relazione si esplica in un aumento delle dimensioni degli animali, in termini di lunghezza totale e peso, proporzionale all'incremento dell'altitudine. Questa condizione potrebbe essere correlata ad una maggiore stabilità dei biotopi acquatici di alta quota, che permette agli animali di prolungare la durata della loro fase acquatica incrementando, conseguentemente, le proprie dimensioni corporee.

In alternativa, alcuni autori hanno proposto una seconda ipotesi, già dimostrata per altre specie di urodela che vivono in condizioni analoghe a quelle del Tritone italiano, secondo cui l'alta quota determinerebbe un rallentamento dei cicli vitali degli ectotermi, rendendo gli animali più longevi e, dunque, più grandi (Marunouchi *et al.*, 2000; Giacomini *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda la relazione tra latitudine e dimensioni corporee, nessun dato statisticamente significativo è stato evidenziato.

Al momento, dunque, si può solo ipotizzare che la stabilità ambientale e la quota, intesa in effetti sulla temperatura ambientale, siano gli unici fattori che possono influire in qualche modo sulle dimensioni corporee e quindi sull'ecologia della specie.

2.5 Habitat

Pur essendo una specie versatile, *Lissotriton italicus* predilige raccolte d'acqua ferma, sia naturali che localizzate in contesti antropizzati; esso si adatta tuttavia a colonizzare anche ambienti per lui estremi, caratterizzati da acque debolmente correnti, inadatte alla riproduzione.

In Calabria gli habitat più frequentati sono rappresentati da corpi d'acqua artificiali quali vasche per l'irrigazione ed abbeveratoi per il bestiame, che garantiscono un costante apporto idrico e di cibo durante il corso dell'anno. La specie colonizza tuttavia anche pozze e stagni, nonostante siano sovente soggetti a completo essiccamento durante la stagione estiva; in tali biotopi, fortemente instabili, il Tritone italiano affronta una fase di latenza terrestre che coincide con il periodo di essiccamento della pozza.

Scarsamente utilizzati sono invece i biotopi di acqua lotica quali ruscelli, torrenti, fiumare e fiumi, che presentano minore abbondanza di alimento ed assenza di vegetazione

acquatica, fondamentale per assicurare la dovuta stabilità alle uova deposte. In questi ambienti, infatti, il Tritone italiano viene rinvenuto quasi esclusivamente a livello di piccole raccolte d'acqua semi-stagnante, che si formano a seguito della deviazione parziale del corso d'acqua principale o all'interno delle concavità del suolo.

2.5.1 Preferenze altitudinali

Lissotriton italicus può essere considerato una specie tendenzialmente eurizonale, capace di adattarsi ad un vasto range di fasce altitudinali, dal livello del mare ai 1855 metri della Sorgente Frido, sul massiccio del Pollino, quota massima nota per questo urodelo (Sperone and Tripepi, 2003). Tuttavia, è evidente la predilezione per le quote più basse: ad elevate altitudini, infatti, scarseggiano corpi d'acqua ferma, mentre sono abbondanti ruscelli e acquitrini temporanei che si originano dal disgelo.

2.6 Alimentazione

L'alimentazione del Tritone italiano è costituita sia da invertebrati acquatici (larve e adulti) che da insetti terrestri, in particolare Ditteri, larve di Lepidotteri, Coleotteri, Omotteri, Eterotteri, Collemboli ed Imenotteri (Scalzo *et al.*, 1988). Tra gli organismi acquatici principalmente predati si riscontrano sia specie bentoniche (larve di Chironomidi ed Odonati Zigotteri) che planctoniche (soprattutto Cladoceri e Copepodi); inoltre, in stagni montani, nella dieta del Tritone italiano è stata rilevata anche la presenza di Isopodi (gen. *Asellus*) (Scalzo *et al.*, 1988).

Per quanto riguarda la cattura degli insetti terrestri, essa avviene quando le prede cadono accidentalmente in acqua e si agitano ancora vivi sulla superficie.

Risulta interessante osservare che i due sessi manifestano delle differenze nelle scelte alimentari: i maschi, di dimensioni minori rispetto alle femmine, ingeriscono soprattutto larve di Chironomidi e Copepodi mentre le femmine, più grandi, preferiscono Ostracodi, Cladoceri e insetti terrestri.

Non mancano infine casi di oofagia sia verso uova di altri anfibi che di conspecifici.

2.7 Anatomia interna

2.7.1 Apparato scheletrico

Lo scheletro del Tritone italiano ha una struttura molto semplice; il cranio appiattito è caratterizzato da un palato parzialmente aperto e da orbite piuttosto larghe. La bocca è munita di piccoli denti dalla struttura semplice, presentanti corona smussata e lunga radice; questa

struttura dentaria non è preposta né a recidere né a masticare, ma ha la sola funzione di trattenere le prede, che sono poi ingoiate intere.

La colonna vertebrale si estende dall'articolazione con il cranio, che consente alla testa di compiere movimenti verso l'alto e verso il basso e, in maniera più limitata, anche lateralmente, fino alla punta della coda; essa è costituita da vertebre anficeli, presentanti una concavità anteriore ed una posteriore. In risposta all'adattamento ad uno stile di vita terrestre, questa struttura ha subito un irrobustimento per sopportare il peso dell'animale, che viene trasferito agli arti grazie alla presenza di cingoli articolari.

Le zampe sono corte e robuste e garantiscono un efficace sostegno al corpo. Le dita manifestano capacità rigenerativa; il processo di rigenerazione può compiersi anche nell'arco di poche settimane e in alcuni casi, se non avviene correttamente, può essere causa dell'insorgenza di deformità (Griffiths, 1981).

La coda origina subito dopo il cingolo pelvico e, di norma, ha una lunghezza quasi pari a quella del corpo; nell'ambiente acquatico, essa permette la realizzazione di movimenti veloci, mentre gli arti sono tenuti contro i lati del corpo per minimizzare l'attrito. La coda appiattita garantisce, inoltre, una spinta maggiore, e la presenza di lembi di pelle sugli arti posteriori contribuisce ad incrementare l'intensità della spinta e, probabilmente, della frenata. Sulla terraferma invece, durante la locomozione il corpo viene flesso da una parte all'altra e, nella realizzazione di movimenti veloci, esso è completamente sostenuto dagli arti e dalla coda ed è sollevato dal substrato. Contrariamente, durante la realizzazione di movimenti lenti o in presenza di superfici umide, il ventre viene trascinato sul terreno, permettendo di assorbire umidità.

2.7.2 Apparato tegumentario

Negli Anfibi l'apparato tegumentario rappresenta l'interfaccia tra l'ambiente esterno e quello interno all'organismo; esso costituisce dunque un sistema organico estremamente variabile e adattabile che svolge molteplici funzioni:

- ✘ funzione protettiva (meccanica, termica, di anti-disidratazione);
- ✘ funzione sensoriale (sensibilità cutanea);
- ✘ funzione respiratoria (respirazione cutanea);
- ✘ funzione osmoregolatrice (scambi idrici);
- ✘ funzione secretoria (ghiandole che secernono sostanze protettive o velenose);
- ✘ comunicazione intraspecifica ed interspecifica.

Osservata in sezione trasversale, la pelle appare costituita da due strati ben distinti, l'epidermide, esterna, e il derma, più interno, separati da una lamina basale.

L'epidermide, a sua volta, appare organizzata in più strati caratterizzati da una propria identità strutturale e cellulare. Procedendo dall'esterno verso l'interno si susseguono:

- ✘ Strato corneo: particolarmente sviluppato negli esemplari adattati all'ambiente terrestre e soggetto ad un continuo turnover dei propri elementi cellulari che vengono ciclicamente sostituiti (processo di muta) man mano che l'animale cresce.
- ✘ Strato granuloso: caratterizzato da cellule relativamente appiattite.
- ✘ Strato spinoso: composto da cellule di forma poliedrica.
- ✘ Strato basale: localizzato all'interfaccia con il derma e costituito da cellule colonnari dotate di intensa attività proliferativa.

Nel derma, invece, si distinguono uno strato compatto profondo ed uno strato lasso superficiale, all'interno del quale si riscontra la presenza di vasi sanguigni, nervi e fibre muscolari, ghiandole mucose e granulati. Questa regione è inoltre la sede principale di melanofori, xantofori ed iridofori, tipologie cellulari atte a conferire all'animale la caratteristica pigmentazione.

2.7.3 Apparato respiratorio

Nel Tritone italiano, così come avviene in generale negli Anfibi, la funzione respiratoria si svolge a livello dei polmoni, delle branchie e della pelle, la cui importanza varia in relazione allo stadio di sviluppo in cui l'animale si trova (Griffiths, 1985).

Nelle fasi larvali, gli scambi gassosi vengono effettuati a livello delle branchie esterne; questi organi originano dagli archi viscerali III, IV e V, e scompaiono di norma alla metamorfosi.

Ciascuna branchia appare composta da tre estroflessioni ramificate collocate dietro la testa, riccamente vascolarizzate ed eccellentemente suddivise per aumentare la superficie di scambio.

Negli adulti, invece, la funzione respiratoria è affidata ai polmoni, strutture sacciformi che presentano invaginazioni interne atte anch'esse ad incrementare le regioni di scambio.

Poiché nel Tritone italiano il diaframma è assente, il riempimento dell'organo respiratorio è garantito dal movimento della gola. In fase acquatica, dunque, i tritoni devono necessariamente risalire periodicamente in superficie per rifornirsi d'aria: la frequenza di queste escursioni, dette "guffing", dipende dall'attività degli animali e dalla temperatura dell'acqua, e sembra incrementare nelle ore serali (Griffiths, 1985).

Infine, gli scambi respiratori possono avvenire anche attraverso la pelle, la cui superficie deve essere mantenuta costantemente umida per favorire il passaggio dei gas.

2.7.4 Apparato circolatorio

Durante la fase larvale, il Tritone italiano presenta una circolazione semplice, paragonabile a quella dei Pesci; successivamente, prima della metamorfosi, con l'entrata in funzione dei polmoni la circolazione diviene doppia ed incompleta.

Il cuore presenta una muscolatura di tipo miocardico ed è costituito da tre camere, due atri ed un ventricolo, seguite da un seno venoso e da un cono arterioso. Gli atri sono completamente divisi dal setto interatriale, definito incompleto o perforato, e comunicano con l'unico ventricolo mediante un ostio atrio-ventricolare. A questo livello sono presenti 2 grandi valvole, una dorsale e una ventrale, alle quali è saldato il setto interatriale, e 2 valvole laterali più piccole. I sistemi valvolari hanno il compito di mantenere separato il flusso ematico arterioso da quello venoso; tuttavia, la mescolanza di sangue a livello degli atri si verifica spesso.

Il seno venoso si apre nella parete dorsale dell'atrio destro, mentre a livello dell'atrio sinistro si apre il tronco unico della vena polmonare. Il sangue proveniente dai tessuti e dalla pelle giunge all'atrio destro, passa al ventricolo, si dirige verso la circolazione polmonare (dove si ossigena), e ritorna all'atrio sinistro; da qui, il sangue ossigenato raggiunge il ventricolo e viene immesso nella circolazione periferica. Va comunque sottolineato che la presenza di un solo ventricolo determina un'ossigenazione solo parziale del sangue diretto al corpo.

2.7.5 Apparato digerente

L'apparato digerente origina con una bocca anteriore, provvista di lingua, a cui segue l'esofago molto corto, lo stomaco piuttosto rettilineo, e l'intestino leggermente ripiegato.

Studi di etologia hanno rivelato la presenza, nel Tritone italiano, di un comportamento alimentare piuttosto complesso, riassunto da Roth (1987) in cinque fasi:

- × Orientazione: l'animale si accorge della presenza della preda;
- × Approccio: l'animale si muove verso la preda;
- × Test olfattivo: l'animale, dopo aver raggiunto la preda, cerca di identificarla e ne valuta la commestibilità;
- × Fissazione o orientazione finale;
- × Cattura.

2.7.6 Sistema nervoso ed organi di senso

Il sistema nervoso media la maggior parte delle risposte rapide dell'organismo alle variazioni che si verificano nell'ambiente esterno o al suo interno.

Da un punto di vista strutturale, esso si articola in un sistema nervoso centrale, formato da encefalo e midollo spinale, che dirige e coordina la maggior parte delle attività del corpo, e in un sistema nervoso periferico, formato da nervi motori e sensitivi, deputato alla ricezione delle informazioni e alla risposta agli stimoli.

Gli occhi sono piccoli e muniti di retina con coni e bastoncelli, (Möller, 1951); è stato sperimentalmente dimostrato che gli Urodela riescono a vedere fino a grandi distanze solo quando sono in acqua, mentre sulla terraferma la loro vista è ottimale solo da vicino (Grüsser-Cornehls and Himsted, 1976). Questa condizione ha notevoli implicazioni sulle modalità di alimentazione degli animali; fuori dall'acqua, infatti, il tritone è in grado di catturare solo prede situate nelle sue immediate vicinanze, mentre in acqua è in grado di agire a distanze maggiori.

Per quanto riguarda il sistema uditivo, l'incapacità del Tritone italiano di emettere suoni ha determinato la mancanza dell'orecchio esterno e del timpano, mentre è stato mantenuto l'orecchio interno atto al controllo dell'equilibrio ed alla percezione delle vibrazioni.

L'olfatto è coinvolto in numerose funzioni, dalla ricerca del cibo al corteggiamento; le informazioni sensoriali di questo tipo sono integrate dall'organo di Jacobson.

Infine, le larve e gli individui adulti ad *habitus* acquatico presentano, ai lati del corpo, sul dorso e sulla testa, gli organi della linea laterale, che percepiscono le variazioni della corrente e della pressione dell'acqua, potenzialmente implicate nella rilevazione del movimento di prede o predatori.

2.7.7 Apparato urogenitale

La vita anfibia determina la necessità di adattarsi a condizioni ambientali per certi versi estreme. In ambienti di acqua dolce, come quelli frequentati dal Tritone italiano, il corpo tende ad assorbire acqua per osmosi; contrariamente, sulla terraferma, gli animali vanno soggetti a fenomeni di disidratazione. Tocca dunque al sistema escretore, ed in particolare ai reni, stabilire un equilibrio tra queste due opposte tendenze.

Le funzioni di questo sistema sono infatti correlate al controllo omeostatico dell'equilibrio idrico ed alla secrezione di cataboliti (essenzialmente l'azoto, derivante dal catabolismo proteico sotto forma di ammoniaca).

Anatomicamente, il sistema escretore è composto dai reni e dalle vie urinarie. I reni sono organi pari la cui unità funzionale è costituita dal nefrone, adibito alla filtrazione del sangue ed all'elaborazione dell'urina, e dai dotti collettori, che convogliano quest'ultima verso le vie urinarie.

2.7.8 Apparato riproduttivo

Negli Urodela, i condotti dell'apparato riproduttivo sboccano nella cloaca e non vi sono organi genitali esterni atti ad introdurre gli spermatozoi all'interno dell'apparato riproduttivo femminile.

La fecondazione è interna: il maschio, spesso al termine di un complesso rituale di corteggiamento, depone una o più spermatofore che vengono raccolte dalla femmina con le rime cloacali e accolte all'interno di una spermateca.

Le uova vengono sempre deposte in acqua; una volta schiuse, le larve che ne originano seguono uno sviluppo di tipo indiretto e, al termine della metamorfosi, si trasformano in individui adulti.

2.8 Sviluppo e metamorfosi

Dopo l'accoppiamento, la femmina di *Lissotriton italicus* depone le uova fissandole, in maniera del tutto caratteristica, ad un substrato vegetale, solitamente rappresentato da foglie di piante acquatiche. Dopo un'accurata scelta, al momento della deposizione essa ripiega la foglia attorno alla propria cloaca con le zampe posteriori in modo da avvolgere l'uovo; questa operazione, della durata di qualche minuto, permette all'involucro esterno dell'uovo, adesivo, di ancorarsi alla foglia e stabilizzarne la ripiegatura.

2.8.1 Uovo

Dopo la deposizione, le uova non sono sottoposte ad alcuna forma di cura parentale.

L'uovo di *Lissotriton italicus* misura in media 1,7 mm di diametro ed è composto da diversi strati trasparenti di consistenza gelatinosa, il cui diametro misura circa 2,5 mm.; nell'ambiente acquatico, esso assorbe acqua, aumentando di volume ed acquista rigidità. Al centro della struttura è visibile il sacco del tuorlo che avvolge l'embrione e gli fornisce il corretto apporto di sostanze nutritive, rappresentandone così l'unica fonte alimentare.

La sede di scambio dell'ossigeno e dei prodotti di rifiuto è invece rappresentata dagli involucri gelatinosi; questi ultimi iniziano precocemente a degenerare, di solito con l'inizio della segmentazione, formando un'unica ampia camera. A questo punto, inizia lo sviluppo vero e proprio che viene suddiviso in due stadi: sviluppo embrionale e sviluppo larvale.

2.8.2 Sviluppo embrionale

Con il termine sviluppo embrionale ci si riferisce all'arco di tempo che intercorre tra la fecondazione ed il momento in cui l'embrione inizia ad assumere l'alimento dall'esterno (Gallien and Bidaud, 1959). Esso viene di norma suddiviso in cinque fasi di diversa durata, comprendenti ciascuna un certo numero di stadi indicati con i numeri romani (Tripepi *et al.*, 1998):

- ✘ *Segmentazione* (stadi I-IX): in questa fase, della durata di circa due giorni, l'uovo fecondato si divide dando origine ad una blastula;
- ✘ *Gastrulazione* (stadi X-XIII): durante la gastrulazione, che dura circa un giorno, si verifica l'inizio della migrazione e della specializzazione delle cellule che, durante la segmentazione, presentavano tutte le medesime caratteristiche;
- ✘ *Neurulazione* (stadi XIV-XXIII): con questo termine si definisce il processo di formazione del sistema nervoso. In questa fase, l'embrione originariamente di forma sferica si allunga, e diviene chiara la divisione tra capo e tronco;
- ✘ *Bottone caudale* (stadi XXIV-XXX): il bottone caudale rappresenta l'ultima fase dello sviluppo embrionale, durante la quale la testa dell'animale si accresce, si forma la coda,

si sviluppano le branchie e spuntano gli arti anteriori ed i bilancieri, organi adesivi che permettono alla larva di ancorarsi al substrato (Bolzern *et al.* 1999);

- ✱ *Organogenesi* (stadio XXXI-XLII): durante questa fase si verifica il riassorbimento dei bilancieri, gli arti anteriori sono perfettamente formati e le branchie appaiono ben ramificate; gli organi interni si sviluppano completamente garantendo alla larva tutte le funzioni fondamentali all'inizio di una vita attiva.

Ad una temperatura costante di circa 18,5°C l'intero sviluppo embrionale può essere completato in circa 20 giorni.

2.8.3 Sviluppo larvale e metamorfosi

Con il termine sviluppo larvale ci si riferisce al periodo che intercorre dal momento in cui la larva assume vita attiva al momento in cui essa completa la metamorfosi (Gallien and Bidaud, 1959).

Alla schiusa, la larva del Tritone italiano misura circa 6-7 mm (Lanza, 1983); essa è di norma caratterizzata da una cresta dorsale a profilo rettilineo, che si estende dall'estremità della coda fino all'inserzione degli arti anteriori.

Gli arti sono corti e robusti e, su entrambi i lati del corpo, sono evidenti circa 12 solchi verticali.

Il colore della livrea è piuttosto variabile: il ventre è biancastro mentre il dorso è di norma bruno-verde o grigio, talvolta con macchie scure che divengono più chiare sui lati e sulla coda. E' stato osservato che poco prima della metamorfosi queste macchie laterali si spostano verso il dorso (Iantorno *et al.*, 2002).

Il processo metamorfico è regolato dall'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide; gli ormoni tiroidei, presenti ad alte concentrazioni nel sangue, agiscono direttamente sulle singole cellule modificando l'espressione dei geni responsabili delle trasformazioni tipiche di questo delicato processo e permettendo ad ogni tessuto di rispondere in maniera diversa ed opportuna a questi stimoli chimici. Al termine della metamorfosi, l'animale avrà acquisito gli adattamenti morfologici necessari per svincolarsi almeno in parte dall'ambiente acquatico ed affrontare la vita in un ambiente terrestre.

2.8.4 Influenza dei parametri ambientali sullo sviluppo

Tra tutti i parametri ambientali, la temperatura è certamente quello che più di tutti agisce direttamente sullo sviluppo del Tritone italiano, influenzandone non solo la velocità di realizzazione ma l'eventuale successo. A tal proposito, Bachmann (1969) ha fornito prove della riduzione non lineare della durata dello sviluppo embrionale in relazione all'aumento della temperatura. Questo dato è stato confermato da Tripepi e collaboratori (1998) che hanno evidenziato una chiara relazione tra temperatura e tempo di sviluppo, con particolare riferimento alla durata delle fasi dell'organogenesi. Essi hanno infatti dimostrato che, in

esemplari di *Lissotriton italicus* provenienti da aree geografiche diverse caratterizzate dal medesimo range di temperature (13°C e 20°C), lo sviluppo segue un andamento simile che si realizza in tempi del tutto confrontabili.

Brown (1976) ha inoltre provato che a temperature inferiori a 10°C l'embrione non è in grado di svilupparsi, mentre a temperature superiori a 20°C esso va incontro ad una degenerazione crescente che raggiunge valori limite di tolleranza a 25°C e diviene totale a 30°C (temperatura letale).

2.8.5 Neotenia

Con il termine “neotenia”, etimologicamente “prolungamento della gioventù”, ci si riferisce ad un particolare fenomeno evolutivo in cui negli individui adulti di una specie permangono caratteristiche morfologiche e fisiologiche tipiche delle forme giovanili. Tale fenomeno si caratterizza dunque per la mancanza di maturazione, al termine della metamorfosi, dei tessuti adulti, che determina una permanenza indefinita della condizione larvale. Tuttavia, pur conservando il fenotipo larvale (ad esempio presenza delle branchie al posto dei polmoni), un individuo neotenic raggiunge la maturità sessuale acquisendo la capacità di riprodursi.

Alcuni urodeli vengono definiti neotenic facoltativi poiché in grado di completare la metamorfosi solo in specifiche condizioni; altri sono invece definiti neotenic obbligati, in quanto incapaci di giungere a maturazione completa. Un esempio di quest'ultima condizione è rappresentato dall'urodelo *Ambystoma mexicanum*, che vive in ambienti lacustri dell'altopiano centrale del Messico.

Dagli studi effettuati per comprendere tale fenomeno è emerso che la principale causa della mancata metamorfosi potrebbe risiedere nella insensibilità dei tessuti all'azione degli ormoni tiroidei: la neotenia è dovuta infatti ad un mal funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide con conseguente diminuzione nella secrezione di ormoni tiroidei, come la tiroxina, da parte della tiroide. Di conseguenza, i diversi gradi di “ritardo” o di “fallimento” della metamorfosi implicano una deficienza, più o meno accentuata e prolungata, del meccanismo d'azione di tali ormoni.

Sebbene non si abbiano notizie certe, alcuni studi hanno documentato l'effetto inibitore della combinazione freddo/oscurità sulla metamorfosi. Dati locali relativi a laghi oligotrofici d'altitudine, hanno inoltre permesso di ipotizzare il coinvolgimento di uno o più fattori ambientali come la bassa temperatura dell'acqua, la profondità del sito, la ridotta illuminazione, la carenza di iodio, l'eccesso di potassio rispetto ad altri cationi e la predisposizione genetica attivata o selezionata da questi fattori, sulla comparsa della neotenia nel Tritone alpestre. Osservazioni successive effettuate su altri biotopi hanno però messo in discussione l'ipotesi di un coinvolgimento della carenza di iodio e della profondità del sito nell'istaurarsi di fenomeni neotenic.

Tutte queste considerazioni hanno dunque indotto a pensare che la neotenia sia un processo correlato a condizioni di stabilità dell'ambiente acquatico, in contrapposizione

all'ostilità dell'ambiente terrestre (ampie escursioni termiche, aridità, assenza di rifugi ecc.). Tali motivazioni appaiono tuttavia ancora vaghe e talvolta contraddittorie: in Italia sono infatti noti casi di popolazioni neoteniche in ambienti completamente essiccati, in cui la metamorfosi poteva rappresentare sicuramente un vantaggio.

In *Lissotriton italicus* casi di neotenia piuttosto comuni sono stati registrati soprattutto in ambienti acquatici stabili nel corso dell'anno, sebbene tali circostanze siano attribuibili a fenomeni facoltativi. Il prolungarsi del periodo larvale consente un raggiungimento di dimensioni corporee maggiori e, conseguentemente, un migliore sfruttamento dell'ambiente acquatico. I dati relativi alla presenza di popolazioni neoteniche di Tritone italiano in Calabria sembrano avvalorare tale ipotesi, dal momento che la loro distribuzione non sembra affatto dipendere dall'altitudine, bensì proprio dai biotopi acquatici, rappresentati principalmente da vasche, abbeveratoi e stagni, tutti ambienti che garantiscono un costante apporto di acqua nel corso dell'anno (Policastrese, 2001).

Per il genere *Lissotriton* sono state descritte due tipologie di caratteri neotenici: la pedomorfosi o neotenia parziale e la pedogenesi o neotenia totale.

La pedomorfosi è solitamente riferita ad esemplari branchiati con *habitus* sostanzialmente larvale ma con dimensioni corporee maggiori, privi di caratteri sessuali secondari e incapaci di corteggiare. Si tratta di larve "overwintered", accresciute oltre la norma per il fatto di aver svernato in acqua, senza dover sospendere completamente la loro attività trofica per uno o alcuni anni consecutivi. Questo semplice ritardo è frequente soprattutto nelle popolazioni d'alta quota, nelle quali sembra riconducibile alle ripercussioni eco-etologiche del clima quali basse temperature, periodi di disgelo molto brevi, deposizioni tardive, scarso nutrimento ecc.

La pedogenesi o neotenia totale si riferisce invece ad esemplari branchiati o con fessure branchiali, con caratteri sessuali secondari evidenti, sessualmente attivi e maturi; si tratta dunque di una pedomorfosi con capacità riproduttiva.

2.9 Importanza delle variazioni stagionali degli ormoni sessuali nello studio degli effetti degli EDC sugli Anfibi.

In letteratura non sono ad oggi noti dati sull'andamento dei livelli degli ormoni sessuali nel Tritone italiano durante i diversi mesi dell'anno. Tuttavia, questi animali vanno incontro a continui cicli "risveglio/torpace", seguiti da repentine variazioni del loro metabolismo. I ritmi con cui queste variazioni si susseguono scandiscono i periodi di attività sessuale, che possono risultare rilevanti nello studio tossicologico degli effetti indotti da sostanze che agiscono da distruttori endocrini (EDC) quali sono, nel nostro caso specifico, i nonilfenoli etossilati (NPE).

Per affrontare questo delicato argomento e fornire qualche informazione a riguardo, ci avvaliamo dei dati riportati in letteratura sui cicli ormonali registrati in alcune specie di Anfibi

tra cui il Tritone cretato, *Triturus carnifex*, che risulta l'urodelo con il maggior grado di sintopia con il Tritone italiano.

In esemplari maschio di *Bufo japonicus*, è stato osservato che i livelli plasmatici dell'ormone follicolo stimolante (FSH) cambiano in relazione al peso testicolare, che raggiunge il suo valore massimo nel mese di agosto (Itoh *et al.*, 1990). Le osservazioni prodotte hanno inoltre dimostrato che gli ormoni androgenici manifestano un moderato picco di espressione nel mese di novembre, mentre aumentano notevolmente nel mese di marzo, appena prima dell'inizio della riproduzione. L'ormone luteinizzante (LH), infine, subisce variazioni parallele a quelle che si verificano nei livelli androgenici.

Nelle femmine, i livelli di entrambi gli ormoni ipofisari, FSH ed LH, non risultano significativamente correlati al peso ovarico; tuttavia, il peso dell'ovario e dell'ovidotto presentano entrambi una correlazione positiva con i livelli plasmatici degli ormoni steroidei. L'estradiolo, ad esempio, mostra un picco di espressione a marzo, seguito da un rapido decremento che raggiunge il suo valore minimo nel mese di aprile. Un graduale incremento di questo ormone si registra poi tra luglio e novembre, in parallelo all'incremento del peso ovarico.

Nelle femmine, inoltre, i livelli del progesterone e degli androgeni seguono un andamento simile a quello registrati per l'estradiolo; tuttavia, per gli androgeni il periodo di incremento abbraccia un range temporale più ampio che va da gennaio a marzo, mentre i cambiamenti progestinici risultano meno marcati di quelli descritti per l'estradiolo.

In *Pleurodeles waltl*, gli ormoni androgenici testosterone, diidrotestosterone e 4-androstenedione presentano picchi di espressione nei mesi di ottobre-novembre e marzo; il testosterone risulta l'ormone maggiormente prodotto ma le sue variazioni appaiono parallele a quelle degli altri due androgeni (Garnier, 1985). Queste variazioni cicliche nei livelli steroidei risultano in accordo con le modificazioni morfologiche delle caratteristiche sessuali che si verificano durante il ciclo annuale (Garnier, 1985).

L'ultima specie presa in considerazione è *Triturus carnifex*. Nelle femmine di Tritone cretato, la concentrazione plasmatica degli androgeni aumenta durante il periodo riproduttivo, mentre l'estradiolo subisce un brusco aumento nel mese di marzo. Le variazioni nell'espressione del progesterone risultano invece poco rilevanti (Zerani *et al.*, 1991).

Nei maschi, le concentrazioni di androgeni ed estradiolo seguono un andamento simile a quello descritto nelle femmine, mentre i livelli progestinici risultano fortemente correlati alle variazioni di peso dei testicoli (Zerani *et al.*, 1991).

Infine, la valutazione dei livelli plasmatici di vitellogenina ha rilevato un picco di espressione a marzo, senza evidenza di una correlazione con il peso dell'ovario e con le concentrazioni di estradiolo (Zerani *et al.*, 1991).

Dai dati sinora ottenuti, risulta chiaro che negli Anfibi i periodi di maggiore sensibilità ormonale ricadono intorno al mese di marzo, durante la fase preparatoria alla riproduzione; questa condizione può conseguentemente implicare variazioni anche nella sensibilità degli

animali all'attività xenoestrogenica. Va inoltre sottolineato che maschi e femmine manifestano un differente pattern di espressione ormonale, determinato dai diversi ruoli che essi ricoprono nella riproduzione. Nel caso del nonilfenolo (NP), l'attività endocrina è determinata da una condizione di omologia strutturale con l'ormone sessuale 17β -estradiolo; ciò dovrebbe dunque determinare una maggiore vulnerabilità degli esemplari di sesso maschile, più sensibili all'incremento dei livelli di questo ormone.

MATERIALI e METODI

3.1 Raccolta e mantenimento degli animali

Gli esemplari adulti di *Lissotriton italicus* di entrambi i sessi sono stati prelevati, nel mese di marzo, in località San Vincenzo la Costa, in provincia di Cosenza (520 m slm).

La scelta di questo urodelo quale oggetto del nostro studio, è stata determinata dall'ampia distribuzione che esso presenta su tutto il territorio calabrese e dalla possibilità di prelevarne facilmente gli esemplari, minimizzando il danno ecologico. Gli animali sono stati catturati mediante l'utilizzo di un retino a maglia stretta e trasportati presso i laboratori del Dipartimento di Ecologia dell'Università della Calabria. Dopo un'acclimatazione della durata di 7 giorni in vasche da 50 litri, 4 tritoni (2 maschi e 2 femmine) per ciascuna unità sperimentale sono stati trasferiti in acquari da 15 litri ed esposti al trattamento con il contaminante in esame (Fig. 3.1).



Fig. 3.1 Apparato sperimentale

3.2 Test di tossicità acuta

Nello sviluppo del presente lavoro è stato utilizzato un test di tipo semi-statico che ci ha permesso di valutare gli effetti dell'esposizione a breve termine (24, 48 e 96 h) a nonilfenolo etossilato. La formulazione utilizzata nella sperimentazione è stata acquistata dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia) in forma di miscela standard con un numero di etossilazione pari a 10. (nonilfenolo 10-etossilato - NP10E). Il contaminante, in forma liquida, è stato disciolto in acqua per ottenere le concentrazioni nominali di 50 e 100 µg/l; tali concentrazioni sono state scelte sulla base di dati riportati in letteratura circa le quantità rilevate in natura in acque

superficiali (Ahel *et al.*, 1994b; Blackburn and Waldock, 1995; Barber *et al.*, 2000; Solé *et al.*, 2000; Isobe *et al.*, 2001; Ying *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 2005; Chen and Yeh, 2010).

Durante l'intera sperimentazione, i tritoni sono stati mantenuti in condizioni di laboratorio controllate: ciclo luce/buio 12:12 h e temperatura dell'acqua di $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Inoltre, dal momento della cattura fino al momento del sacrificio gli animali non sono stati alimentati.

Il test è stato eseguito tre volte in differenti mesi dell'anno: febbraio, giugno e ottobre. La scelta temporale è stata dettata dai ritmi di ritorno in acqua degli animali ed ha permesso di valutare gli effetti del contaminante durante le diverse fasi di attività ormonale descritte nel capitolo 2.

3.2.1 Calcolo delle concentrazioni

- × $50 \mu\text{g/l} = 0,05 \text{ mg/L} = 0,00005 \text{ g/l}$
 Quantità in 15 l $\rightarrow 0,00005 \text{ g/l} \times 15 \text{ l} = 0,00075 \text{ g}$
 Conversione in μl : $0,00075 \text{ g} / 1060 \text{ g/l (densità nonilfenolo)} = 0,0000007 \text{ l} = 0,0007 \text{ ml} = 0,7 \mu\text{l (in 15 l)}$
 Concentrazione per litro: $0,7 \mu\text{l} / 15 \text{ l} = 0,046 \mu\text{l/l}$
- × $100 \mu\text{g/l} = 0,1 \text{ mg/l} = 0,0001 \text{ g/l}$
 Quantità in 15 l $\rightarrow 0,0001 \text{ g/l} \times 15 \text{ l} = 0,0015 \text{ g}$
 Conversione in μl : $0,0015 \text{ g} / 1060 \text{ g/l (densità nonilfenolo)} = 0,0000014 \text{ l} = 0,0014 \text{ ml} = 1,4 \mu\text{l (in 15 l)}$
 Concentrazione per litro: $1,4 \mu\text{l} / 15 \text{ l} = 0,093 \mu\text{l/l}$

3.3 Prelievo degli organi target

Il prelievo degli organi target è stato effettuato dopo 24, 48 e 96 h di esposizione (Tab. 3.1), previa anestetizzazione con Ms222 (tricaine methanesulphonate - Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA); parallelamente sono stati sacrificati gli esemplari di controllo necessari per effettuare il confronto tra le condizioni basali e le condizioni sperimentali.

Tossicità acuta				
Concentrazione	Organo target	Tempi di esposizione		
50 $\mu\text{g/l}$	Fegato	24 h	48 h	96 h
	Epidermide	24 h	48 h	96 h
100 $\mu\text{g/l}$	Fegato	24 h	48 h	96 h
	Epidermide	24 h	48 h	96 h

Tab.3.1 Concentrazioni e tempi di esposizione

L'asportazione del fegato e dell'epidermide è stata eseguita utilizzando forbici e bisturi perfettamente puliti ed i campioni sono stati costantemente perfusi con il fissativo.

Al fine di eliminare eventuali agenti contaminati, frammenti extracellulari, sostanze proteiche e polisaccaridi presenti sulla superficie, dopo il prelievo i campioni sono stati lavati con la soluzione di lavaggio (isotonica ed allo stesso pH dell'ambiente cellulare). Le procedure descritte sono state completate nel minor tempo possibile per evitare l'insorgenza di fenomeni di alterazione a carico della struttura cellulare.

Le dimensioni finali dei campioni destinate alla microscopia elettronica a trasmissione ed alla microscopia ottica sono state, come di norma, quelle compatibili con una buona penetrazione degli agenti chimici (circa 1 mm³).

Nella tabella di seguito (Tab. 3.2) sono riassunte le procedure analitiche effettuate sui due diversi organi target considerati.

Fegato	Microscopia Ottica
	TEM
	Microscopia Confocale CYP-1A CYP-3A Caspasi-3
Epidermide	TEM
	SEM

Tab.3.2 Procedure analitiche

3.4 Allestimento dei preparati per la microscopia ottica e microscopia elettronica a trasmissione ed a scansione

Nel presente lavoro, le metodiche standard riportate in letteratura (Scala *et al.*, 1995), adeguatamente corrette secondo le nostre esigenze, sono state eseguite per le operazioni relative all'allestimento dei preparati per la microscopia ottica (MO) e per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) ed a scansione (SEM).

La preparazione dei campioni prevede alcune fasi iniziali comuni ai tre tipi di microscopia: la fissazione e la disidratazione. Le fasi successive si diversificano e consistono nell'essiccamento dei preparati per la microscopia elettronica a scansione e nell'inclusione, taglio e colorazione o metallizzazione dei preparati destinati alla microscopia ottica ed elettronica a trasmissione rispettivamente.

3.4.1 Fissazione

La fissazione del campione rappresenta la prima fase di modificazione artificiale dell'ambiente cellulare; essa permette di arrestare le attività metaboliche della cellula e di immobilizzarne tutti i componenti molecolari e macromolecolari, ottenendo una sorta di "istantanea" del tessuto in esame.

MO e TEM

I campioni destinati alla microscopia ottica ed alla microscopia elettronica a trasmissione 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 3%, veicolata da un tampone fosfato (PBS - fosfato monobasico e bibasico di sodio, 0,1 M - pH 7.2) che ha il compito 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; essa reticola le proteine formando ponti metilenici estremamente stabili ma la reazione con i lipidi è scarsamente apprezzabile.

Per la post-fissazione è stato utilizzato il tetrossido di osmio all'1%, in tampone fosfato. L'osmio reagisce bene con i lipidi e con le proteine che presentano gruppi SH ed SS, e permette di aumentare il contrasto elettronico delle strutture osmiofile.

Avendo una composizione chimica simile a quella dei fluidi extracellulari, il PBS è stato impiegato anche come soluzione di lavaggio tra le due fissazioni e durante le successive fasi di allestimento dei campioni in cui se ne rendeva necessario l'utilizzo.

Protocollo di fissazione MO e TEM	
Pre-fissazione	24 h in glutaraldeide al 3% in tampone fosfato 0,1 M (pH 7.2) a 4°C
Lavaggio	1 passaggio di 10 min in tampone fosfato 0,1 M
Post-fissazione	2 h in OsO ₄ al 1 % in tampone fosfato 0,1 M (pH 7.2) a 4°C
Lavaggio	1 passaggio di 10 min in tampone fosfato 0,1 M

SEM

Nel caso della microscopia elettronica a scansione, i campioni sono stati sottoposti esclusivamente ad una fissazione aldeidica in glutaraldeide al 3% veicolata dal tampone fosfato.

Protocollo di fissazione SEM	
Fissazione	24 h in glutaraldeide al 3% in tampone fosfato 0,1 M (pH 7.2) a 4°C

3.4.2 Disidratazione

La fase di disidratazione permette la rimozione di tutti i liquidi presenti nel tessuto. Nel caso della microscopia ottica e di quella elettronica a trasmissione, i liquidi devono essere sostituiti con un solvente organico miscibile con la resina utilizzata nella fase di inclusione.

Gli agenti disidratanti sono solventi organici ad elevata forza che, per le loro caratteristiche, rendono inevitabile un certo grado di coartazione ed estrazione dei costituenti cellulari; per evitare che tali fenomeni si verificino, la disidratazione deve essere effettuata in modo graduale (utilizzando soluzioni a concentrazione crescente dell'agente disidratante) e nel minor tempo possibile, ovviamente compatibilmente al tipo di tessuto ed alle sue dimensioni.

MO e TEM

Per i campioni destinati alla microscopia ottica ed elettronica a trasmissione, è stato utilizzato quale agente disidratante l'acetone; esso rappresenta il solvente naturale della resina epossidica utilizzata per l'inclusione, ed ha permesso di evitare il tradizionale impiego del solvente di transizione utilizzato nella disidratazione in etanolo, rappresentato di norma dall'ossido di propilene.

Protocollo di disidratazione MO e TEM	
Acetone al 30%	1 passaggio da 5'
Acetone al 50%	1 passaggio da 5'
Acetone al 70%	1 passaggio da 5'
Acetone al 90%	1 passaggio da 5'
Acetone al 100%	3 passaggi da 10'

SEM

Nell'allestimento dei preparati per la microscopia elettronica a scansione, la disidratazione è stata effettuata in soluzioni a concentrazione crescente di etanolo.

Protocollo di disidratazione SEM	
PBS	1 passaggio da 5'
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%	3 passaggi da 10'

3.4.3 Infiltrazione e inclusione (solo per MO e TEM)

L'infiltrazione consiste nella graduale sostituzione dell'agente disidratante con il mezzo di inclusione. I mezzi di inclusione consistono in monomeri di resine sintetiche, di ridotte

dimensioni, capaci di penetrare completamente il tessuto. La resina epossidica da noi utilizzata è stata ottenuta dalla miscela di Epon 812 e Araldite, in presenza di agenti acceleratori e induttori. Dopo l'infiltrazione, condotta sotto cappa, i campioni sono stati inclusi in appositi stampini e lasciati in stufa a 60°C per 3 giorni, in modo da permettere la polimerizzazione della resina ed ottenere, quindi, dei blocchetti destinati al taglio all'ultramicrotomo.

Protocollo di infiltrazione ed inclusione	
Misto resina-acetone (1:1)	1 passaggio da 4-8 h
Resina	1 passaggio da 12 h a temperatura ambiente e sotto cappa
Stufa	3 giorni a 60°C

3.4.4 Taglio e colorazione (solo per MO e TEM)

I campioni inclusi nei blocchetti di resina sono stati sezionati all'ultramicrotomo LKB Ultratome III. Per la microscopia ottica sono state prodotte sezioni con uno spessore 1-2 μm (sezioni semifini), mentre per la microscopia elettronica a trasmissione sono state ottenute sezioni con uno spessore di circa 60-90 nm (sezioni ultrasottili).

Generalmente, il campione incluso presenta una consistenza e un grado di durezza diversi da quelli della resina che lo circonda; per evitare dunque che durante il taglio la lama incontri zone con differente resistenza meccanica, è opportuno eliminare quanto più possibile, in corrispondenza del campo di sezionamento, la resina in eccesso che circonda il campione; questa operazione, definita "trimming", permette di ottenere un blocchetto avente la forma di un tronco di piramide, la cui superficie descrive un trapezio più o meno regolare con una base maggiore, una base minore e due lati obliqui.

Il blocchetto così ottenuto è stato montato sul braccio dell'ultramicrotomo dotato di binoculare che, oscillando, ha permesso il taglio delle sezioni; il campione è stato orientato in maniera tale da ottenere uno spessore omogeneo ed evitare sezioni "vibrate".

Trattamento delle sezioni semifini

Di norma le sezioni semifini vengono considerate sezioni di orientamento, che permettono all'operatore di identificare le zone del campione più adatte, e dunque significative, per ottenere le sezioni ultrasottili. Tuttavia esse rappresentano, quali elementi diagnostici, una valida alternativa ai preparati inclusi in paraffina utilizzati in microscopia ottica tradizionale consentendo, inoltre, di sfruttare al meglio il potere di risoluzione del microscopio ottico.

Sulle sezioni semifini ottenute da campioni epatici è stata effettuata una colorazione in Blu di toluidina; per l'epidermide, invece, è stata utilizzata la colorazione tricromica (blu di metilene, azzurro II, fucsina basica) secondo Humphrey e Pittman (1974). Le sezioni semifini sono state successivamente osservate e fotografate al microscopio ottico LEITZ Dialux EB 20.

Trattamento delle sezioni ultrasottili

Le osservazioni effettuate sulle sezioni semifini hanno permesso di identificare le aree del campione di maggiore interesse e di ricavarne le sezioni ultrasottili. Quest'ultime, adagiate su appositi retini (o griglie), sono state contrastate con metalli pesanti in grado di fissarsi selettivamente a specifiche strutture sub-cellulari, mettendo in evidenza quelle che non avrebbero sufficiente densità.

Le sezioni ultrasottili hanno quindi subito 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. Alla contrastazione è seguita la metallizzazione; questo tipo di trattamento, che consiste nel rivestire i campioni di una pellicola di carbone a bassa densità elettronica, permette di aumentarne la stabilità meccanica e migliorarne quella termica. L'operazione di rivestimento delle sezioni è stata effettuata all'interno di speciali evaporatori che operano in condizioni di vuoto. Le sezioni così allestite sono state osservate al microscopio elettronico a trasmissione modello Zeiss EM 900.

3.4.5 Essiccamento e ricopertura (solo per SEM)

Per i preparati destinati alla microscopia elettronica a scansione, la fase di disidratazione è seguita dall'essiccamento e dalla copertura dei campioni. L'essiccamento consiste nell'allontanamento dei fluidi presenti nel campione, generalmente rappresentati da acqua o solventi utilizzati nella disidratazione. Si tratta di un processo delicato in quanto un cattivo essiccamento può determinare l'insorgenza di rotture o alterazioni che potrebbero compromettere le osservazioni. La metodica da noi utilizzata è stata quella del "critical point drying" (CPD), che impiega l'anidride carbonica come fluido intermedio.

Successivamente, i campioni sono stati fissati su appositi supporti (stub) e sottoposti alla fase di ricopertura che prevede l'impiego di sostanze metalliche ad elevato peso atomico (oro). Anche in questo caso, la metallizzazione è stata eseguita negli appositi evaporatori. Le osservazioni dei preparati sono state condotte al microscopio elettronico a scansione Zeiss DSM 940.

3.5 Allestimento dei preparati per la microscopia confocale

Al fine di condurre studi funzionali sul fegato di *Lissotriton italicus*, dopo il prelievo i campioni sono stati fissati, disidratati ed inclusi seguendo il protocollo per la microscopia confocale, che permette di preservare l'integrità dei siti antigenici sfruttati nell'immunomarcatura indiretta.

3.5.1 Fissazione

Il tessuto epatico è stato fissato in liquido di Bouin, altamente penetrabile e compatibile con quasi tutti i metodi di colorazione.

Fissazione Microscopia Confocale	
Fegato	24 h in liquido di Bouin a 4°C

3.5.2 Disidratazione

Di seguito è riportato il protocollo di disidratazione eseguito per i campioni epatici fissati precedentemente in liquido di Bouin. Questa fase è stata effettuata gradualmente utilizzando concentrazioni crescenti di etanolo.

Protocollo disidratazione (liquido di Bouin)	
Alcool al 50%	4-5 passaggi da 5'
Alcool al 50%	1 passaggio da 1 h
Alcool al 70%	1 passaggio da 1 h
Alcool all'80%	1 passaggio da 1 h (alcool di conservazione)
Alcool al 90%	1 passaggio da 1 h
Alcool al 95%	1 passaggio da 12 h
Alcool al 100%	1 passaggio da 30' ad 1 h
Alcool al 100%	1 passaggio da 30' ad 1 h
Alcool al 100%	1 passaggio da 30' ad 1 h

3.5.3 Inclusione

La fase di infiltrazione prevede l'utilizzo dello xilolo, il solvente organico della paraffina, che 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.

Protocollo infiltrazione ed inclusione (liquido di Bouin)	
Miscela Etanolo al 100% - Xilolo (1:1)	1 passaggio da 10'
Xilolo	1 passaggio da 10'
Xilolo	1 passaggio da 10'
Miscela xilolo - Paraffina	1 passaggio da 15' a 56°C
Paraffina	1 passaggio da 1 h in stufa a 42°C
Paraffina	1 passaggio da 1 h in stufa a 42°C
Paraffina	1 passaggio da 1 h in stufa a 42°C
Paraffina	1 passaggio da 1 h in stufa a 42°C

3.5.4 Taglio al microtomo

Il taglio dei campioni inclusi in paraffina è stato effettuato utilizzando il microtomo rotativo modello Leica RM2125RT, costituito da una lama fissa e da un braccio d'avanzamento sul quale viene posizionato il blocchetto di taglio.

Come avviene per i campioni inclusi in resina, anche per i campioni in paraffina il taglio è stato preceduto dall'operazione di "trimming".

L'utilizzo del microtomo ha consentito di realizzare sezioni dello spessore di 8 μm , le quali sono state montate su vetrini polarizzati e asciugate su piastra riscaldata.

3.5.5 Metodo dell'immunofluorescenza

Le sezioni in paraffina destinate alla microscopia confocale sono state sottoposte alla tecnica dell'immunomarcatura indiretta. Prima di applicare il protocollo, i campioni sono stati sparaffinati utilizzando il protocollo di seguito riportato.

Protocollo di paraffinatura	
Xilolo	1 passaggio da 2'
Etanolo assoluto	1 passaggio da 5'
Etanolo assoluto	1 passaggio da 2'
Etanolo al 95%	1 passaggio da 2'
Acqua distillata	1 passaggio da 2'

La tecnica dell'immunomarcatura indiretta (Coons *et al.*, 1955) prevede l'utilizzo di un anticorpo primario non coniugato, diretto contro i siti antigenici presenti sul tessuto.

Prima dell'incubazione con l'anticorpo primario, le sezioni sono state trattate con il Normal Serum, che permette di saturare eventuali siti antigenici aspecifici.

L'anticorpo primario è stato lasciato sulle sezioni over night e sostituito, il giorno successivo, con un anticorpo secondario coniugato con la fluoresceina isotiocianato al fine di monitorare l'espressione proteica.

La fluoresceina isotiocianato viene eccitata ad una lunghezza d'onda di 495 nm ed emette fluorescenza con lunghezza d'onda di 519 nm.

Inoltre, i nuclei delle cellule sono stati marcati con ioduro di propidio, un intercalante delle basi del DNA che emette fluorescenza di colore rosso.

Le sezioni sono state dunque osservate al microscopio confocale a scansione laser Leica TCS SP2.

Protocollo di immunomarcatura indiretta	
PBS	3 lavaggi da 5'
Normal serum	1 passaggio da 10'
Anticorpo primario	1 passaggio over night a 4°C in camera umida

PBS	3 lavaggi da 5'
Anticorpo secondario coniugato con FITC	30' in camera umida
PBS	3 lavaggi da 5'
Ioduro di propidio	1 lavaggio da 30''
PBS	3-4 lavaggi veloci
Chiusura con tampone PBS	

3.6 Citocromo P-450

Gli enzimi citocromo P-450 (CYP450) sono un'ampia famiglia di emoproteine appartenenti alla sottoclasse enzimatica delle monoossigenasi (o ossidasi a funzione mista) (Danielson, 2002), localizzate principalmente nel fegato, nell'intestino e nel rene (Nebert *et al.*, 1991; Guengerich, 1992; Stegeman and Hahn, 1994; Lee *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 1996; Guengerich, 1999; Meucci and Arukwe, 2006).

Negli Eucarioti, tali enzimi si collocano soprattutto a livello della membrana del reticolo endoplasmatico liscio e della membrana mitocondriale interna, in particolare nella frazione microsomiale delle cellule epatiche.

Gli enzimi CYP sono stati identificati in numerosi organismi quali Batteri, Lieviti, Funghi, Piante, Insetti, Pesci e Mammiferi (Hasemann *et al.*, 1995), e sono responsabili del metabolismo ossidativo di una vasta gamma di xenobionti (farmaci, tossine e inquinanti ambientali), dei quali modulano la durata e l'intensità dell'azione tossica, e del metabolismo degradativo di molti composti endogeni tra cui gli steroidi sessuali, gli acidi biliari, gli acidi grassi, le prostaglandine e il colesterolo (Nebert *et al.*, 1991; Goksøyr and Förlin, 1992; Stegeman and Hahn, 1994; Lee *et al.*, 1996; Arukwe *et al.*, 1997; Laurenzana *et al.*, 2002; Suzuki and Iwata, 2010).

A livello strutturale, l'identità di sequenza tra le varie isoforme di citocromo è generalmente bassa (10-30%) e di conseguenza, la correlazione struttura-funzione non è ancora chiara (Hasemann *et al.*, 1995).

Il centro catalitico di reazione del citocromo P-450 è il gruppo eme-tiolato (Fig. 3.2), altamente conservato in tutte le isoforme note, all'interno del quale è presente un atomo di ferro (Fe^{2+}) legato non covalentemente allo zolfo di un residuo cisteinico.

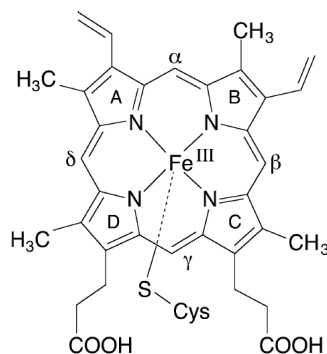
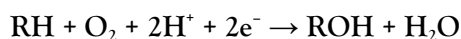


Fig. 3.2 Gruppo eme-tiolato

Il meccanismo di azione di questa famiglia di proteine consiste nel trasferimento di un atomo di ossigeno dall'O₂ molecolare ad un substrato organico, con conseguente riduzione del secondo atomo di ossigeno ad acqua:



Questo meccanismo può essere schematicamente riassunto in sei fasi (Fig. 3.3):

- legame del substrato al citocromo P450;
- riduzione dell'atomo di ferro del gruppo eme con elettroni forniti dal NADH o dal NADPH;
- legame dell'ossigeno molecolare al citocromo;
- trasferimento di un secondo elettrone;
- formazione di una molecola d'acqua;
- catalisi della specifica reazione (Nelson *et al.*, 1993).

Gli elettroni necessari alla riduzione del ferro dell'eme possono essere forniti, come precedentemente detto, dal NADPH o dal NADH attraverso altri sistemi proteici come la ferredossina, il citocromo b5 o la NADPH-emoproteina riduttasi, contenente FAD ed FMN come gruppi prostetici (Fig 3.3).

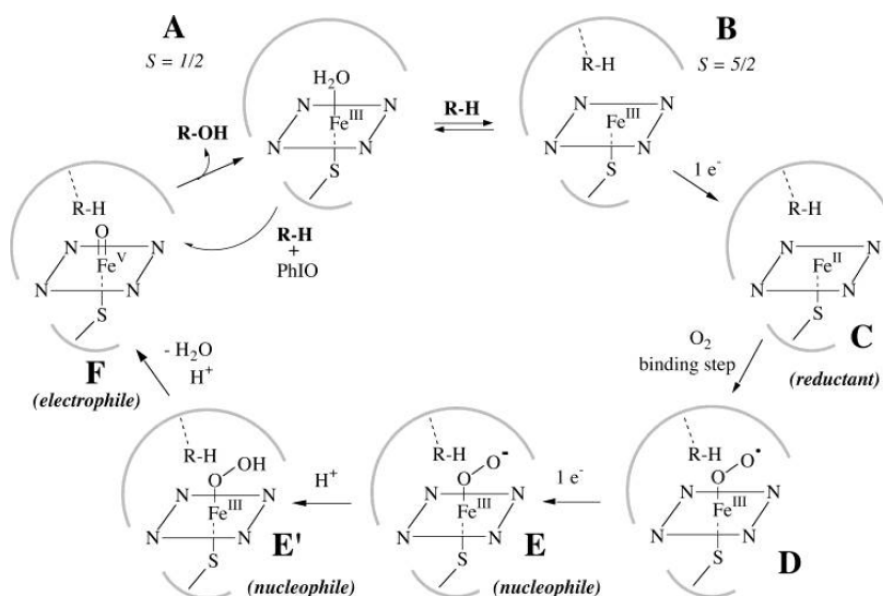


Fig. 3.3 Meccanismo d'azione degli enzimi citocromo p-450

La detossificazione mediata dal sistema dei citocromi P-450 rappresenta un meccanismo di difesa chiave nella protezione da potenziali effetti nocivi indotti da agenti chimici esogeni. Durante l'esplicamento dei meccanismi metabolici, i composti esogeni vengono coniugati con una vasta gamma di molecole endogene attraverso l'azione di enzimi transferasi tra cui la glutatione S-transferasi e l'UDP-glucuronosiltransferasi. L'attività combinata tra gli enzimi ossidativi e le transferasi permette di trasformare i composti lipofili in composti polari e solubili in acqua, che vengono escreti con maggiore facilità (George, 1994; Smirlis *et al.*, 2001).

Ogni subfamiglia di citocromo è funzionalmente distinguibile sulla base della specificità per il substrato e per il suo induttore; ciascuna isoforma è infatti espressa, in condizioni fisiologiche, a bassi livelli, e può essere attivata da specifici agenti, che ne possono rappresentare essi stessi il substrato (Lee *et al.*, 1996). Bisogna inoltre considerare che un singolo agente chimico può indurre l'espressione di differenti isoforme di citocromo (Smirlis *et al.*, 2001).

L'attivazione della trascrizione genica dei diversi geni CYP dipende da vari fattori quali localizzazione tissutale, specie, sesso e stadio di sviluppo (Stegeman and Hahn, 1994; Buhler and Wang-Buhler, 1998; Katchamart *et al.*, 2002), ed è regolata attraverso l'interazione di complessi ligando-recettore nucleare con sequenze enhancer localizzate a livello del promotore del gene CYP coinvolto (Smirlis *et al.*, 2001). Nel fegato, ad esempio, l'espressione dei geni che codificano per gli enzimi CYP può essere influenzata dall'interazione con altri fattori coinvolti nel funzionamento dell'organo (Lee *et al.*, 1996).

Oggi è ampiamente documentato il coinvolgimento dei farmaci e di altri agenti chimici quali, ad esempio, gli "endocrine disrupting chemicals" (EDCs) sia nell'induzione che nell'inibizione di questa classe di enzimi. Per tali ragioni, gli studi biochimici condotti su specie animali differenti sono volti principalmente a definire il tipo di risposta metabolica di questi organismi agli stress determinati dall'esposizione a composti xenobiotici, in modo da poterli utilizzare come modello nelle sperimentazioni di nuovi farmaci e nell'ecotossicologia. (Arukwe *et al.*, 1997; Hasselberg *et al.*, 2005; Meucci and Arukwe, 2006; Suzuki and Iwata, 2010).

Nel nostro caso specifico, è noto che il nonilfenolo (NP) è in grado di interagire con le forme di citocromo coinvolte nel metabolismo di xenobioti e farmaci, che nei vertebrati includono le subfamiglie CYP-1A e CYP-3A.

3.6.1 CYP-1A

L'elevata specificità di substrato degli enzimi CYP-450 rappresenta una caratteristica fondamentale affinché tali proteine possano essere considerate dei buoni indicatori della presenza di inquinanti xenobiotici nell'ambiente, e ne consentono quindi l'utilizzo come biomarkers.

Le isoforme più usate nella rilevazione di inquinanti delle acque sono quelle appartenenti alla famiglia CYP-1 del fegato, indotte dalle classi più diffuse di contaminanti come gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), gli idrocarburi poliaromatici nitrati (NPAH), i

bifenili policlorurati (PCB), le diossine (TCDD) ed alcuni pesticidi (Schlenk and Di Giulio, 2002).

La famiglia CYP-1 è composta da quattro subfamiglie: CYP-1A, CYP-1B, CYP-1C e CYP-1D (Suzuki and Iwata, 2010).

In molti Vertebrati, il meccanismo di induzione dei geni CYP-1A ad opera di alcune delle classi di composti indicate, si attua attraverso l'attivazione del recettore AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor). In presenza del contaminante, infatti, il recettore AHR forma un eterodimero con il traslocatore nucleare AHR (ARNT) e si lega agli elementi responsivi della diossina (DREs), a livello delle regioni regolatrici dei geni CYP-1A (Suzuki and Iwata, 2010).

Poche informazioni sono disponibili in letteratura sui geni CYP-1 negli Anfibi; tuttavia, Suzuki e Iwata (2010) riportano una breve descrizione della struttura dei geni che codificano per le isoforme di citocromo appartenenti alla subfamiglia 1A in *Xenopus tropicalis* (Fig. 3.4). La sequenza amminoacidica di tali geni mostra, nel complesso, sei siti di riconoscimento per il substrato (SRS) e un dominio di legame per il gruppo eme. A monte del sito di inizio di trascrizione del gene, in uno stream di 5 Kb, sono inoltre presenti tre siti di legame per la diossina (DREs); questo numero risulta inferiore rispetto a quanto riscontrato in altri Vertebrati e fornisce una spiegazione alla minore responsività del recettore AHR degli Anfibi all'esposizione a TCDD registrata da Lavine *et al.* nel 2005.

```

xtCYP1A MTS-WIGLIADMDNSTTEVLVASIVFAIVFLVIRSQRVKL-----PPGTK--
xtCYP1B MNW----KIWEDLGQSSVPKLL---LSFLCALTVAH----ILKWIHEWIIPRWIRSS--
xtCYP1C MDTAEPFAEWKD---SVQPALV---FSFLILICLEV---CL-----WLRNNGQR
xtCYP1D M-----PMLLKASISFLTLLVMS---IL-----WKKRN--

xtCYP1A -KLPGPMPYPVIGNLLSLSKNPHLSLTKMSEYGDVFIQIQIGTKPMLVLSGLETLRQALI
xtCYP1B -QPPGPPFPWPLFGNALQMGSYPHLAFIDLAKRYGNIFQIKLGSQKIVVLNGDLVIRHALL
xtCYP1C RSPGPPFPWVVGNAQLGQLPHLTFCKMSQKYGNVFQIRLGTQDIVVLNGDSTIREALV
xtCYP1D -SLPGPWAVPIVGNFFQLGDQIHITLDMRNRYGDVFIKILGLMPIVVVSGLETVKRVLL

SRS1
xtCYP1A RQSEDFAGRFDLFTFRVLGQDQSMTFSSDSGEVWRARRRRLAQNALKTFATSPSPSSNSNC
xtCYP1B HKGEDFAGRPFKFTSYQFVSGGRSLAFGC-YTEKWKARHRLAHSVTRAFSTGNPQTKR--
xtCYP1C KHSKEFAGRPNFSSFLISGGKSIAGGG-YSLWKAQKKIAHSTLRAFSTVNSKIQK---
xtCYP1D KEGENFADRPNFYSFSLFSNGSSMTFSEKYGESWKIHKKIMKNALRNLSNESSTNSNCSC

xtCYP1A LVEENIITEAYLIRKFKELIDDKGEFDPYRYVVVSVANVICMCFGKRYNHDDDELLNV
xtCYP1B CLAENVLKEARDLIALFSELGQGGKIFYPGRHTVVSANVMSAVCFGRRYQHGDLEFQSL
xtCYP1C LFEKHVVAEQDLIDVFLRLTSEEYFDPRECTRVAANVICALCFGKRYSHDDEEFKAL
xtCYP1D RLEEYVCAEASDLVQELTDLSEAKVAFDPSSLIVITVANVVCALSFGRYDHDHDEFITL

SRS2 SRS3
xtCYP1A VNLTDEFGAASAAGNPADFIPILQYLPN---SSMKAFKEINQKFLAFMQKFTKEHYKTFD
xtCYP1B LSNNDKFTRSVVGAGSLVDVMPWLRFPNPNVRSVFRSQQVNYEFYDFVYKFLLRHNFTAN
xtCYP1C IGRNDKFGQTVGAGSLVDIMPWLLTFPNPVRSLYQSPKDLNWFYGFVKEKVSRRQTYN
xtCYP1D IDFNNDLRKAAGGLLADFIPILRFIPS---SSVKALKKFVQS FHSFIACVKDKHFAFTE

SRS4
xtCYP1A KNHIRDITDSLIOHSQEKRVDSNSI-----QLSNEKIVNIVNDLFGA
xtCYP1B QAVTRDMDDAFIHILITKE-GKVRADDADGGEKGNQYFFHSLEAEHVPSVTVDIFGA
xtCYP1C PEITRDMSDAFISHIDNAE-GIEAGD-----GLSKDYVESIVNDILGA
xtCYP1D ENNIRDITDALIQLCKERK-SEDKNQ-----LLSDDQIISTVNDIFGA

xtCYP1A GFDTITLALSWSLMYLVAFHPNIQRIQDELQVIGRERRPRLSDRAQLPYTEAFIEMFR
xtCYP1B SQDTLSTALQWVIFFLVRYPEIQTKLOEMDRVIGKDRLPCIEDQPKLPYLMAFYEFMR
xtCYP1C QODTITLALTWILLIKYVDIQKQLEEDLVVGPNRLPADDKVQLPVQVAFIYEALR
xtCYP1D GFDTITLALLWAFYLLRYPEFQDKIHKEIEEKIGCNRAPFRNDRKDLHYTEAFINEVLR

SRS5
xtCYP1A HSSFMPTTIPHCTTKDITMLNGYFIPKGCIVLINQWVNHDPNLWQDPFKFCPERFLNNDG
xtCYP1B FSSFPVPTIPHATTKNTTIMGYIPKDTVVFNQVSNHDPQKWSNPGFNPFRFLDDNG
xtCYP1C FSSFPVPTIPHSTTSDDVVIDGFYIPKDTVVFNQVSNHDESKWKNPDVFPDRFLDEEG
xtCYP1D HSSFPVFGLPHTCTMDITKLNQYFLPKGTCVFTNLQVNHDTVWVKADMFMPERFLDQNG

Heme SRS6
xtCYP1A TMVNKTEMEKVMIFGLGKRRCVGEAIGRMEVFLFLTMLQMQVFFKQDGEKIDMSFPQYGL
xtCYP1B LI-NKDLVSNIMIFSVGKRRRCIEELSKIQLFMFSSILLHQCFITALPADNINPRGQYGL
xtCYP1C QL-DRDAFGVMIFSVGKRRRCIGDQLSMLQIFLFTAIFLHQCTLHGPNKEIPIIMDCISGL
xtCYP1D QI-IKSLTEKVLVFGMGVRRKCLGEDVARNEMFVIMTIMMQRLLKVKSTKHELDPIPVYGL

xtCYP1A TMKHKRCHLTAKLRFALLTN-----
xtCYP1B SITKPKPFRISMTLRHGSMDLLNNSVLSGMAE
xtCYP1C SLKPLPYGMSVVRARVGRRTM-KEPV-----
xtCYP1D TLKPKPYLVAKVRT-----

```

Fig. 3.4 Sequenziamento dei geni CYP1 in *Xenopus tropicalis*

3.6.2 CYP-3A

Masuyama *et al.*, (2000) hanno documentato il coinvolgimento dell'NP nell'induzione dell'isoforma 3A del citocromo P-450 attraverso l'attivazione del recettore X del pregnano (PXR). Anche in questo secondo caso, il meccanismo d'azione si esplica attraverso l'interazione del recettore con i siti responsivi presenti a livello genico (Smirlis *et al.*, 2001).

Le tecniche di studio degli enzimi CYP-450 sono disparate; le variazioni di espressione possono essere determinate indirettamente, attraverso saggi di attività di altri enzimi appartenenti al sistema delle monoossigenasi a funzione mista; un esempio ne è la 7-etossiresorufina-O-dietilasi (EROD), che catalizza l'idrolisi dell'etossiresorufina a 7-idrossiresorufina, un composto la cui fluorescenza è rilevabile attraverso analisi spettrofluorimetriche (Nilsen *et al.*, 2002). In alternativa, la presenza del citocromo P-450 può essere rilevata direttamente mediante test immunologici (come l'ELISA) utilizzando anticorpi specifici per ciascuna isoforma (Tom *et al.*, 2002). Nel nostro caso l'espressione delle isoforme 1A e 3A del citocromo P-450 è stata valutata attraverso la tecnica dell'immunomarcatura indiretta precedentemente descritta utilizzando, per ciascun enzima, gli anticorpi specifici riportati in tabella.

Anticorpo	Specie host	Diluizione	Casa produttrice
CYP-1A	Mouse	1:100	Biosense Lab
CYP-3A	Rabbit	1:100	Abcam

3.7 Caspasi-3

3.7.1 Struttura e funzione

Le caspasi appartengono ad una famiglia di proteasi cisteiniche altamente conservate che catalizzano il taglio proteico in siti adiacenti ad un residuo di acido aspartico, seguendo un pattern di degradazione altamente selettivo (Kumar and Lavin, 1996; Zhivotovsky *et al.*, 1997). I membri di questa famiglia possono essere funzionalmente divisi in due gruppi, caspasi d'inizio e caspasi effettrici; una volta che una caspasi di inizio è stata innescata, il programma di morte cellulare procede con rapide e sequenziali attivazioni dei membri effettori.

Nel 1994, la caspasi-3 è stata identificata per la prima volta quale mediatore chiave nell'apoptosi (Nicholson *et al.*, 1995; Tewari *et al.*, 1995).

Tutte le caspasi sono presenti all'interno delle cellule come pro-forme inattive definite zimogeni. Studi di cristallografia a raggi X e di sequenziamento peptidico hanno dimostrato che questi proenzimi inattivi presentano una struttura tripartita composta da un largo dominio centrale (17-21 kDa) denominato p20, contenente una grande subunità catalitica (sito attivo), un piccolo dominio C-terminale (10-13 kDa), detto anche piccola subunità catalitica o p10, e un prodominio NH₂-terminale (3-24 kDa) definito "death domain" (DD), implicato nella

trasduzione del segnale apoptotico (Weber and Vincenz, 2001). Il DD è un membro della famiglia dei recettori TNF (Nicholson and Thornberry, 1997; Earnshaw *et al.*, 1999; Creagh and Martin, 2001) ed è costituito da due subdomini, il “death effector domain” (DED) e il “caspase-recruitment domain (CARD). DED e CARD comprendono 6-7 α -eliche alifatiche in conformazione antiparallela che interagiscono con altre proteine attraverso interazioni idrofobiche ed elettrostatiche, ed hanno il compito di reclutare le caspasi iniziatrici nel luogo di formazione dei complessi proapoptotici. (Eberstadt *et al.*, 1998; Hofmann, 1999).

La classificazione delle caspasi viene effettuata sulla base della lunghezza del prodominio. Le caspasi con prodominio lungo sono divise in due gruppi: 1, 4, 5, 12, 13 e 14 (caspasi di gruppo I) controllano la maturazione delle citochine e i processi infiammatori, mentre le caspasi 2, 8, 9 e 10 (caspasi di gruppo II) sono dette iniziatori dell’apoptosi e contengono o il dominio DED (caspasi 8 e 10) o il dominio CARD (caspasi 2 e 9). La caspasi-3, insieme alle caspasi 6 e 7, appartiene invece alle precedentemente citate caspasi effettrici o esecutrici, altrimenti dette caspasi di gruppo III, caratterizzate da corti prodomini di 20-30 amminoacidi (Chowdury *et al.*, 2008).

Il sito catalitico risulta conservato in ogni isoforma ed ha una sequenza consenso QACxG localizzata all’interno della subunità p20. I tagli proteolitici necessari all’attivazione avvengono in siti dotati di un residuo Asp che determina la possibilità di amplificare il segnale apoptotico attraverso l’attivazione di più caspasi effettrici ad opera di poche caspasi iniziatrici (Fig. 3.5).

Ogni caspasi rappresenta un eterodimero di un omodimero [p20₂p10₂] legati in una struttura quaternaria; ogni monomero p20-p10 forma un cilindro con un foglietto β centrale formato da 6 strand. I due cilindri interagiscono tra loro testa-coda, e quindi con i siti attivi posizionati agli estremi opposti della molecola (Chowdhury *et al.*, 2008).

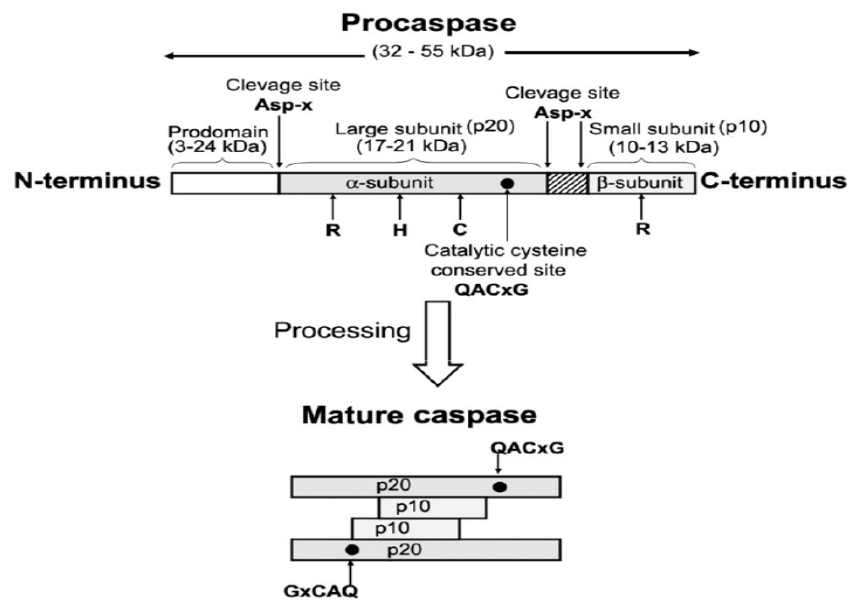


Fig. 3.5 Schema di clivaggio e attivazione di una caspasi

3.7.2 Coinvolgimento della caspasi-3 nell'apoptosi

La morte cellulare costituisce uno degli eventi chiave della biologia. Almeno due sono le modalità di morte cellulare che possono essere distinte: la necrosi e l'apoptosi (Kroemer *et al.*, 1998).

L'apoptosi è strettamente regolata, è responsabile della rimozione di cellule invecchiate o danneggiate ed ha un ruolo fondamentale nella morfogenesi embrionale, nella metamorfosi e nel rimodellamento tissutale dipendente dagli ormoni (Kroemer *et al.*, 1998; Kaptaner and Ünal, 2010)

Disturbi nella regolazione dell'apoptosi evidenziano l'importanza di questo meccanismo omeostatico; fenomeni di inibizione determinano infatti l'insorgenza di malformazioni, malattie autoimmuni, e patologie tumorali, correlate rispettivamente alla sopravvivenza di cellule superflue, di cellule immunitarie self-specifiche e di cellule mutate. Contrariamente, un aumento dei fenomeni apoptotici è implicato nell'insorgenza di manifestazioni patologiche acute e croniche di diverso tipo.

La fase di controllo e di integrazione dell'apoptosi è attuata come precedentemente detto, dalle caspasi.

Ci sono due principali pathways di attivazione delle caspasi, non mutuamente esclusivi (Fig. 3.6): il "death-receptor mediated pathway" o via estrinseca, che coinvolge la formazione di un "death-signaling complex" (un esempio ne è dato dall'interazione Fas-ligando del Fas) capace di attivare le procaspasi 8 e 10, e il "mitochondria-mediated pathway", o via intrinseca, che implica la formazione di un apoptosoma in grado di attivare la procaspasi-9. In aggiunta a queste due vie di attivazione delle caspasi esiste un pathway mediato dal reticolo endoplasmatico (ER) ed uno mediato dal granzima B.

L'attivazione della caspasi-3 quale effettore dell'apoptosi si verifica sia nella via intrinseca che negli ultimi due casi citati. Nella via intrinseca, gli stimoli apoptotici provocano il rilascio del citocromo c dai mitocondri al citosol (Fan *et al.*, 2001; Finkel, 2001), con conseguente formazione dell'apoptosoma, la cui proteina centrale è conosciuta come Apaf-1 (Acehan *et al.*, 2002). La procaspasi-9 viene dunque reclutata dal complesso dell'apoptosoma attraverso l'interazione con il dominio CARD e viene attivata per dimerizzazione. La caspasi-9, a sua volta, effettua un taglio proteolitico a livello delle caspasi effettrici 3 e 7, che avviano i processi di morte programmata.

Nella via mediata dal reticolo endoplasmatico, i fattori di stress determinano la traslocazione della caspasi-7 dalla superficie dell'organulo. La caspasi-7 è responsabile dell'attivazione della procaspasi-12, che agisce a sua volta sulla procaspasi-9; quest'ultima innesca, infine, le caspasi effettrici 3, 6 e 7.

Nell'ultimo caso, il granzima B, una serina proteasi, è in grado di attivare parzialmente la caspasi-3. La completa attivazione può invece richiedere altri mediatori proapoptotici come il citocromo c, Smac/Diablo e Htra2/omi, che vengono rilasciati dai mitocondri (Barry *et al.*, 2000; Sutton *et al.*, 2003).

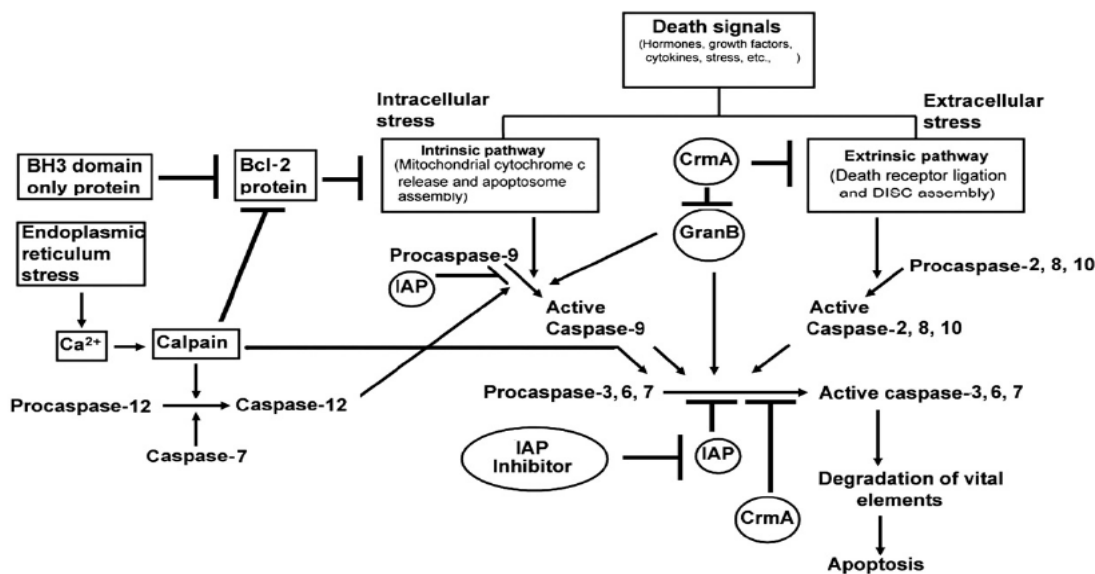


Fig.3.6 Schematizzazione dei pathways di attivazione ed attuazione del processo apoptotico

Nei casi in cui l'apoptosi segue la via intrinseca, i fenomeni che si susseguono determinano:

- ✗ un incremento dei pori sulla membrana mitocondriale interna, che causano una riduzione del potenziale di membrana e un conseguente rigonfiamento dell'organulo
- ✗ un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna, a cui è associato il rilascio del citocromo c.

In generale, nella morte cellulare programmata le lievi alterazioni che si verificano a livello della membrana plasmatica delle cellule prima della completa rottura, permettono l'esposizione sulla superficie dei residui di fosfatidilserina normalmente presenti sul lato interno del plasmalemma; questo meccanismo è responsabile del riconoscimento delle cellule apoptotiche e ne consente l'eliminazione prima che si verifichi il riversamento delle componenti cellulari all'esterno (Savill, 1996).

Le caspasi effettrici agiscono poi sulle proteine del citoscheletro e della matrice nucleare; tra i bersagli nel nucleo vi sono proteine coinvolte nella trascrizione, nella duplicazione e nella riparazione del DNA. Il processo apoptotico è infatti accompagnato da un caratteristico cambiamento della morfologia nucleare (condensazione perinucleare della cromatina, picnosi e carioressi, formazione di corpi apoptotici contenenti le frazioni nucleari) e biochimica della cromatina (graduale frammentazione del DNA che culmina nella formazione di monomeri e/o

oligomeri di 200 paia di basi) (Schwartzman and Cidlowski, 1993). Inoltre, durante il processo apoptotico, le cellule appaiono di dimensioni ridotte a causa della perdita del volume citoplasmatico e della condensazione proteica (Bortner and Cidlowski, 1996).

Nel caso dei processi necrotici, contrariamente a quanto detto sino ad ora, non è possibile riconoscere un pattern ordinato di degradazione proteica e del DNA e si verificano fenomeni di rigonfiamento dell'intera matrice citoplasmatica e di quella mitocondriale, che si manifestano poco prima della rottura della membrana cellulare (Mehendale *et al.*, 1994)

Le differenze fondamentali tra l'apoptosi e la necrosi sono riassunte nella tabella seguente:

Apoptosi	Necrosi
<p>Fisiologica o patologica (danno subcronico) Strettamente regolata Membrana plasmatica quasi intatta fino alla fine (perdita di asimmetria e di integrità) Mantenimento del contatto cellulare Nessuna infiammazione o lievi fenomeni di flogosi Coinvolgimento enzimatico - caratteristiche biochimiche e morfologiche: condensazione cromatinica (picnosi), frammentazione nucleare (carioessi), frammentazione del DNA secondo un modello regolare (endonucleosi), degradazione selettiva delle proteine ad opera di proteasi specifiche (caspasi), restringimento delle cellule, nessun rigonfiamento mitocondriale Rimozione eterofagica</p>	<p>Sempre patologica Casuale, non regolata o poco regolata Precoce distruzione della membrana plasmatica Perdita di contatto cellulare Caratteristiche biochimiche e morfologiche: rigonfiamento dell'intero citoplasma (oncosi), rigonfiamento mitocondriale, Necrosi secondaria: citolisi secondaria all'apoptosi Le cellule morte non vengono rimosse per eterofagia</p>

Tab.3.3 Differenze tra il processo apoptotico e quello necrotico

Le caratteristiche morfologiche dei mitocondri in entrambi i modelli di morte cellulare hanno condotto a speculazioni errate circa il loro ruolo centrale nella necrosi e la loro irrilevanza nel fenomeno apoptotico. Analisi funzionali condotte negli ultimi anni hanno infatti rivelato che i cambiamenti nella membrana mitocondriale rappresentano un punto critico nel processo apoptotico così come in quello necrotico (Kroemer, 1995; Kroemer *et al.*, 1998).

Sebbene questi due processi siano stati per lungo tempo considerati in antinomia, oggi è pensiero generale ritenerli due estremi di un processo continuo; alcune osservazioni hanno infatti dimostrato che una stessa tossina è in grado di determinare apoptosi o necrosi a basse ed alte concentrazioni rispettivamente. (Kroemer, 1995; Kroemer *et al.*, 1998).

3.7.3 Coinvolgimento dell'NP nei processi apoptotici

Le osservazioni effettuate al microscopio elettronico a trasmissione hanno mostrato fenomeni degenerativi a carico delle cellule epatiche associabili all'insorgenza di processi apoptotici.

In letteratura è noto il coinvolgimento del nonilfenolo nell'innescamento della morte cellulare programmata sia a livello epatico che in altri organi e tessuti (Weber *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2006; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2007; Kaptaner and Ünal, 2010), in alcuni casi mediante l'attivazione della caspasi-3 (Bechi *et al.*, 2006).

Come precedentemente accennato, studi condotti *in vivo* hanno dimostrato che le caspasi sono implicate nel clivaggio di componenti strutturali chiave del citoscheletro e del nucleo, e di numerose proteine coinvolte in differenti signaling pathways (Earnshaw *et al.*, 1999; Nicholson, 1999; Denault and Salvesen, 2002; Fischer *et al.*, 2003).

Nel caso della caspasi-3, i substrati target sono rappresentati da:

- ✗ Proteine citoplasmatiche: gelsolina, proteina associata all'actina, e β -catenine, componenti giunzionali;
- ✗ Proteine nucleari: laminine e proteina dell'apparato mitotico NuMa;
- ✗ Proteine coinvolte in pathways trasduzionali: fattore SREB, appartenente alla famiglia delle G-protein e Mdm2, importante modulatore negativo del soppressore tumorale p53.
- ✗ Proteine coinvolte nel metabolismo e nella riparazione degli acidi nucleici: poli(ADP) ribosio polimerasi (PARP), DNA-PK e Topoisomerasi I;
- ✗ Proteine chinasi: PKC delta, e ICAD (inibitore della nucleasi CAD);
- ✗ Proteine coinvolte nei fenomeni apoptotici: procaspasi 6, 7 e 9.
- ✗ Proteine coinvolte nel ciclo e nella proliferazione cellulare: p21 ed Rb;
- ✗ Proteine leganti gli elementi responsivi degli steroidi (Earnshaw *et al.*, 1999);
- ✗ β 1-adaptina e g-adaptina, coinvolte nell'endocitosi dei recettori mediata dalla clatrina.

L'aumento dell'espressione della caspasi-3 e, più in generale, l'instaurarsi di fenomeni apoptotici, possono dunque essere considerati indicatori precoci dello stress da xenobionti e forniscono dati circa lo stato di salute di un organismo (Sweet *et al.*, 1999).

Anche nel caso della caspasi-3, come precedentemente riferito per le due isoforme di citocromo considerate nel presente lavoro, l'espressione dell'enzima è stata valutata attraverso la tecnica dell'immunomarcatura indiretta.

Anticorpo	Specie host	Diluizione	Casa produttrice
Caspase-3	Rabbit	1:100	Sigma

RISULTATI

4.1 Anatomia macroscopica del fegato

Il fegato di *Lissotriton italicus* è collocato, come generalmente riportato per gli Urodeli, nella porzione craniale del celoma, a metà tra il mesentero ventrale e quello dorsale ed anteriormente al setto trasverso.

Esso appare come un singolo organo allungato di consistenza compatta; la colorazione varia dal marrone chiaro al marrone scuro, ed è ben evidente la caratteristica punteggiatura nera determinata dalla presenza, all'interno del parenchima dell'organo, di cellule contenenti melanina (*Tav. 1, fig. A*).

4.2 Morfologia ed ultrastruttura del fegato degli esemplari di controllo

Osservato al microscopio ottico, il parenchima epatico appare composto da cellule organizzate a formare strutture simili a cordoni o piastre; tali aggregati epatocitari sono circondati da una fitta rete di capillari sanguigni, che nel fegato prendono il nome di capillari sinusoidi o semplicemente sinusoidi (*Tav. 1, fig. B*).

Dall'associazione di 4-5 epatociti si originano una serie di piccoli dotti, denominati canalicoli o dotti biliari. Osservati in sezione istologica, gli epatociti appaiono di taglia uniforme e possiedono nucleo tondeggianti localizzati in posizione centrale e contenente, in media, da uno a tre nucleoli (*Tav. 1, fig. B*).

Ciascuna cellula mostra una superficie apicale ristretta, una basale più ampia e due laterali. Dalla porzione apicale della membrana plasmatica degli epatociti coinvolti nella formazione del dotto biliare, si dipartono numerosi microvilli che si estendono verso l'esterno occupando quasi nella sua totalità il lume del canalicolo (*Tav. 1, fig. C*).

A livello delle porzioni laterali della membrana plasmatica dell'epatocita si osserva inoltre il sistema giunzionale; in particolare, nella porzione apicale sono presenti le giunzioni strette che, unitamente alle giunzioni comunicanti ed ai desmosomi, posti più in profondità, sono responsabili del mantenimento della polarità (*Tav. 1, fig. C*).

A maggiore ingrandimento si osservano con miglior dettaglio il lume del canalicolo occupato dai lunghi microvilli e le giunzioni strette, rappresentate da strisce anastomizzate tra loro che decorrono lungo l'intera circonferenza della cellula (*Tav. 1, fig. D*).

All'interno del citoplasma degli epatociti è possibile distinguere un reticolo endoplasmatico rugoso (RER) ben sviluppato; esso è localizzato principalmente in continuità con la membrana nucleare ma si estende per l'intera superficie cellulare raggiungendo la porzione apicale della membrana plasmatica, in prossimità dei canalicoli biliari (*Tav. 1, fig. C*). Le cisterne del RER appaiono organizzate in pile parallele che

risultano strettamente intercalate con i mitocondri; questi ultimi, mostrano un aspetto estremamente eterogeneo, con forme rotonde o più o meno allungate e creste poco evidenti (*Tav. 1, fig. C*).

Sono inoltre presenti numerosi granuli di glicogeno elettrondensi che in molti casi si dispongono alla periferia di grandi aggregati lipidici, circondandoli completamente (*Tav. 1, fig. E*). Dall'analisi ultrastrutturale condotta su diversi esemplari di controllo sono emerse ampie variazioni nella consistenza dei depositi lipidici e glicogenici, probabilmente determinate dalle differenze nello stato metabolico e nutrizionale che caratterizzava ogni singolo individuo considerato.

L'apparato di Golgi e il reticolo endoplasmatico liscio (SER) sono stati raramente osservati all'interno del citoplasma degli epatociti.

A livello della regione basale le cellule epatiche, insieme alle cellule endoteliali, definiscono uno spazio che prende il nome di spazio di Disse o spazio perisinusoidale (*Tav. 2, fig. A*). Lo spazio di Disse è occupato da una sostanza finemente granulare, che osservata al TEM appare elettrondensa, in cui sono immerse numerose proiezioni citoplasmatiche orientate in maniera irregolare, che si dipartono dalla membrana basale degli epatociti parenchimali (*Tav. 2, fig. A*) e fibre collagene, meglio osservabili a maggior ingrandimento (*Tav. 2, fig. B*).

Le cellule endoteliali, oltre ad essere coinvolte nella formazione dello spazio perisinusoidale, delimitano il lume dei capillari sinusoidi; queste cellule sono organizzate a formare un endotelio incompleto, talvolta composto da due strati (*Tav. 2, fig. A*); il plasma, libero di diffondere attraverso le fenestrature generate dalla discontinuità di queste cellule, penetra all'interno dello spazio di Disse irrorando gli epatociti (*Tav. 2, fig. A*).

All'interno del parenchima epatico è inoltre osservabile un numero variabile di cellule pigmentate o melanofori caratterizzate dalla presenza, all'interno del citoplasma, di aggregati elettrondensi di melanina. Queste cellule, riscontrate talvolta singolarmente e talvolta in aggregati, mostrano forma irregolare, spesso allungata, e possiedono un nucleo generalmente ovoidale (*Tav. 2, fig. C*).

Infine, nel lume dei capillari sinusoidi sono spesso presenti cellule ad attività macrofagica che nel fegato prendono il nome di cellule di Kupffer (*Tav. 2, fig. D*). Le cellule di Kupffer sembrano sospese all'interno del flusso ematico, fissate attraverso processi citoplasmatici alle cellule endoteliali o talvolta ancorate alla parete dei capillari come costituenti fissi di questa e, insieme alle cellule endoteliali, partecipano alla costruzione della barriera sinusoidale (*Tav. 2, fig. D*). Questi elementi cellulari mostrano notevole variabilità sia nella forma che nella taglia e sono caratterizzati dalla presenza, all'interno del citoplasma, di vescicole endocitotiche e materiale sequestrato, chiari indici dell'attività macrofagica (*Tav. 2, fig. D*).

4.3 Morfologia ed ultrastruttura del fegato dopo esposizione a 50 µg/l di NP10E

Dopo 24 h di esposizione ad una concentrazione di nonilfenolo 10-etossilato (NP10E) pari a 50 µg/l, l'analisi condotta al microscopio ottico non mostra apparenti segni di alterazione; il tessuto epatico è ben organizzato e mantiene l'assetto strutturale descritto per gli esemplari di controllo (*Tav. 3, fig. A*). Tuttavia, risulta evidente un incremento degli accumuli lipidici, colorati in arancio nella sezione istologica (*Tav. 3, fig. A*).

Le osservazioni al TEM mostrano invece cellule con differenti gradi di modificazione ultrastrutturale. In alcune aree il parenchima risulta inalterato ed è evidente la presenza di dotti biliari e sistemi giunzionali ben organizzati e conservati (*Tav. 3, fig. B*). In altre regioni si osservano canalicoli biliari fortemente dilatati o con conformazioni allungate e appiattite (*Tav. 3, fig. C*).

All'interno del citoplasma di alcuni epatociti si registrano inoltre importanti alterazioni a carico del RER; l'organulo assume infatti una conformazione a zolle ed appare localizzato in maniera discontinua all'interno dello spazio cellulare (*Tav. 3, fig. D*).

Dopo 48 h di esposizione, osservato al microscopio ottico il parenchima epatico non appare più compatto e ben organizzato (*Tav. 4, fig. A*). I depositi lipidici non sembrano subire un incremento numerico ma aumentano nella dimensione e nella consistenza (*Tav. 4, fig. A*).

A livello ultrastrutturale il tessuto assume un aspetto disorganizzato e sono evidenti lacune intercellulari (*Tav. 4, fig. B*).

All'interno del citoplasma delle cellule le modificazioni a carico del RER sono estese; l'organulo mostra chiari segni di frammentazione e spesso assume conformazioni atipiche; le sue cisterne appaiono inoltre fortemente dilatate (*Tav. 4, fig. B*). I mitocondri assumono un aspetto rigonfio e il sistema di microcreste risulta compromesso (*Tav. 4, fig. B*).

E' evidente l'accumulo di consistenti granuli lipidici, già osservato al MO, che spesso sono riuniti in cluster (*Tav. 4, fig. C*), mentre nel lume dei dotti biliari si nota l'assenza dei tipici microvilli (*Tav. 4, fig. D*).

Dopo 96 h di esposizione, l'aumento delle dimensioni degli spazi intercellulari conferiscono al tessuto epatico un aspetto disomogeneo, ben evidente nella sezione istologica (*Tav. 5, fig. A*). L'analisi condotta al TEM mostra all'interno di alcuni epatociti l'ampliamento del RER, che occupa gran parte dello spazio citoplasmatico (*Tav. 5, fig. B*). In altri casi il RER appare interessato da intensi fenomeni degenerativi; le cisterne vanno incontro ad evidenti fenomeni di vacuolizzazione ed appaiono dilatate e quasi totalmente disorganizzate (*Tav. 5, fig. C*).

I mitocondri mostrano un elevato grado di pleomorfismo, appaiono estremamente rigonfi e manifestano gravi alterazioni delle microcreste (*Tav. 5, fig. C*).

All'interno del tessuto epatico è inoltre possibile individuare cellule in avanzato stato degenerativo, i cui contorni cellulari risultano poco definiti, ed un incremento dell'attività macrofagica condotta dalle cellule di Kupffer (*Tav. 5, fig. D*).

4.4 Morfologia ed ultrastruttura del fegato dopo esposizione a 100 µg/l di NP10E

Dopo 24 h di esposizione alla concentrazione di 100 µg/l, le immagini di microscopia ottica mostrano un rapido ampliamento degli spazi intercellulari che conferiscono al tessuto un aspetto poco compatto (*Tav. 6, fig. A*).

L'analisi ultrastrutturale mostra la perdita di contatto giunzionale tra epatociti adiacenti che determina la formazione di ampi spazi intercellulari (*Tav. 6, fig. B*).

A livello citoplasmatico si osserva un notevole incremento dell'estensione del RER, le cui cisterne si dispongono ad occupare quasi l'intero citoplasma, assumendo conformazioni atipiche e disponendosi spesso in maniera concentrica (*Tav. 6, fig. B*).

I mitocondri associati alle cisterne del RER mostrano segni di alterazione resi evidenti da modificazioni nella forma e nel sistema di microcreste (*Tav. 6, fig. C*). Inoltre, a livello dei dotti biliari in alcuni casi i microvilli che ne occupano il lume collabiscono gli uni con gli altri (*Tav. 6, fig. C*).

All'interno dei capillari sinusoidi sono spesso osservabili cellule di Kupffer in attività (*Tav. 6, fig. D*).

Dopo 48 h di trattamento, l'analisi istologica rivela l'instaurarsi di forti fenomeni di steatosi epatica determinati da un incontrollato accumulo di granuli lipidici (*Tav. 7, fig. A*). Questa condizione patologica è confermata anche dall'esame condotto al TEM, che mostra le inclusioni lipidiche organizzate in cluster e circondate dai depositi glicogenici elettrondensi (*Tav. 7, fig. B*).

I canalicoli biliari appaiono fortemente modificati, mostrano forma estremamente allungata e lume allargato (*Tav. 7, fig. C*) e, talvolta, risultano completamente occlusi (*Tav. 7, fig. D*). In alcune cellule il RER è ancora ben definito ed esteso (*Tav. 7, fig. D*) ma in altri epatociti è evidente una forte disorganizzazione del sistema di endomembrane (*Tav. 7, fig. E*).

Le alterazioni a livello del nucleo sono frequenti ed i fenomeni di condensazione cromatinica rappresentati da zollature scure sono ben visibili (*Tav. 7, fig. E*).

Dopo 96 h di esposizione, i processi degenerativi appaiono in stato avanzato e coinvolgono a diversi livelli sia i sistemi intracellulari che quelli extracellulari, rendendo impossibile il riconoscimento dell'originario assetto strutturale dell'organo (*Tav. 8, fig. A*).

Osservati al TEM, gli epatociti mostrano chiari segni di degenerazione nucleare e la perdita di contatto giunzionale tra di essi è marcata (*Tav. 8, fig. B*). Spesso le cellule ancora integre appaiono quasi completamente invase dai depositi lipidici (*Tav. 8, fig. C*). E' evidente, inoltre, una disorganizzazione del RER che assume aspetto zollato mentre i mitocondri, spesso allungati e con forme atipiche, mostrano una matrice povera di microcreste (*Tav. 8, fig. D*). Si assiste inoltre alla degenerazione strutturale del sistema dei canalicoli biliari (*Tav. 8, fig. D*).

Anche il sistema vascolare risulta compromesso e chiari segni di alterazione sono presenti a carico delle cellule endoteliali, all'interno delle quali si instaurano fenomeni di vacuolizzazione del citoplasma (*Tav. 8, fig. E*). Infine, all'interfaccia tra i sinusoidi ed i complessi cellulari si assiste a fenomeni di infiltrazione macrofagica (*Tav. 8, fig. F*).

4.5 Citocromo P-450 1A

Negli esemplari di controllo i livelli di espressione dell'isoforma 1A del citocromo P-450 (CYP-1A) sono molto bassi (*Tav. 9, fig. A*).

Il trattamento con NP10E ad una concentrazione di 50 µg/l non determina variazioni nel pattern di espressione del CYP-1A durante le prime 48 h di esposizione (*Tav. 9, figg. B-C*). Dopo 96 h, le osservazioni mostrano un notevole incremento della fluorescenza (*Tav. 9, fig. D*).

Il trattamento con una concentrazione di NP10E pari a 100 µg/l determina un aumento dell'espressione dell'isoforma 1A del citocromo P-450 dopo le prime 24 h di esposizione (*Tav. 9, fig. E*). L'intensità della fluorescenza aumenta progressivamente raggiungendo un picco dopo 48 h (*Tav. 9, fig. F*) mentre dopo 96 h l'espressione è modesta (*Tav. 9, fig. G*).

4.6 Citocromo P-450 3A

L'isoforma 3A del citocromo P-450 (CYP-3A) è scarsamente espressa negli esemplari di controllo (*Tav. 10, fig. A*).

L'esposizione ad una concentrazione di 50 µg/l di NP10E non determina variazioni nell'espressione del CYP-3A durante le prime 48 h (*Tav. 10, fig. B*). Dopo 96 h, le immagini ottenute al microscopio confocale registrano un lieve ma evidente incremento della fluorescenza (*Tav. 10, fig. C*).

Alla concentrazione maggiore, pari a 100 µg/l, già dopo le prime 24 h di esposizione si assiste ad un leggero incremento di espressione dell'isoforma 3A del citocromo P-450 (*Tav. 10, fig. D*).

L'intensità della fluorescenza subisce un incremento col progredire del tempo di esposizione, raggiungendo un picco massimo dopo 48 h (*Tav. 10, fig. E*). Dopo 96 h di trattamento, la fluorescenza appare meno intensa (*Tav. 10, fig. F*).

4.7 Caspasi-3

In condizioni basali le cellule epatiche mostrano bassi livelli di espressione della caspasi-3 (*Tav. 11, fig. A*).

L'esposizione ad una concentrazione di 50 µg/l di NP10E determina un lieve ma evidente incremento dell'espressione dell'enzima già dopo le prime 24 h di trattamento (*Tav. 11, fig. B*).

La fluorescenza emessa aumenta chiaramente in relazione al tempo di permanenza nel contaminante e raggiunge un picco massimo dopo 96 h (*Tav. 11, figg. C-D*).

Alla concentrazione maggiore, pari a 100 µg/l, l'incremento di espressione della caspasi-3 risulta intenso in tutte le condizioni sperimentali testate mostrando un andamento crescente in relazione al tempo di esposizione (*Tav. 11, figg. E-F-G*).

4.8 Morfologia ed ultrastruttura dell'epidermide degli esemplari di controllo

L'analisi istologica degli esemplari di controllo mostra un'organizzazione dell'epidermide in 4 strati ben distinguibili (*Tav. 12, fig. A*), non diversa da quella già descritta per altre specie di Urodela.

L'osservazione in microscopia elettronica a trasmissione mostra il pattern di differenziazione cellulare; nella porzione più profonda dell'epitelio è presente un singolo strato basale di cellule proliferanti, sormontato da più strati di cellule con un crescente grado di maturazione (processo di appiattimento e di cheratinizzazione) (*Tav. 12, fig. B*).

Lo strato germinativo o basale, localizzato all'interfaccia con il derma, è separato da esso da una lamina basale di natura connettivale che, osservata al TEM, appare di colore chiaro (*Tav. 12, fig. B*). Le cellule di questo strato hanno forma colonnare e sono caratterizzate da grandi nuclei che occupano in buona parte il citoplasma cellulare (*Tav. 12, fig. B*).

Procedendo verso l'esterno, allo strato basale segue lo strato spinoso; in questa regione epidermica le cellule appaiono fortemente impacchettate e presentano nuclei larghi

tondeggianti o ovali (*Tav. 12, fig. C*). Il citoplasma delle cellule dello strato spinoso è occupato da abbondanti filamenti di cheratina organizzati a formare una complessa rete e le componenti cellulari quali ribosomi, corpi multivescicolari, RER ed apparato di Golgi risultano ben evidenti (*Tav. 12, fig. D*).

Procedendo verso l'esterno, il pattern di progressione cheratinica diviene più netto; a livello dello strato granuloso le cellule mostrano, infatti, un avanzato stadio di maturazione e si preparano a sostituire lo strato corneo sovrastante che verrà perso durante i processi di muta (*Tav. 12, fig. E*). Questa condizione si rispecchia nelle caratteristiche proprie di queste cellule che mostrano una forma appiattita ed allungata (*Tav. 12, fig. E*) ed un elevato grado di cheratinizzazione, evidenziato dalla presenza di fasci di filamenti cheratinici fortemente impacchettati (*Tav. 12, fig. F*). I nuclei delle cellule dello strato granuloso sono grandi e di forma ovale (*Tav. 12, fig. E*) ed il citoplasma presenta al suo interno diverse tipologie di granuli elettrondensi, mentre RER ed apparato di Golgi risultano poco sviluppati (*Tav. 12, fig. F*).

La porzione più superficiale dell'epidermide è rappresentata dallo stato corneo. Osservato al SEM, esso appare costituito da cellule di forma poligonale dai margini giunzionali ben evidenti (*Tav. 13, fig. A*), la cui continuità è interrotta dalla presenza di tubercoli cornei e dallo sbocco in superficie delle ghiandole dermiche (*Tav. 13, fig. B*).

Osservate al TEM, le cellule dello strato corneo appaiono estremamente appiattite e presentano nuclei fortemente picnotici (*Tav. 13, fig. C*); il citoplasma è quasi interamente occupato da filamenti di cheratina e le componenti cellulari non sono più distinguibili. La fase di distacco dello strato corneo è molto evidente e, al di sotto di esso, sono spesso osservabili da 1 a 3 strati di sostituzione (*Tav. 13, fig. C*).

All'interno dello spessore epidermico sono inoltre riscontrabili sporadiche popolazioni di melanociti, Flask cells e cellule di Merkel.

I melanociti mostrano forma irregolare e contengono all'interno del citoplasma granuli di melanina di colore scuro; apparato di Golgi e RER sono ben sviluppati (*Tav. 13, fig. D*).

Le Flask cells presentano forma allungata e nucleo generalmente localizzato in posizione basale; il citoplasma è ricco di mitocondri e sono presenti microvilli apicali di natura non secretoria (*Tav. 13, fig. E*).

Le cellule di Merkel manifestano una struttura tipica di cellule sensitive trasduttrici e sono associate a fibre nervose mecano-recettive (*Tav. 13, fig. F*).

4.9 Morfologia ed ultrastruttura dell'epidermide dopo esposizione a 50 µg/l di NP10E

L'analisi al SEM effettuata dopo le prime 24 h di esposizione ad una concentrazione di NP10E pari a 50 µg/l mostra i primi segni di alterazione della superficie epidermica, che assume un aspetto più corrugato e appare disidratata (*Tav. 14, fig. A*). Anche a livello degli sbocchi ghiandolari sono evidenti i primi segni di intensificazione dell'attività secretoria (*Tav. 14, fig. B*).

In sezione istologica non si osservano modificazioni nel pattern di stratificazione descritto per gli esemplari di controllo (*Tav. 14, fig. C*), ma l'analisi ultrastrutturale condotta al TEM conferma l'intensificarsi del turnover cellulare (*Tav. 14, fig. D*); questo fenomeno causa una riduzione degli strati di sostituzione e determina la presenza, nello strato subcorneo, di cellule immature che non hanno completato i processi di appiattimento e di cheratinizzazione osservati in condizioni fisiologiche (*Tav. 14, fig. E*).

A livello delle cellule basali, si assiste alla comparsa di granuli citoplasmatici elettronchiari, mai osservati negli esemplari di controllo (*Tav. 14, fig. F*).

Dopo 48 h di esposizione, la superficie epidermica osservata al SEM rivela un ispessimento dei margini cellulari e dei tubercoli cornei (*Tav. 15, fig. A*); gli sbocchi delle ghiandole dermiche appaiono dilatati e mostrano un'intensa attività secretoria (*Tav. 15, fig. B*).

Nella sezione istologica, il profilo epidermico appare irregolare e si distinguono profonde invaginazioni dell'epitelio che mostra uno spessore ridotto (*Tav. 15, fig. C*). L'osservazione al TEM conferma le alterazioni osservate in microscopia ottica e le cellule appaiono fortemente appiattite e allungate in senso longitudinale; nel tessuto così compatto, diviene difficoltoso distinguere i diversi strati cellulari (*Tav. 15, fig. D*). All'interno del citoplasma delle cellule degli strati più interni si intensifica inoltre l'accumulo di granuli elettronchiari (*Tav. 15, fig. E*).

Dopo 96 h di esposizione, lo strato corneo osservato al SEM risulta in gran parte ricoperto da materiale mucoso, i bordi cellulari appaiono poco definiti e la superficie si solleva a tratti conferendo al tessuto un aspetto disomogeneo (*Tav. 16, fig. A*). Le ghiandole dermiche incrementano l'attività secretoria riversando all'esterno notevoli quantità di muco (*Tav. 16, fig. B*).

L'analisi condotta al microscopio ottico mostra un assetto strutturale dell'epidermide notevolmente diverso da quello osservato nelle sezioni di controllo (*Tav. 16, fig. C*).

I dati ottenuti con il supporto della microscopia elettronica a trasmissione mostrano una complessiva riduzione del numero e dello spessore degli strati epidermici e non è più distinguibile il pattern di maturazione cheratinica che caratterizzava le cellule degli esemplari di controllo (*Tav. 16, fig. D*).

Si intensificano inoltre i fenomeni di accumulo delle formazioni granulari nel citoplasma delle cellule degli strati più interni (*Tav. 16, fig. E*).

4.10 Morfologia ed ultrastruttura dell'epidermide dopo esposizione a 100 µg/l di NP10E

Alla concentrazione maggiore, pari a 100 µg/l, la presenza del contaminante determina un precoce, se pur lieve, incremento delle secrezioni mucose, e i fenomeni di degenerazione superficiale osservabili al SEM progrediscono velocemente (*Tav. 16, fig. F*). Le alterazioni osservate a livello dello strato corneo non sembrano coinvolgere gli strati più profondi ed all'osservazione al TEM è ancora possibile riconoscere l'organizzazione tipica degli esemplari di controllo (*Tav. 16, fig. G*). Risulta tuttavia evidente la precoce comparsa di granuli negli strati più profondi dell'epidermide (*Tav. 16, fig. G*).

Dopo 48 h di esposizione, le immagini al SEM evidenziano un progressivo incremento della secrezione mucosa che riveste la superficie cellulare (*Tav. 17, fig. A*). Le cellule superficiali appaiono fortemente ispessite e il fenomeno di cheratinizzazione risulta evidente (*Tav. 17, fig. B*).

Al microscopio ottico è evidente il distacco contemporaneo di più strati di sostituzione che nella sezione istologica appaiono impilati gli uni sugli altri (*Tav. 17, fig. C*).

I continui processi di muta sono ben visibili anche all'analisi ultrastrutturale (*Tav. 17, fig. D*); l'instaurarsi di evidenti fenomeni degenerativi a carico degli strati cellulari immediatamente sottostanti lo strato corneo (*Tav. 17, fig. E*) rende impossibile il riconoscimento delle diverse tipologie cellulari (*Tav. 17, fig. F*).

Dopo 96 h di esposizione, le immagini ottenute al microscopio elettronico a scansione mostrano una superficie epidermica completamente alterata e dall'aspetto disidratato, in cui risulta impossibile distinguere i margini cellulari (*Tav. 18, fig. A*). Lo strato corneo è quasi completamente ricoperto da materiale mucoso e si solleva sfaldandosi in più punti (*Tav. 18, fig. B*). Gli sbocchi ghiandolari appaiono fortemente dilatati e mostrano un ritmo di secrezione estremamente intenso (*Tav. 18, fig. C*).

Osservata al microscopio ottico l'epidermide appare completamente rialzata ed in alcune regioni le profonde modificazioni del profilo esterno, ben visibili al TEM, portano alla fusione di tratti adiacenti di epidermide (*Tav. 18, fig. E*).

DISCUSSIONI e CONCLUSIONI

5.1 Morfologia ed ultrastruttura del fegato degli esemplari di controllo

L'analisi morfologica ed ultrastrutturale condotta sugli esemplari di controllo mostra che, in *Lissotriton italicus*, l'organizzazione del fegato è molto simile a quella riportata per altre specie di Anfibi (Spornitz, 1975; Goldblatt *et al.*, 1987; Guida *et al.*, 1997; Sichel *et al.*, 1997) e di Vertebrati in genere (Hacking *et al.*, 1977; Sivarajah *et al.*, 1978; Köhler, 1990; Hugla and Thomé, 1999; Islinger, 2003).

Le nostre osservazioni rivelano uno scarso sviluppo del reticolo endoplasmatico liscio (SER) che in genere è abbondante negli epatociti; questa condizione è stata già descritta in letteratura in alcune specie di Teleostei (Chapman, 1981; Hugla and Thomé, 1999) e da Haar e Hightower (1976) nel tritone *Notophthalmus viridescens*. Tuttavia, dati discordanti riportati da Goldblatt *et al.* (1987) nella stessa specie e da Spornitz (1974) in *Xenopus laevis* documentano la presenza, all'interno delle cellule epatiche, di un SER ben sviluppato.

Dalle osservazioni condotte è inoltre emersa la presenza di numerose inclusioni lipidiche. Variazioni nell'entità dei depositi lipidici sono evidenti nei diversi campioni analizzati; questa condizione potrebbe essere stata determinata, analogamente a quanto riportato da Spornitz (1974) in *Xenopus laevis*, dallo stato metabolico e nutrizionale di ciascun individuo utilizzato nella sperimentazione.

Abbondanti depositi glicogenici sono stati spesso rilevati nel corso delle nostre indagini; tuttavia, come per le inclusioni lipidiche, non si osserva un'uniformità nell'abbondanza e nella distribuzione del glicogeno. I dati di letteratura a riguardo sono discordanti; alcuni autori riportano l'assenza di evidenti variazioni del contenuto di glicogeno anche dopo un periodo prolungato di digiuno (Athanasiu and Dragoin, 1908; Spornitz, 1974). Altri documentano, invece, una deplezione dei depositi glicogenici durante i periodi di ibernazione o di inattività di alcune specie di Anfibi tra cui *Rana temporaria* (Kremer, 1932) e *Salamandra maculata* (Berg, 1920).

5.2 Morfologia ed ultrastruttura del fegato dopo esposizione ad NPE

I nonilfenoli etossilati (NPE) sono oggi ritenuti tra i composti di maggiore rilevanza per il loro potenziale impatto a livello ambientale (Porter and Hayden, 2002; Soares *et al.*, 2008). Essi rientrano nella più vasta categoria degli "endocrine disrupting chemicals" (EDCs) insieme a numerosi composti di origine naturale o antropica, accomunati dalla capacità di interferire con le normali funzioni del sistema ormonale (Laurenzana *et al.*, 2002).

Gli studi di laboratorio (Soto *et al.* 1991, Shelby *et al.* 1996) e di campo (Tyler *et al.*, 1998) sinora condotti sugli NPE sono stati spesso volti proprio alla comprensione dei meccanismi correlati alla capacità di mimare o interferire con le funzioni estrogeniche, in particolar modo nei Pesci (Flouriot *et al.* 1995, Sumpter and Jobling 1995).

In questo lavoro vengono riportati per la prima volta i risultati di un'analisi strutturale ed ultrastrutturale del fegato di un anfibio dopo esposizione acuta a nonilfenolo etossilato.

E' noto che il trattamento con NPE determina, a livello epatico, un aumento dei livelli di espressione di enzimi ad attività ossidativa (Lee *et al.*, 1996; Laurenzana *et al.*, 2000; Masuyama *et al.*, 2000; Hasselberg *et al.*, 2004; 2005; Hernandez *et al.*, 2006) e di proteine ormono-inducibili quale la vitellogenina (Kloas *et al.*, 1999; Mosconi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2006), la cui induzione nei maschi è considerata un marker specifico di esposizione ai distruttori endocrini (Sumpter and Jobling, 1995). Tuttavia, l'analisi comparativa condotta di recente da Watanabe e collaboratori (2004) sugli effetti indotti dal nonilfenolo (NP) e dall'estradiolo sull'espressione di geni epatici, ha dimostrato che dosi elevate di NP sono in grado di attivare un maggior numero di geni rispetto all'estradiolo, mettendo così in risalto la capacità di questo contaminante di agire su pathways che non coinvolgono l'azione ormono-simile (Watanabe *et al.*, 2004). Inoltre, molti di questi geni attivati nel fegato esclusivamente dal nonilfenolo, sono coinvolti nel metabolismo lipidico e degli acidi grassi (Watanabe *et al.*, 2004).

Le osservazioni da noi condotte utilizzando concentrazioni di NPE riscontrabili in natura, mostrano una progressiva degenerazione del parenchima epatico in relazione sia alla dose testata che al tempo di esposizione. Le alterazioni nei diversi gruppi sperimentali non si diversificano nella tipologia ma solo nell'intensità e nel tempo di insorgenza.

E' interessante sottolineare che nonostante venga spesso riportata una maggiore sensibilità degli individui di sesso maschile rispetto alle femmine (Islinger *et al.*, 2003; Yang *et al.* 2008), le concentrazioni di NPE utilizzate nel presente lavoro hanno determinato l'instaurarsi di evidenti fenomeni patologici in esemplari di *Lissotriton italicus* di entrambi i sessi, dimostrando che un eccesso di contaminante produce alterazioni indipendentemente dall'originale assetto ormonale dell'individuo considerato.

L'esposizione ad NPE ha prodotto nel tessuto epatico un incremento degli accumuli lipidici, severe alterazioni a carico dei mitocondri, un ampliamento dell'estensione del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) ed un suo successivo processo di frammentazione.

Alterazioni analoghe a carico del RER sono state riportate in esemplari di *Carassius auratus* esposti a concentrazioni simili di NP (Yang *et al.* 2008); gli stessi autori hanno inoltre documentato un'iperplasia del SER ed un anomalo incremento dei lisosomi, che non sono però emersi dalle nostre analisi su *Lissotriton italicus*.

L'iniziale incremento del RER, che nel Tritone italiano si verifica già nelle prime ore di esposizione al contaminante, potrebbe rappresentare una risposta metabolica degli

epatociti alla presenza del surfattante. Come suggerito da Watanabe *et al.* (2004), l'estensione di questo organulo potrebbe essere correlata, ad un incremento della sintesi proteica.

Nei Pesci e negli Anfibi altri composti ad attività estrogenico-simile (Nicholls, 1968; Hugla and Thomé, 1999) inducono un drammatico incremento del RER, così come osservato dopo somministrazione esogena di 17 β -estradiolo (Islinger *et al.*, 2003).

Una ipertrofia del RER è inoltre riportata in Pesci esposti a contaminati differenti quali sono i bifenili policlorurati (PCB) (Hacking *et al.*, 1978).

Anche la disorganizzazione del RER, la sua frammentazione ed i fenomeni di dilatazione delle cisterne sono già stati descritti e posti in relazione ai meccanismi di detossificazione che si instaurano a livello epatico (Hacking *et al.*, 1978)..

Per quanto concerne gli evidenti fenomeni di steatosi da noi rilevati in tutti i gruppi sperimentali, sono da ritenersi associati alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Da oltre un decennio è stato dimostrato che i composti nonilfenolici sono in grado di indurre la produzione di ROS in diversi organi e tessuti (Obata and Kubota, 2000; Chitra and Mathur, 2004; Okai *et al.*, 2004; Gong and Han, 2006; El-Dakdoky and Helal, 2007; Hsieh *et al.*, 2009).

La steatosi origina da un insieme di alterazioni metaboliche quali un aumento dell'uptake lipidico e della sintesi di grassi e l'insorgenza di disfunzioni mitocondriali (Meador and Cheville, 2009). I ROS inducono infatti un incremento della permeabilità di questi organuli e il rilascio del citocromo c nel citosol, che a sua volta provoca il disaccoppiamento della respirazione mitocondriale (Meador and Cheville, 2009).

Inoltre, in letteratura è noto che gli estrogeni sono in grado di inibire la β -ossidazione (Meador and Cheville, 2009); questa condizione porta all'insorgenza di disfunzioni a carico dei mitocondri quali rigonfiamento e comparsa di inclusioni cristalline o granulari all'interno della matrice. In accordo con questi dati, in *Lissotriton italicus* risultano ben evidenti i fenomeni di "swelling" e di degenerazione del sistema di microcreste.

In generale, tutte le sostanze che aumentano la produzione di radicali liberi a livello mitocondriale rappresentano potenti epatotossine; molti di questi composti sono in grado di innescare i processi di apoptosi attraverso la produzione di elevate quantità di superossidi. Queste specie radicaliche attivano il pathway Trx2/Ask1-tioredoxina2/apoptosi che determina il processo di permeabilizzazione della membrana mitocondriale (Meador and Cheville, 2009).

In aggiunta a quanto riportato sinora, un ulteriore dato a supporto dell'instaurarsi dei fenomeni di morte cellulare programmata è fornito, a livello ultrastrutturale, dagli evidenti segni di condensazione cromatinica e dalla compromissione dell'intero sistema di endomembrane.

La cellula morente espone sulla membrana plasmatica residui di fosfatidilserina definiti segnali *eat me* (letteralmente, *mangiami*); i macrofagi, possiedono recettori specifici per questo fosfolipide di membrana e risultano responsivi alla presenza di elementi cellulari apoptotici. Questa condizione potrebbe spiegare i fenomeni di infiltrazione macrofagica che si verificano durante il trattamento con NPE e che risultano fondamentali nell'evitare l'instaurarsi di processi flogotici. Fenoglio *et al.*, (2005) hanno riscontrato in esemplari di *Rana esculenta* provenienti da raccolte d'acqua inquinata, cellule di Kupffer localizzate in prossimità della parete sinusoidale, mentre all'interno del parenchima hanno rilevato la presenza di cellule pigmentate ad attività macrofagica organizzate in cluster e contenenti, all'interno del citoplasma, granuli compatti di melanina.

5.3 Citocromo P-450 1A e 3A

Per valutare gli effetti funzionali indotti dall'esposizione ad NPE sul fegato del Tritone italiano, le variazioni di espressione delle isoforme 1A e 3A del citocromo P-450 sono state analizzate con il supporto della microscopia confocale.

Gli enzimi appartenenti a queste due subfamiglie enzimatiche sono notoriamente coinvolti nel metabolismo ossidativo di numerosi xenobionti (Nebert *et al.*, 1991; Goksøyr and Förlin, 1992; Stegeman and Hahn, 1994; Lee *et al.*, 1996; Arukwe *et al.*, 1997; Laurenzana *et al.*, 2002; Schlenk and Di Giulio, 2002; Hasselberg *et al.*, 2005; Meucci and Arukwe, 2006; Suzuki and Iwata, 2010).

I dati ottenuti dall'analisi funzionale mostrano un incremento dose-tempo dipendente nei livelli di entrambe le isoforme, lasciando supporre la presenza di uno specifico meccanismo di risposta alla penetrazione del contaminante.

In condizioni fisiologiche, infatti, i citocromi presentano bassi livelli di espressione nel fegato del Tritone italiano; l'aumento dell'intensità della fluorescenza relativa al CYP-1A ed al CYP-3A potrebbe quindi rappresentare un tentativo da parte degli epatociti di metabolizzare l'eccesso di contaminante accumulatosi a livello tissutale.

Tuttavia, i dati presenti attualmente in letteratura a supporto di questa ipotesi sono discordanti e di non facile interpretazione.

Alcuni autori riportano un incremento di espressione del CYP-1A e del CYP-3A in Pesci esposti a composti alchilfenolici e ad estrogeni (17 β -estradiolo ed etileneestradiolo); l'aumento dei livelli enzimatici è tuttavia affiancato, inaspettatamente, da una diminuzione dell'attività enzimatica (Hasselberg *et al.*, 2004; 2005)

In giovani di *Salmo salar*, il trattamento con NP (5, 15 e 50 μ g/L) determina un'induzione dei livelli di espressione delle due isoforme enzimatiche dopo 7 giorni di esposizione (Meucci and Arukwe, 2006).

In alcune specie di Mammiferi è stato dimostrato che l'NP è in grado di determinare un aumento dei livelli di CYP-3A (Masuyama *et al.*, 2000; Laurenzana *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2006) accompagnato, in alcuni casi, da una downregulation dell'attività enzimatica (Hernandez *et al.*, 2006).

E' stato dimostrato che, in alcune isoforme di citocromo P-450 l'aumento di espressione determinato dal contaminante è mediato dall'attivazione del recettore PXR (pregnane X-receptor) (Masuyama *et al.*, 2000 Suzuki and Iwata, 2010) e del recettore AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) (Smirlis *et al.*, 2001).

Suzuki e Iwata (2010) hanno recentemente descritto in *Xenopus tropicalis* il meccanismo di attivazione del recettore AHR ad opera di alcune classi di contaminanti tra cui idrocarburi alogenati aromatici e la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD): in presenza di questi composti, il recettore AHR forma un eterodimero con il traslocatore nucleare AHR (ARNT) e si lega agli elementi responsivi della diossina (DREs), a livello delle regioni regolatrici dei geni CYP.

Altri studi hanno suggerito che l'induzione genica ad opera dell'NP, coinvolge l'attivazione del recettore CAR (constitutive androstane receptor), stretto parente del recettore PXR, con un meccanismo simile a quello mediato dai fenobarbiturici (Kocarek *et al.*, 1993; Sueyoshi and Negishi, 2001, Hernandez *et al.*, 2006).

In contrasto con le informazioni sinora riportate, alcuni autori hanno invece fornito le prove dell'azione inibitoria esibita dagli xenoestrogeni e dall'NP sull'espressione delle isoforme di citocromo considerate.

Analisi immunoistochimiche condotte su Pesci trattati con 125 mg NP/kg per 14 giorni mostrano una riduzione dei livelli di assorbanza del CYP1A (18%) e di proteine simili al CYP3A (30%) (Arukwe *et al.*, 1997).

In accordo con questo dato, in giovani di *Oncorhynchus mykiss* è stato dimostrato che il trattamento con xenoestrogeni determina una riduzione nell'espressione di diverse isoforme di citocromo tra cui il CYP-3A27 (Katchamart *et al.*, 2002).

Per alcuni enzimi CYP è stato proposto che il decremento dell'attività enzimatica sia determinato da fenomeni di defosforilazione a carico delle proteine, che avvengono a livello post-traduzionale (Mann and Jensen, 2003; Oesch-Bartlomowicz and Oesch, 2003) e che sono dunque indipendenti dai fenomeni di induzione dell'espressione che si esplicano a livello genico.

Le nostre osservazioni fanno inoltre ipotizzare la presenza di un "effetto soglia" relativo all'incremento di espressione del CYP-1A e 3A in *Lissotriton italicus*: il trattamento con NPE non determina infatti variazioni nei livelli citoplasmatici delle due isoforme enzimatiche durante le prime 48 h di esposizione alla concentrazione minore, lasciando supporre che l'effetto attivatore del contaminante si verifichi solo ad alte concentrazioni o, per basse concentrazioni, solo dopo un tempo di esposizione prolungato. In maschi di

Carassius auratus, ad esempio, non si registrano effetti apprezzabili sul livello di espressione del CYP-1A per concentrazioni di nonilfenolo inferiori ai 100 µg/l (Ishibashi *et al.*, 2004).

5.4 Caspasi-3

L'aumento di espressione della caspasi-3 in *Lissotriton italicus* conferma la presenza di fenomeni apoptotici a livello del tessuto epatico, come ipotizzato durante le osservazioni ultrastrutturali. Le caspasi sono mediatori cruciali nel processo apoptotico e, tra di esse, la caspasi-3 è una delle più frequentemente attivate; questa proteasi catalizza infatti il clivaggio specifico di diverse proteine chiave nei processi di morte cellulare programmata (Nicholson *et al.*, 1995; Tewari *et al.*, 1995).

E' ormai risaputo che l'esposizione ad NP determina l'insorgenza di fenomeni apoptotici sia a livello epatico che in altri organi e tessuti (Weber *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2006; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2007; Kaptaner and Ünal, 2010), ed è stato recentemente dimostrato il coinvolgimento della caspasi-3 nell'esplicamento di questi processi (Bechi *et al.*, 2006).

L'attivazione di questa proteasi quale effettore dell'apoptosi si verifica sia nella via intrinseca o "mitochondria-mediated pathway", sia nelle vie mediate dal reticolo endoplasmatico (ER) e dal granzima B. Nella via intrinseca, gli stimoli apoptotici provocano il rilascio del citocromo c dai mitocondri al citosol (Fan *et al.*, 2001; Finkel, 2001), con conseguente formazione del complesso dell'apoptosoma a cui è legata la caspasi-9 (Acehan *et al.*, 2002). Quest'ultima effettua, a sua volta, un taglio proteolitico a livello delle caspasi effettrici 3 e 7, che avviano i processi di morte programmata. Nella via mediata dal reticolo endoplasmatico, l'attivazione della caspasi-3 è determinata dall'azione delle caspasi attivatrici 7 e 12. Nell'ultimo caso, il taglio proteolitico a carico della caspasi-3 è prodotto dal granzima B; questo processo può richiedere altri mediatori proapoptotici come il citocromo c, Smac/Diablo e Htra2/omi, che vengono rilasciati dai mitocondri (Barry *et al.*, 2000; Sutton *et al.*, 2003).

L'aumento dell'espressione della caspasi-3 può dunque essere considerato un precoce indicatore dello stress da xenobionti (Sweet *et al.*, 1999) e sottolinea l'effetto nocivo dell'esposizione ad NPE sul sistema epatico.

5.5 Morfologia ed ultrastruttura dell'epidermide degli esemplari di controllo

L'epidermide rappresenta l'interfaccia tra l'ambiente esterno all'organismo e quello interno; essa è costantemente esposta all'aggressione da parte dei contaminanti e ne rappresenta la prima barriera alla penetrazione.

Le alterazioni a carico dell'epidermide dopo trattamento con NPE appaiono meno gravi se confrontate con quelle registrate a livello epatico, anche dopo 96 h di esposizione alla concentrazione maggiore. Questa condizione è probabilmente determinata dalle proprietà intrinseche di questo tessuto, continuamente soggetto a processi di turnover cellulare.

I dati ottenuti rivelano un progressivo incremento dei ritmi di muta già nelle prime ore di esposizione al contaminante; dopo 24 h di trattamento alla concentrazione minore si osserva la presenza di cellule subcornee immature.

L'interesse per questo risultato risiede nel fatto che, in condizioni fisiologiche, immediatamente al di sotto dello strato corneo si susseguono 2-3 strati di sostituzione composti da cellule che stanno terminando il processo di appiattimento e cheratinizzazione, e che si accingono a sostituire gli elementi cellulari che verranno persi durante il processo di muta. Negli animali trattati con NPE, invece, le cellule subcornee non hanno il tempo di giungere a maturazione; questa condizione rende evidente l'incapacità del tessuto di compensare la continua perdita di cellule, soprattutto dopo prolungati tempi di esposizione.

Con il proseguire del trattamento, le cellule subcornee immature appaiono sempre più "forzate" a raggiungere gli strati esterni e diviene difficile distinguere gli elementi cellulari che nel controllo caratterizzavano i singoli strati epidermici.

Dopo 48 e 96 h di esposizione, infatti, il trattamento con NPE conferisce al tessuto un aspetto disomogeneo e si osserva la perdita della tipica stratificazione. In accordo con le nostre osservazioni, Burkhardt-Holm e collaboratori (2000) riportano in esemplari di *Oncorhynchus mykiss* esposti a NP (1 µg/l e 10 µg/l), alterazioni nel normale assetto organizzativo dell'epidermide; in particolare, nel loro lavoro sono descritti fenomeni di distacco delle cellule pavimentose, vacuolizzazione del citoplasma e deformazione nucleare (Burkhardt-Holm *et al.*, 2000).

Nel Tritone italiano si nota anche la comparsa di granuli elettronchiari nel citoplasma delle cellule degli strati più interni. Non è chiaro il ruolo di queste formazioni granulari, ma si può supporre che esse si rendano attive in un eventuale meccanismo di difesa. In *Oncorhynchus mykiss*, ad esempio, l'esposizione ad NP determina modificazioni nel pattern di granulazione delle cellule mucose (Burkhardt-Holm *et al.*, 2000). L'epidermide di *Lissotriton italicus* è tuttavia priva di questa tipologia cellulare e i fenomeni secretori si verificano ad opera delle ghiandole dermiche. Le osservazioni condotte al SEM mostrano però un progressivo incremento dei fenomeni di secrezione mucosa; questa condizione potrebbe rappresentare un tentativo da parte del tessuto di limitare la penetrazione del

contaminante e di lubrificare una superficie che nel tempo appare sempre più ispessita e disidratata.

Negli Anfibi è infatti noto il ruolo dell'epidermide nei meccanismi di osmoregolazione e respirazione; in condizioni fisiologiche, una moderata secrezione mucosa favorisce gli scambi gassosi e protegge il tessuto dalla disidratazione e da eventuali traumi meccanici. Tuttavia, il drammatico incremento della copertura mucosa potrebbe compromettere seriamente le normali attività di scambio gassoso, e determinare l'istaurarsi di fenomeni di ipossia.

Attualmente in letteratura scientifica gli studi sulle alterazioni indotte dall'esposizione ad NPE sull'epidermide di Anfibi sono quasi nulli. Park e collaboratori (2010) riportano anomalie nel normale pattern di pigmentazione dell'epidermide caudale di girini di *Bombina orientalis* dopo esposizione ad NP; questi dati non sono tuttavia utilizzabili per un confronto con le alterazioni da noi descritte e lasciano aperta l'esigenza di approfondire l'argomento.

TAVOLE

Leggenda

- Epatociti: E
- Capillari sinusoidi: S
- Dotti biliari: DB
- Sistemi giunzionali: punta di freccia (►)
- Reticolo endoplasmatico rugoso: RER
- Glicogeno: gl
- Lipidi: l
- Cellule endoteliali: En
- Spazio di Disse: SD
- Cellule pigmentate: CP
- Cellule di Kupffer: CK
- Mitochondri: m
- Spazi intercellulari: stella (✦)
- Nucleo: n
- Lamina basale: LB
- Strato germinativo o basale: SB
- Strato Spinoso: SS
- Strato granuloso: SG
- Strato corneo: SC
- Granuli elettrondensi: g
- Tubercolo corneo: T
- Sbocco ghiandolare: GH
- Melanocita: M
- Flask cell: FC
- Cellula di Merkel: CM
- Cellula subcornea immatura: asterisco (*)
- Granuli elettronchiari: freccia (→)

Tavola 1

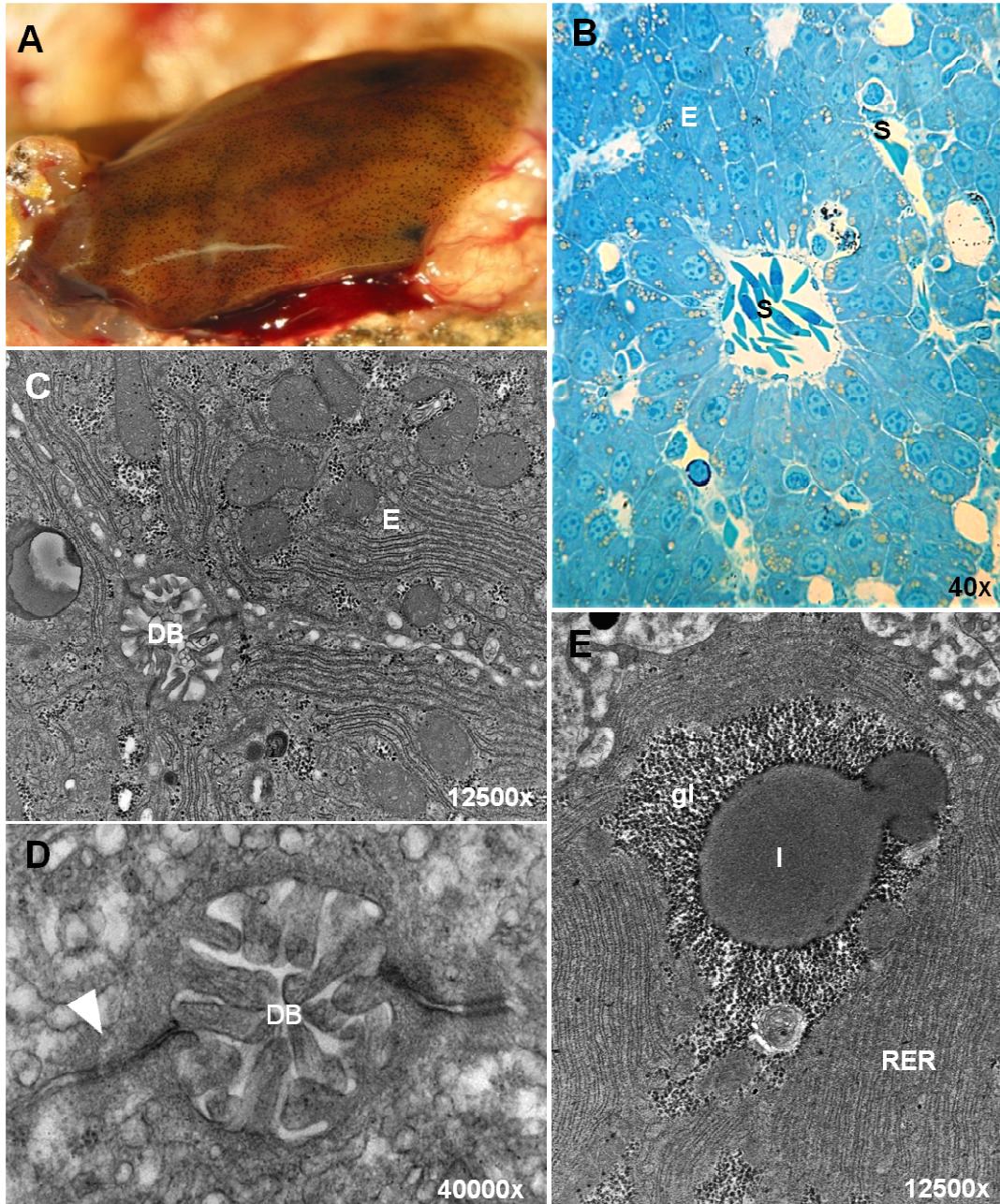


Tavola 2

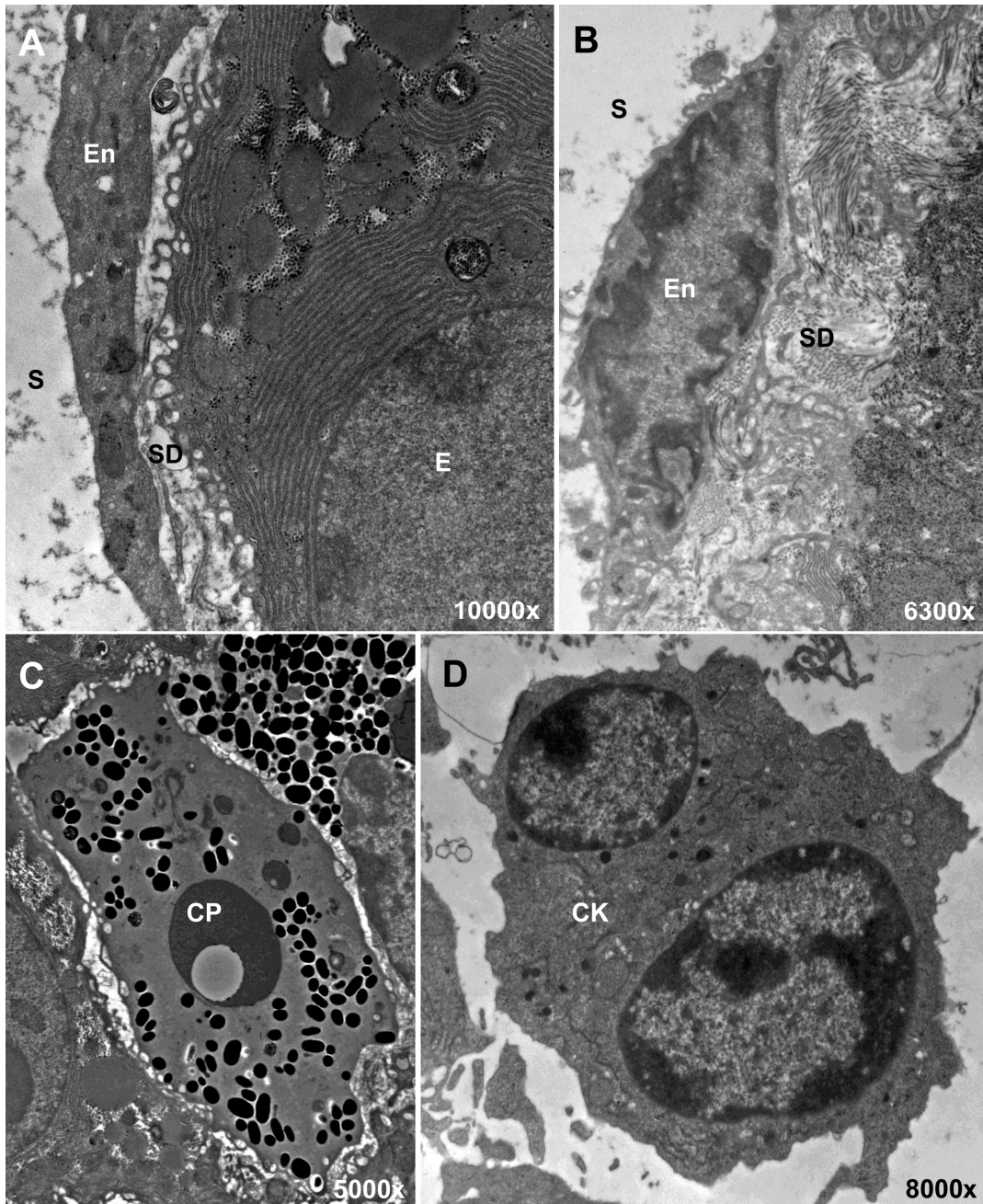


Tavola 3

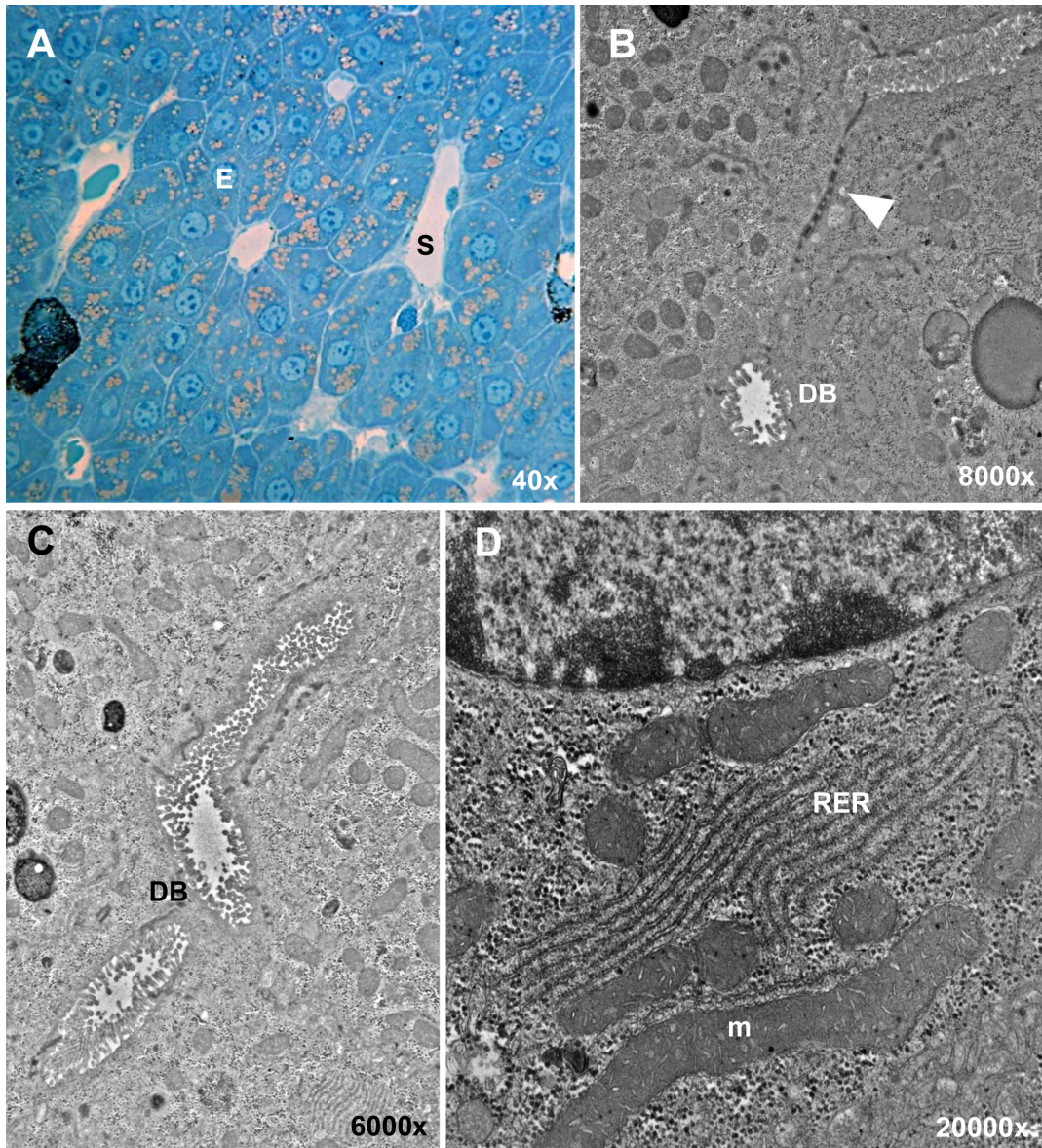


Tavola 4

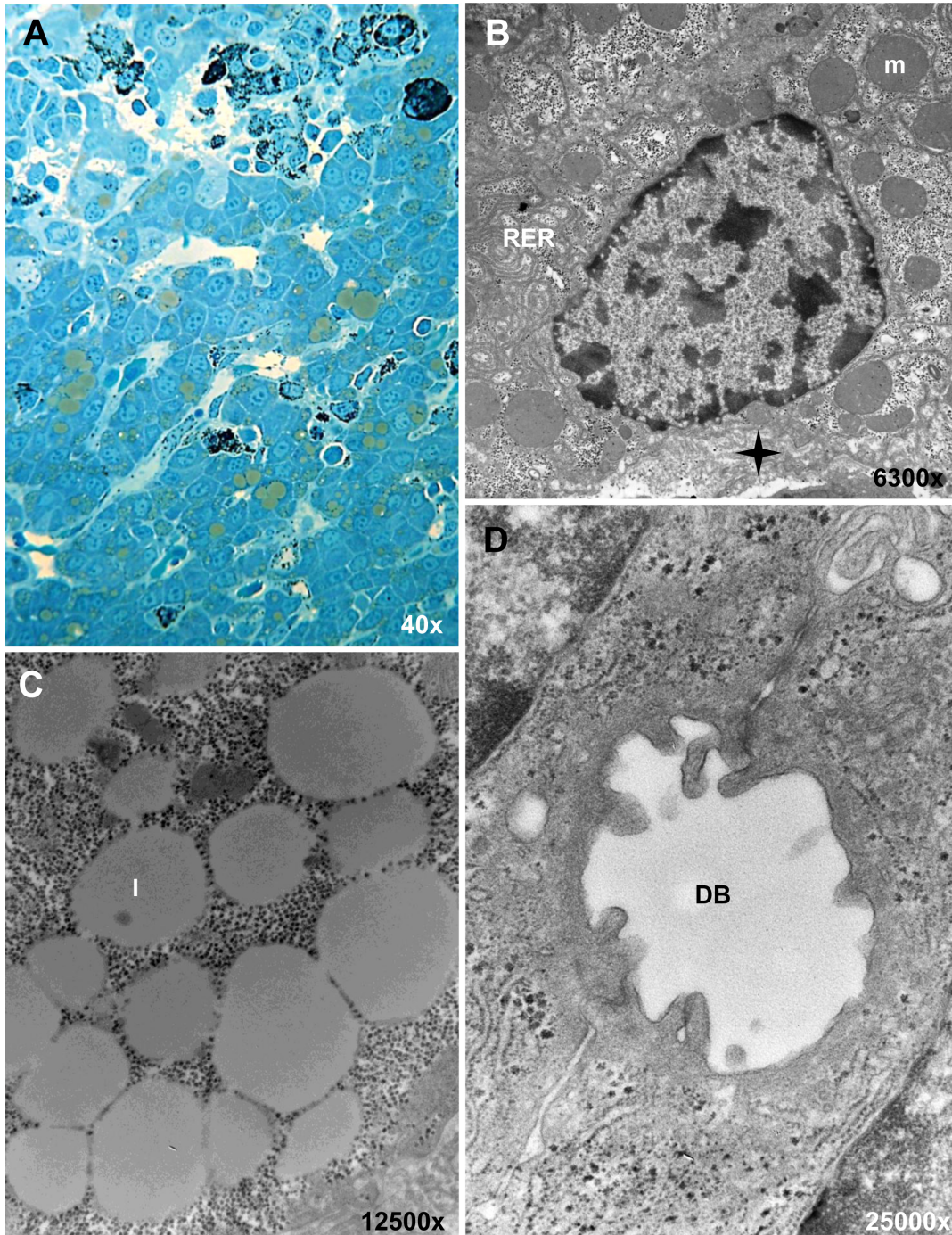


Tavola 5

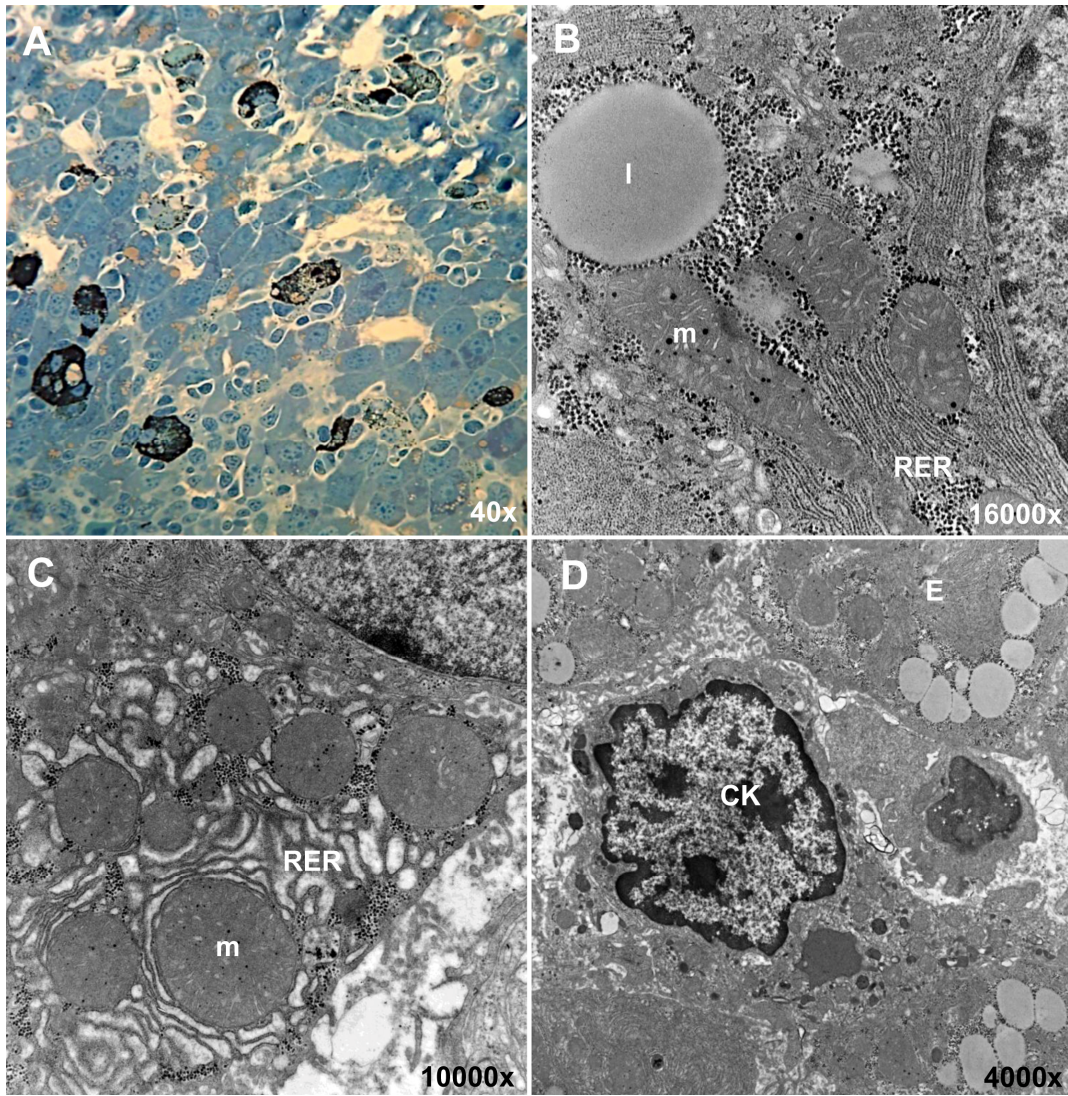


Tavola 6

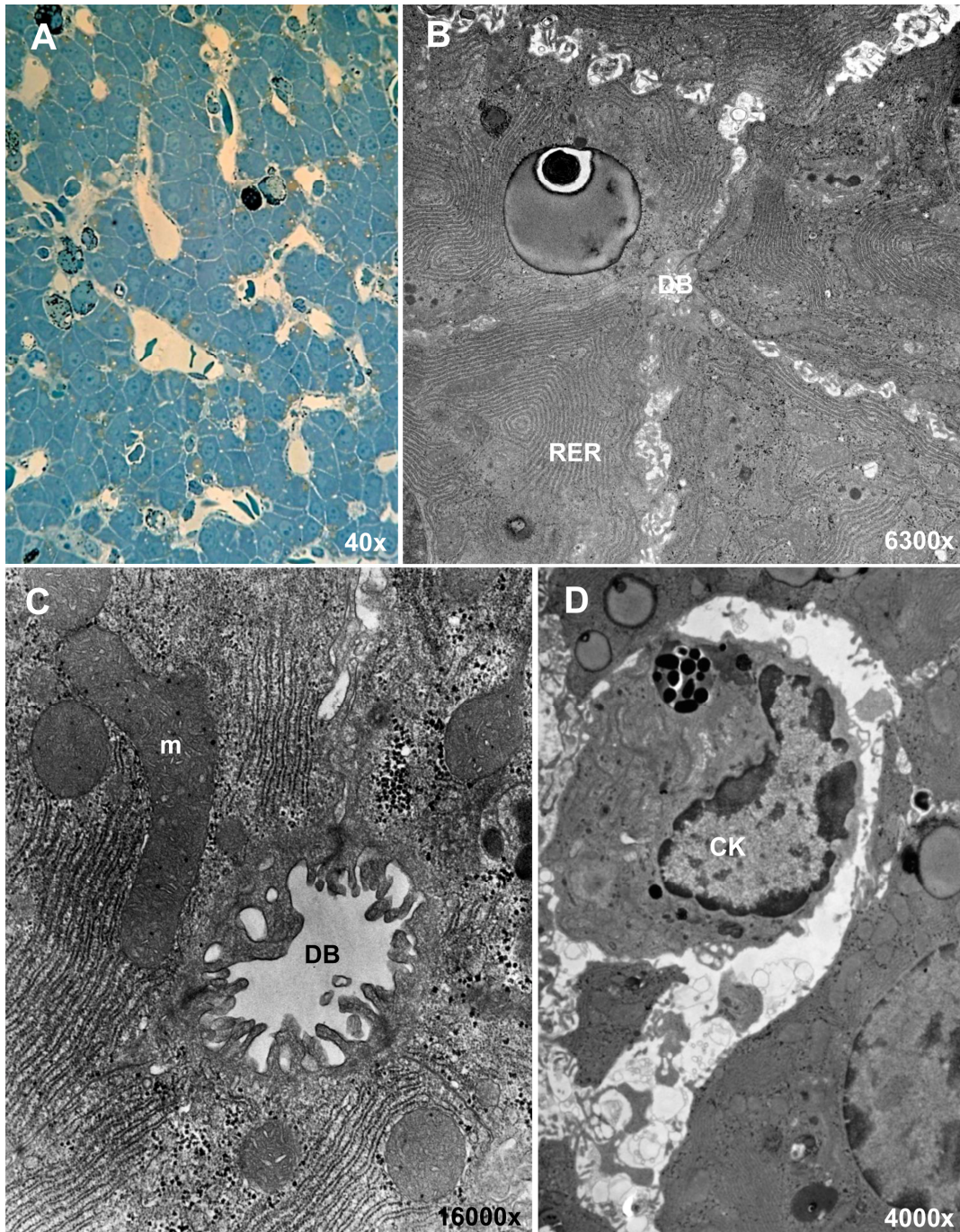


Tavola 7

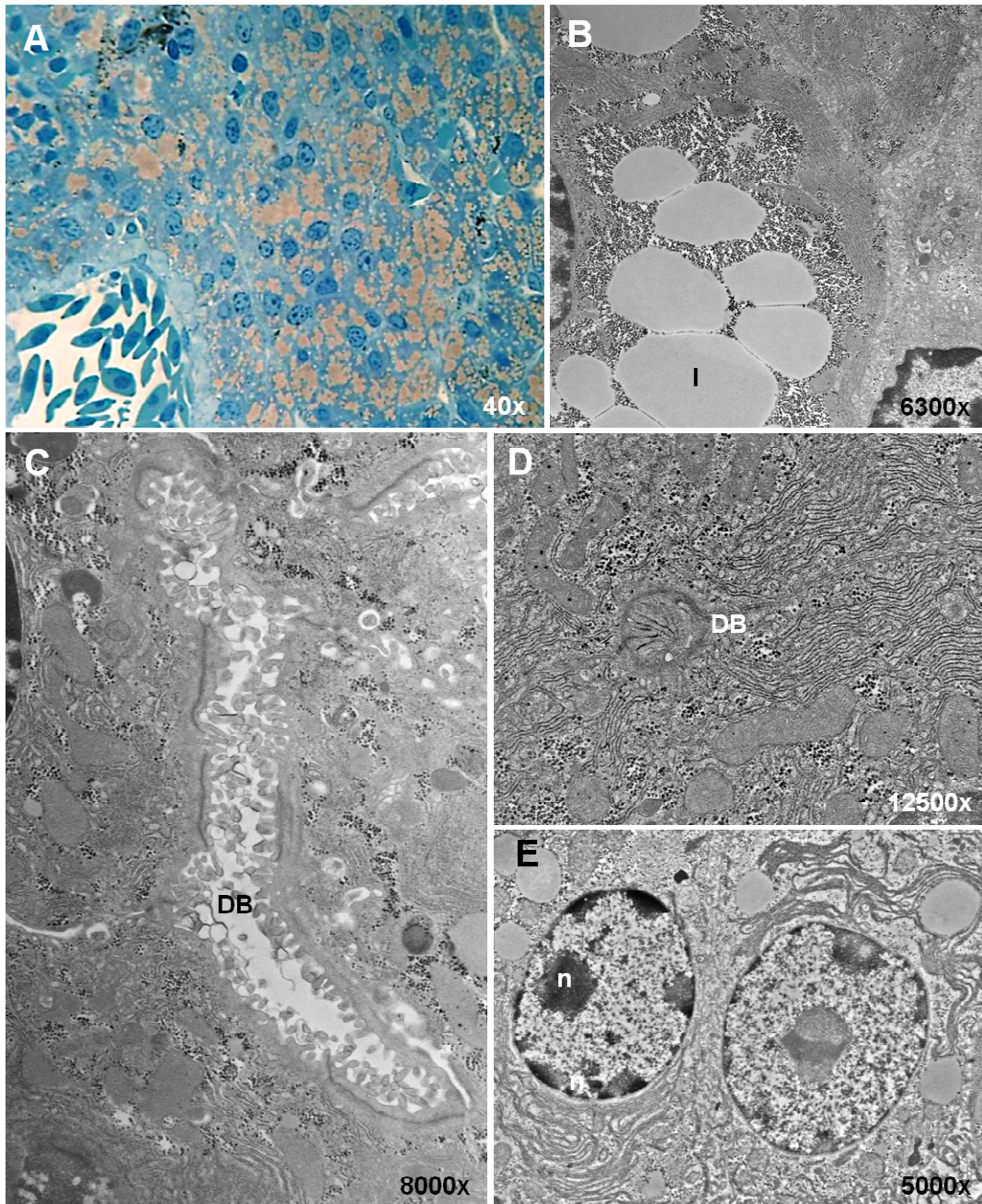


Tavola 8

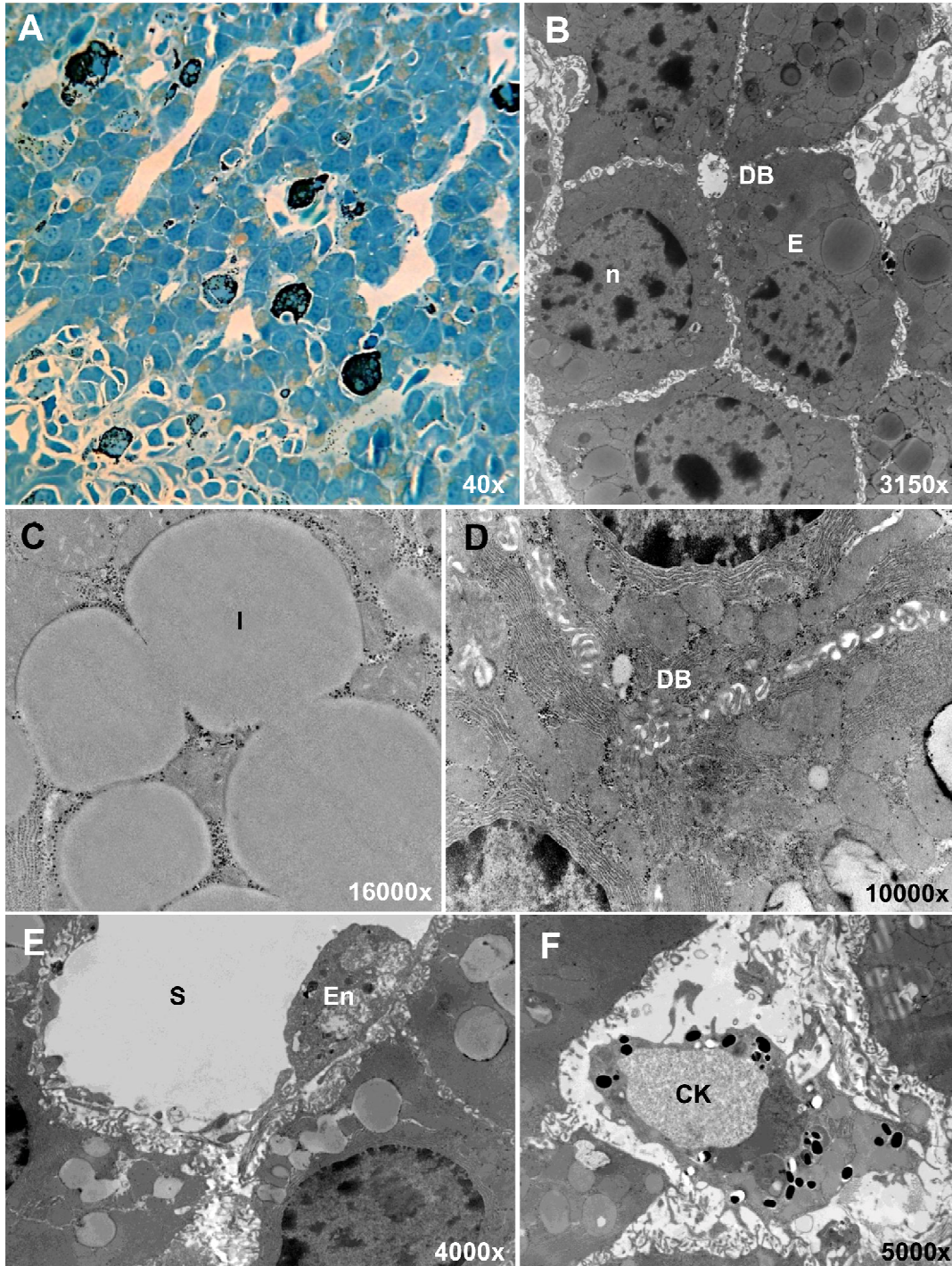


Tavola 9

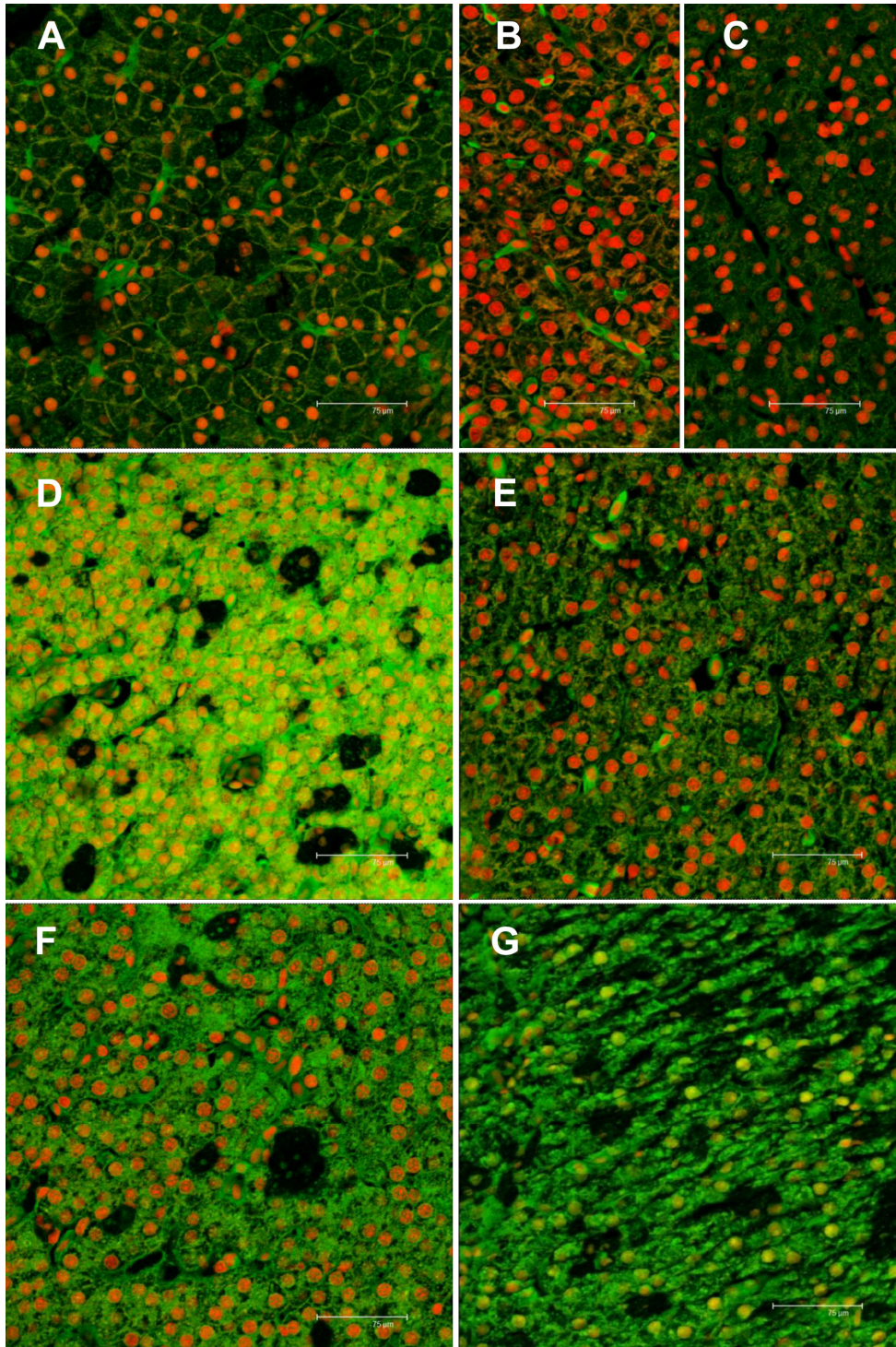


Tavola 10

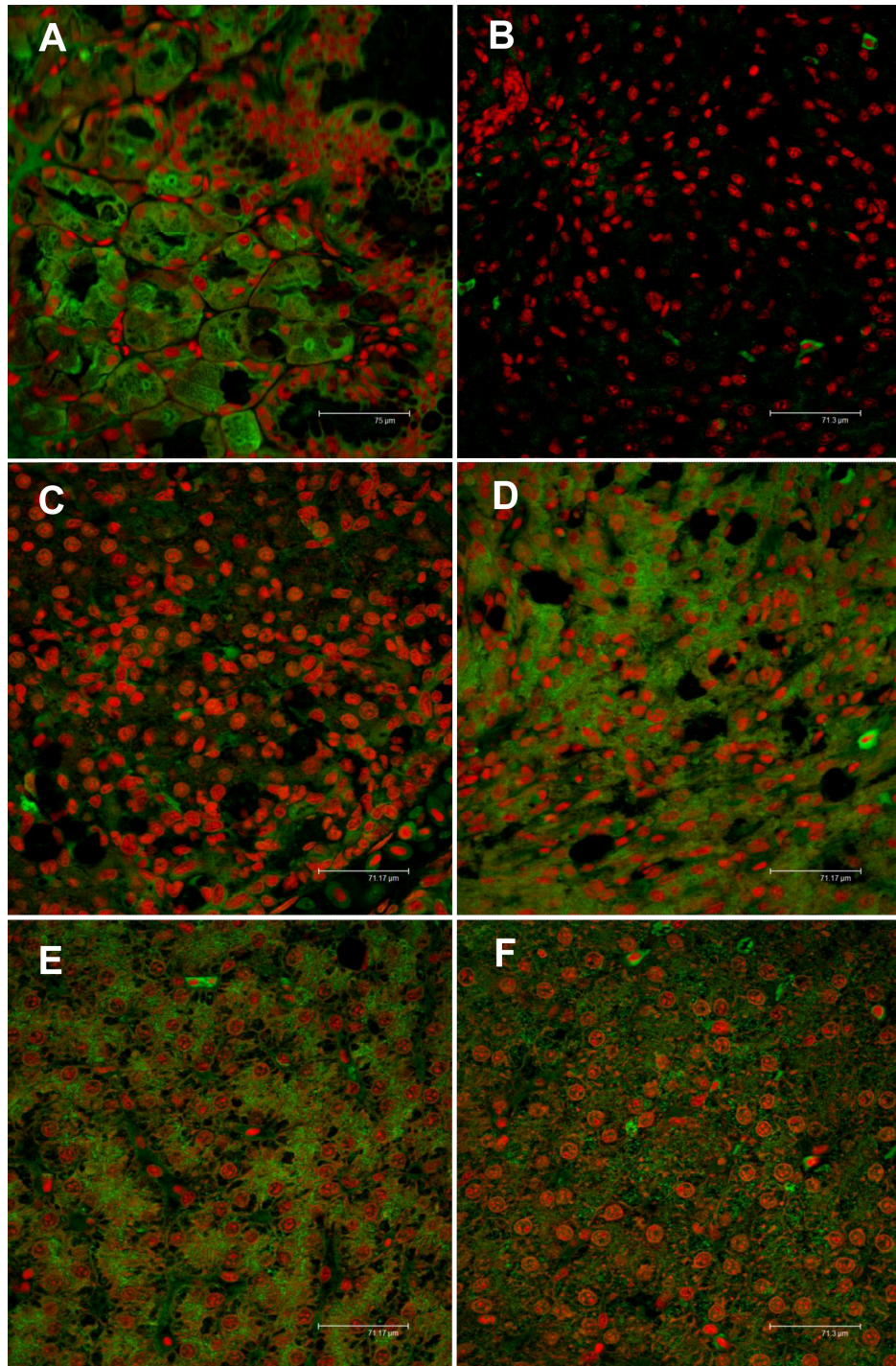


Tavola 11

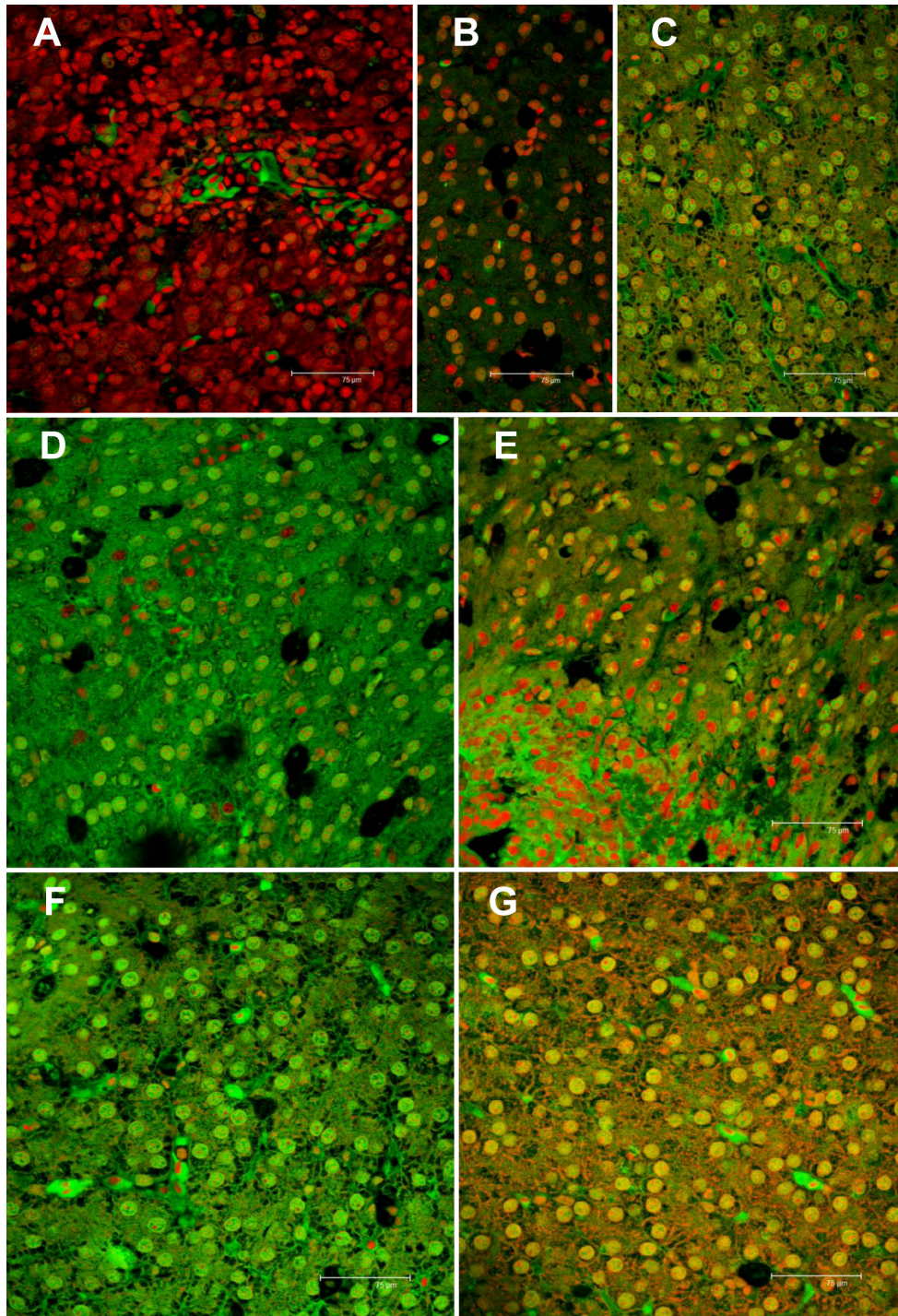


Tavola 12

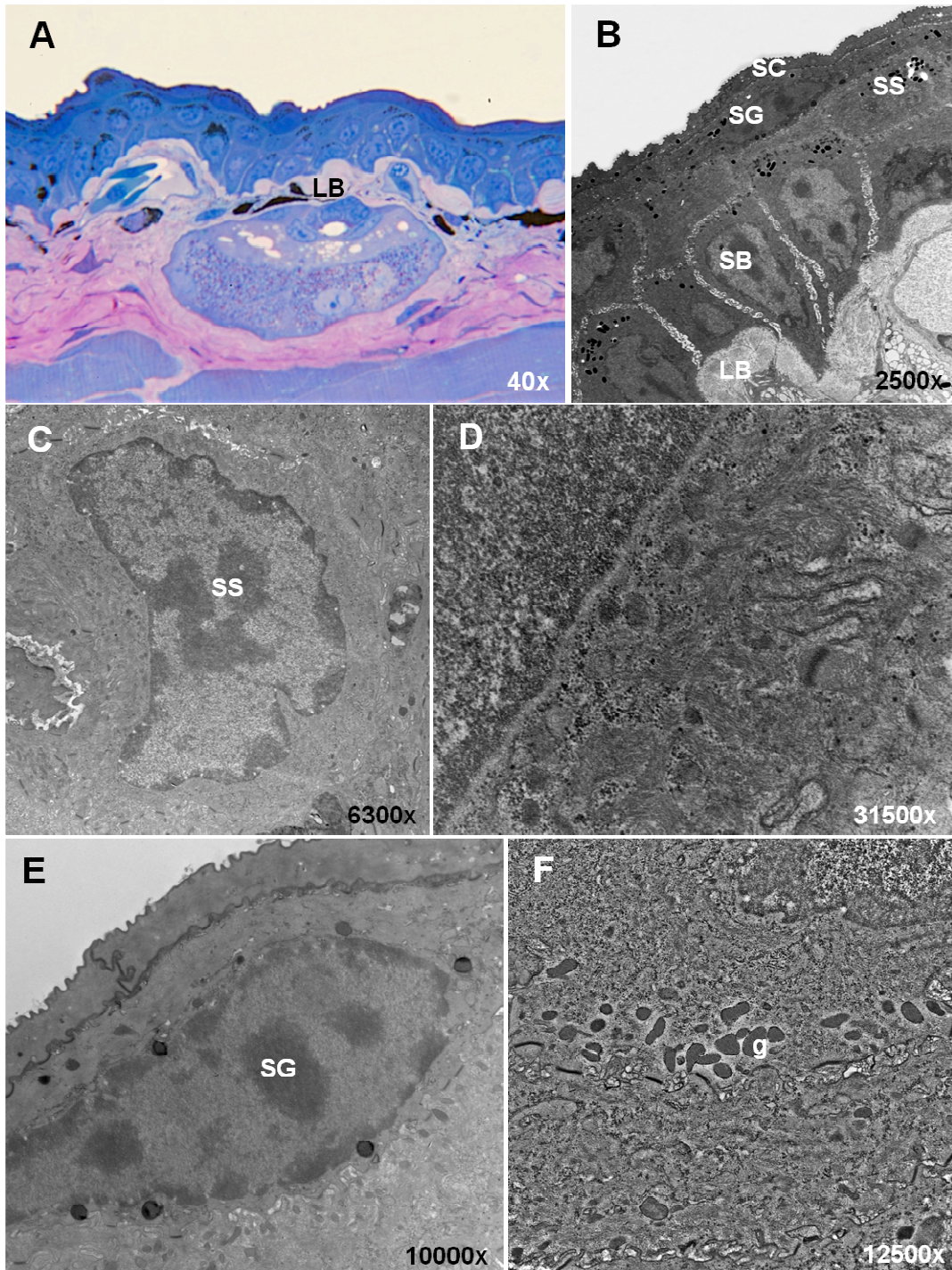


Tavola 13

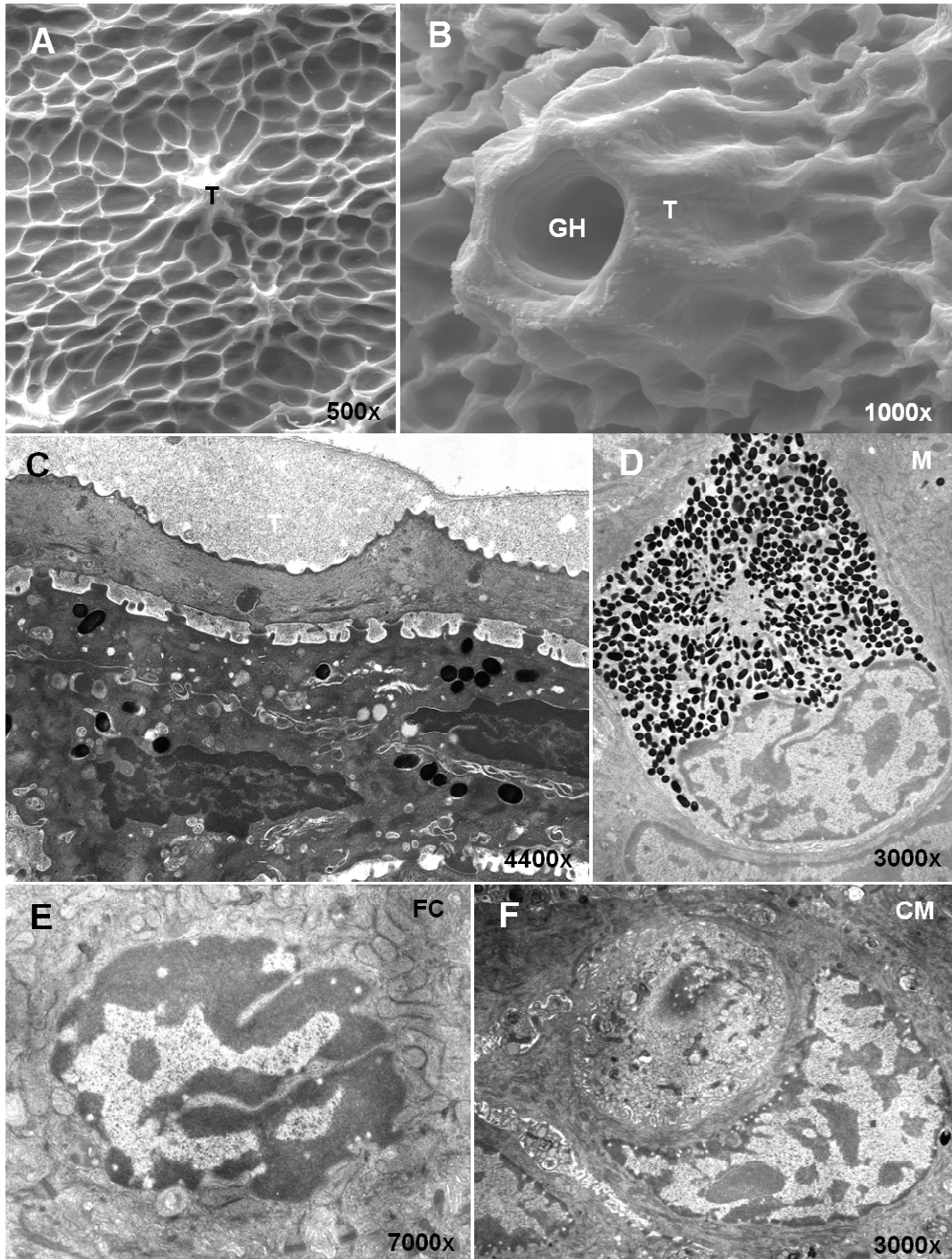


Tavola 14

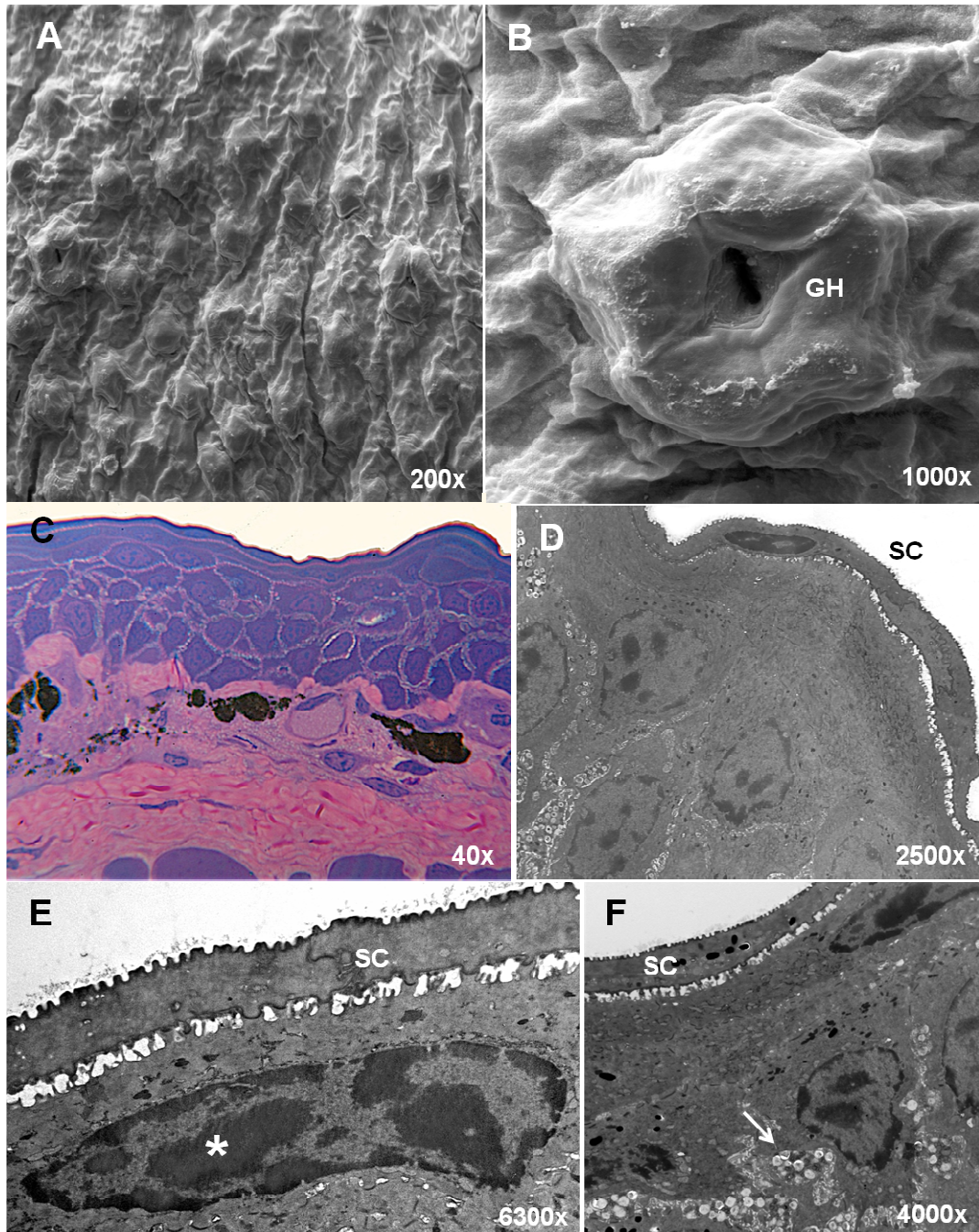


Tavola 15

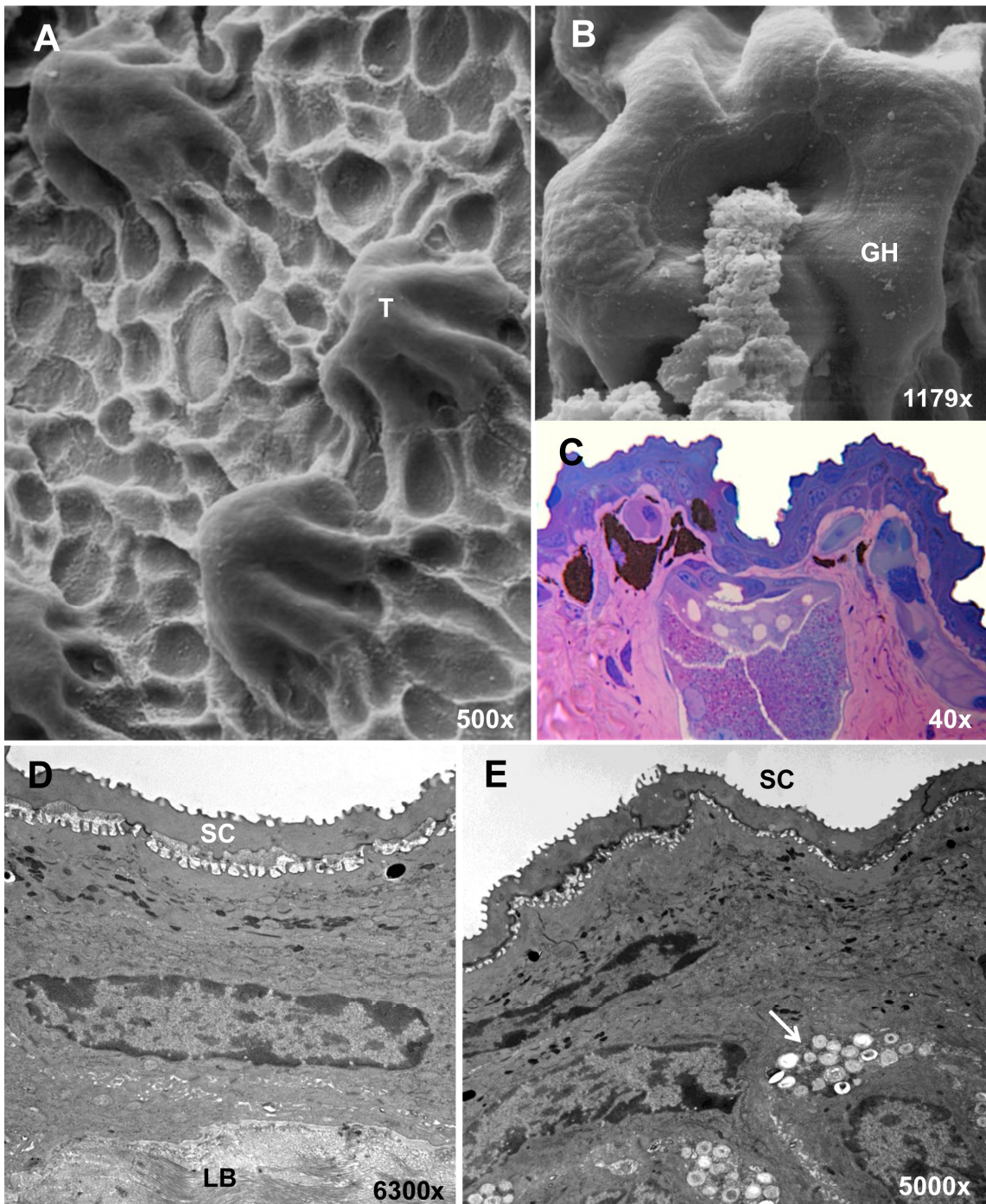


Tavola 16

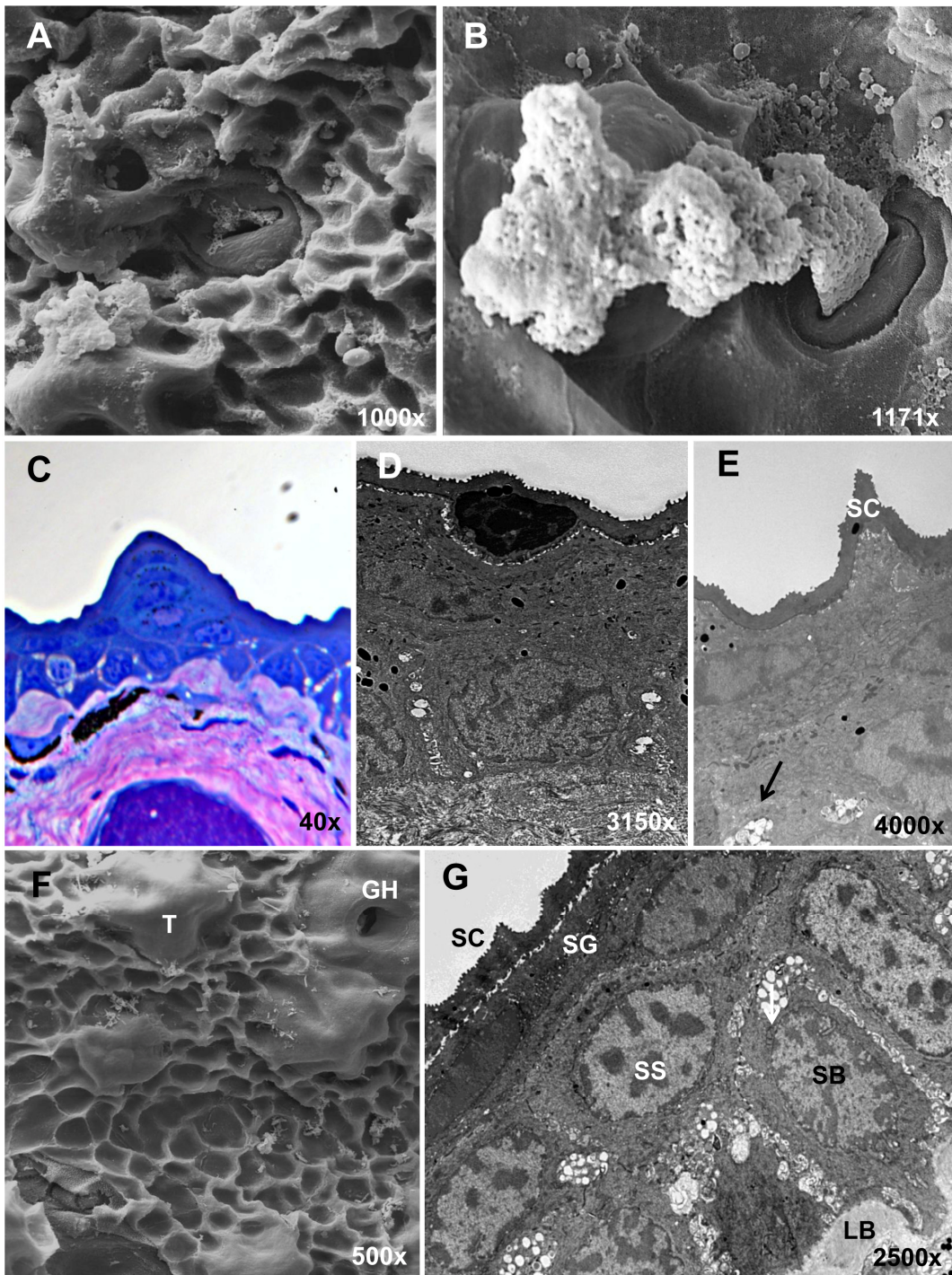


Tavola 17

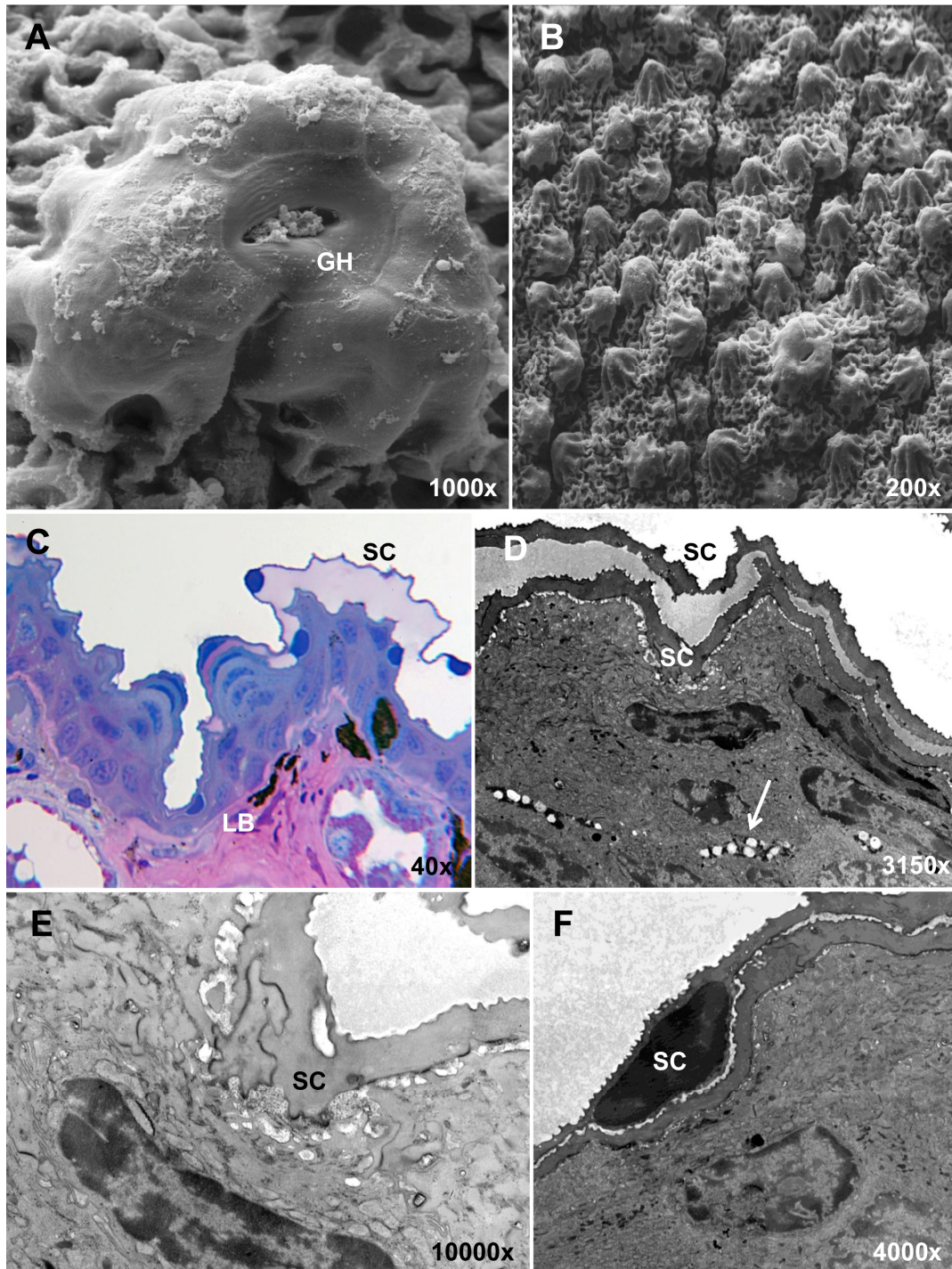
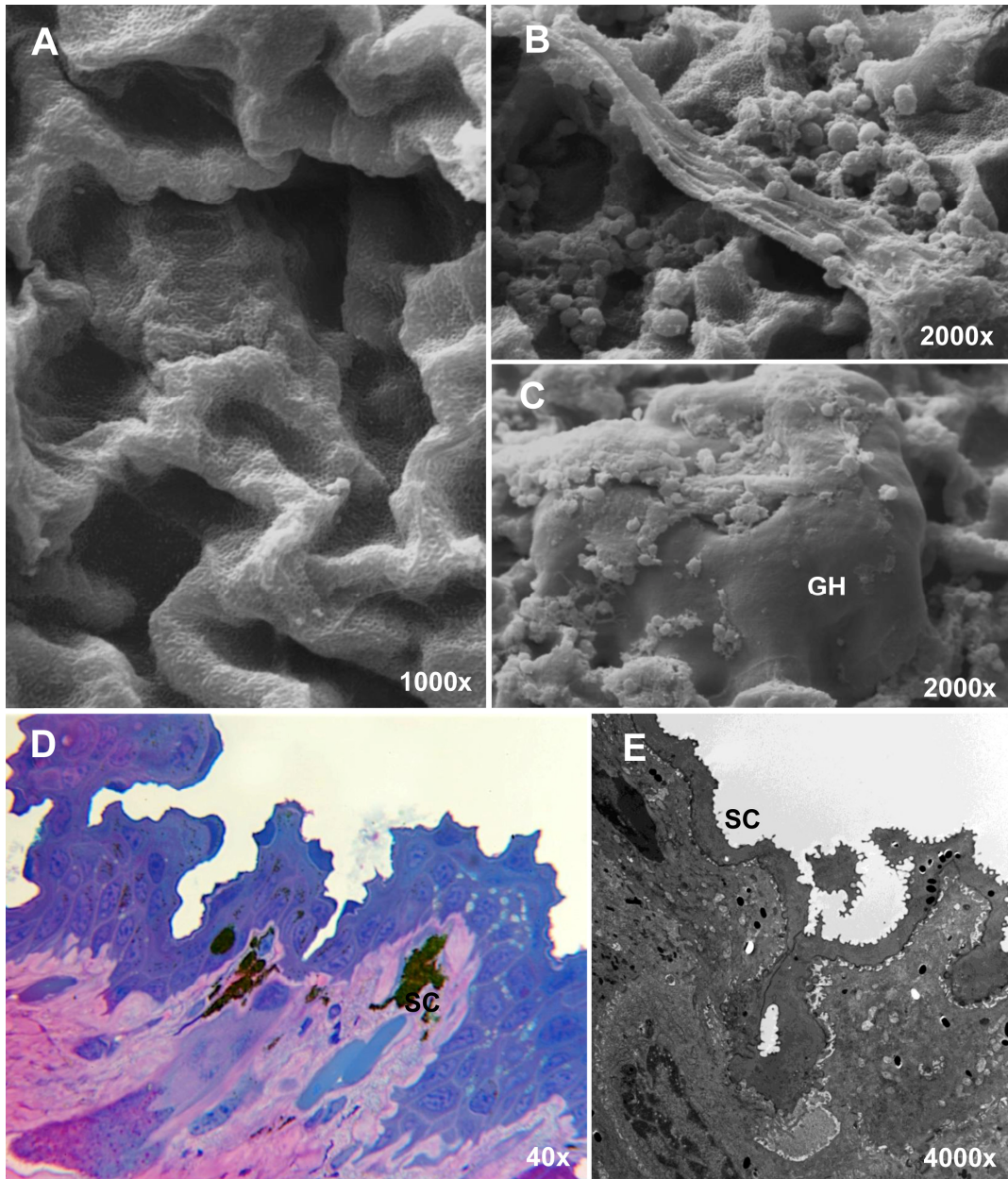


Tavola 18



BIBLIOGRAFIA

Acehan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J.E., Wang X., Akey C.W., 2002. Threedimensional structure of the apoptosome. Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell.* 9, 423-432.

Ahel M. and Giger W., 1993a. Aqueous Solubility of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates. *Chemosphere* 26, 1461-1470.

Ahel M. and Giger W., 1993b. Partitioning of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates Between Water and Organic Solvents. *Chemosphere* 26, 1471-1478.

Ahel M., Giger W., Koch M., 1994b. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment 2. Occurrence and transformation in rivers. *Water Res.* 28, 1143-1152.

Ahel M., Scully F.E. Jr., Hoigne J., Giger W., 1994c. Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. *Chemosphere* 28, 1361-1368.

Ahel M., Schaffner C., Giger W., 1996. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment: III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Res.* 30 (1), 37-46.

Ahel M., Molnar E., Ibric S., Giger W., 2000. Estrogenic metabolites of alkylphenol polyethoxylates in secondary sewage effluents and rivers. *Water Sci. Technol.* 42 (7-8), 15-22.

Alberts E., Kalverboer A.F., Hopkins B., 1983. Mother infant dialog in the first days of life an observational study during breast-feeding. *J. Child Psychol. Psyc.* 24, 145-61.

Aoki M., Kurasaki M., Saito T., Seki S., Hosokawa T., Takahashi Y., Fujita H., Iwakuma T., 2004. Nonylphenol enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. *Life Sci.* 74, 2301-2312.

Arukwe A., Förlin L., Goksøyr A. 1997. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2576-2583.

Arukwe A. and Røe K., 2008. Molecular and cellular detection of expression of vitellogenin and zona radiata protein in liver and skin of juvenile salmon (*Salmo salar*) exposed to nonylphenol. *Cell Tissue Res.* 331, 701-712.

Ashley J.T.F., Moore A., Stapleton H.M., Velinsky D.J., Wilhelm M.P., 2003. Sedimentary Nonylphenol Contamination in an Urbanized, Industrialized Segment of the Delaware River Estuary, USA. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 978-984.

Athanasiu J. and Dragoin T., 1908. La distribution de la grasse dans le corps de la gronouille pendant l'hiver. *C. R. Soc. de Biol. (Paris)* 64, 191-192.

Bachmann K., 1969. Temperature adaptations of amphibians embryos. *Amer. Nat.* 103, 115-130.

Barber L.B., Brown G.K., Zaugg S.D., 2000. In *Analysis of Environmental Endocrine Disruptors*; Keith L. H., Jones-Lepp T. L., Needham L. L., Eds.; ACS Symposium Series 747; American Chemical Society: Washington, DC, 97-123.

Barry M., Heibin J.A., Pinkoski M.J., Lee S.F., Moyer R.W., Green D.R., Bleackley R.C., 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol. Cell Biol.* 20, 3781-3794.

Bechi N., Ietta F., Romagnoli R., Focardi S., Corsi I., Buffi C., Paulesu L., 2006. Estrogen-Like Response to p-Nonylphenol in Human First Trimester Placenta and BeWo Choriocarcinoma Cells. *Toxicol. Sci.* 93(1), 75-81.

Beebee T.J.C. and Griffiths R.A., 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biol. Conserv.* 125, 271-285.

Beklioglu M., Akkas S. B., Ozcan H.E., Bezirci G., Togan I., 2010. Effects of 4-nonylphenol, fish predation and food availability on survival and life history traits of *Daphnia magna* straus. *Ecotoxicology* 19, 901-910.

Bennett E.R. and Metcalfe C.D., 1998. Distribution of alkylphenol compounds in Great Lakes sediments, United States and Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1230-5.

Berg W., 1920. Über funktionelle Leberzellstrukturen. 1. Die Leberzelle von *Salamandra maculata* während des Zustandes der guten Ernährung und des Hungers. Die Einwirkung von Fütterung und die Beförderung der Gallenabscheidung bei Hungertieren. *Arch. mikr Anat.* 94, 518-567.

Blackburn M.A. and Waldock M.J., 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Res.* 29, 1623-1629.

Blaustein, A.R. and Kiesecker, J.M., 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecol. Lett.* 5, 597-608.

Blaustein A.R. and Wake D.B., 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends Ecol. Evol.* 5, 203-204.

Blaustein A.R., Romansic J.M., Kiesecker J.M., Hatch A.C., 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Divers. Distrib.* 9, 123-140.

Bögi C., Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Steineck C., Sinowatz F., Kalbfus W., Negele R.D., Lutz I., Kloas, W., 2003. Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*. *Environ. Res.* 93, 195-201.

Bologna M.A., Capula M., Carpaneto G.M., 2000. Anfibi e rettili del Lazio. Fratelli Palombi Editori, Roma, 160 pp.

Bolzern A.M., De Bernardi F., Groppelli S., Pennati R., Sotgia C., 1999. Omologia tra l'organo adesivo degli Anfibi Anuri e i bilancieri degli Anfibi Urodela. In: S. Tripepi (ed.): Atti II° Convegno Nazionale "Societas Herpetologica Italica" (Praia a Mare, 6-10 ottobre 1998), *Rivista di Idrobiologia* 38 1/2/3, 27-32.

Bortner C.D. and Cidlowski J.A., 1996. Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am. J. Physiol.* 40C, 950-961.

Bridges C.M., Dwyer F.J., Hardesty D.K., Whites D. W., 2002. Comparative contaminant toxicity: are Amphibian larvae more sensitive than fish? *B. Environ. Contam. Tox.* 69, 562-569.

Brooke, L. and Thursby G., 2005. Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol. Washington DC, USA: Report for the United States EPA, Office of Water, Office of Science and Technology.

Brown H.A., 1976. The time-temperature relation of embryonic development in the northwestern salamander, *Ambystoma gracile*. Can. J. Zool., 54, 552-558.

Bucci-Innocenti S., Ragghianti M., Mancino G., 1983. Chromosome and C-heterochromatin polymorphism in the Italian newt, *Triturus italicus*. Chromosoma (Berl.) 88, 208-215.

Buhler D.R. and Wang-Buhler J.L., 1998. Rainbow trout cytochrome P450s: Purification, molecular aspects, metabolic activity, induction, and role in environmental monitoring. Comp. Biochem. Physiol. C 121, 107-137.

Burkhardt-Holm P., Wahli T., Meier W., 2000. Nonylphenol affects the granulation pattern of epidermal mucous cells in Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Ecotox. Environ. Safe. 46, 34-40.

Cakal Arslan O. and Parlak H., 2007. Embryotoxic effects of nonylphenol and octylphenol in sea urchin *Arbacia lixula*. Ecotoxicology 16, 439-444.

Campbell P. 2002. Alternatives to nonylphenol ethoxylates. Review of toxicity, biodegradation & technical-economic aspects. ToxEcology Environmental Consulting, Vancouver, B.C., Canada. Report for Environment Canada.

Carey C. and Bryant C.J., 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. Environ. Health Perspect. 103, 13-17.

Casini S., Fossi M. C., Mori G., Bjornstad A., 2002. Vitellogenin induction in *Cyprinus carpio* treated with 17 β -estradiol and 4-nonylphenol. Environ. Monit. Assess. 75, 235-239.

Chapman G.B., 1981. Ultrastructure of the liver of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish Biol. 18, 553-567.

Chen T.C. and Yeh Y.L., 2010. Ecological Risk, Mass Loading, and Occurrence of Nonylphenol (NP), NP Mono-, and Diethoxylate in Kaoping River and its Tributaries, Taiwan. Water Air Soil Pollut. 208, 209-220

Chitra K.C., Latchoumycandane C., Mathur P.P., 2002. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. Arch. Toxicol. 76, 545-551.

Chitra K.C. and Mathur P.P., 2004. Vitamin E prevents nonylphenol-induced oxidative stress in testis of rats. Indian J. Exp. Biol. 42, 220-223.

Chowdhury I., Tharakan B., Bhat G.K., 2008. Caspases – An update. Comp. Biochem. Phys. B 151, 10-27.

Coons A. H., Leduc E. H., Connolly J. M., 1995. Studies on antibody: I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. J. Exp. Med. 102, 49-59.

Corsi S.R., Zitomer D.H., Field J.A., Cancilla D.A., 2003. Nonylphenol ethoxylates and other additives in aircraft de-icers, anti-icers, and waters receiving airport runoff. Environ. Sci. Technol. 37, 4031-4037.

Creagh E.M. and Martin S.J., 2001. Caspases: cellular demolition experts. Biochem. Soc. T. 29, 696-702.

Dachs J., Van Ry D., Eisenreich S., 1999. Occurrence of Estrogenic Nonylphenols in the Urban and Coastal Atmosphere of the Lower Hudson River Estuary. Environ. Sci. Technol. 33, 2676-2679.

Danielson P., 2002. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. Curr. Drug Metab. 3 (6), 561-97.

Davidson C., Shaffer H.B., Jennings M.R., 2001. Declines of the California red-legged frog: climate, UVB, habitat and pesticides hypothesis. Ecol. Appl. 11, 464-479.

Davidson C., Shaffer H.B., Jennings M.R., 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. Conserv. Biol. 16, 1588-1601.

Denault J.B. and Salvesen G.S., 2002. Caspases: keys in the ignition of cell death. Chem. Rev. 102, 4489-4500.

Denton J., 1990. Defense reflex in newts of the genus *Triturus*. Br. Herpetol. Soc. Bull. 32, 30.

Di Corcia A. and Samperi R., 1994. Monitoring aromatic surfactants and their biodegradation intermediates in raw and treated sewages by solid-phase extraction and liquid chromatography. Environ. Sci. Technol. 28, 850-858.

Direttiva 2000/60/EC, 2000. Establishment and framework for community action in the field of water policy. Luxembourg, Luxembourg; European Parliament and the Council of the European Union.

Direttiva 2003/53/EC, 2003. Amending for the 26th time the Council directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement). Luxembourg, Luxembourg; European Parliament and the Council of the European Union.

Dodds E.C. and Lawson W. 1938. Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. Proc. Royal Soc. Lon. B. 125, 222-232.

Drèze V. and Monod G., 2000. Effects of 4-Nonylphenol on Sex Differentiation and Puberty in Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). Ecotoxicology 9, 93-103.

Dwyer F.J., Sappington L.C., Buckler D.R., Jones S.B., 1995. Use of surrogate species in assessing contaminant risk to endangered and threatened species. National Technical Information Service, Springfield, VA, pp. 71.

Dwyer F.J., Hardesty D.K., Henke C.E., Ingersoll C.G., Whites D.W., Mount D.R., 1999a. Assessing contaminant sensitivity of endangered and threatened species: Toxicant

classes (EPA/600/R-99/098). United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H., 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383-424.

Eberstadt M., Huang B., Chen Z., Meadows R.P., Ng S.C., Zheng L., Lenardo M.J., Fesik S.W., 1998. NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature* 392, 941-945.

Ekelund R., Granmo A., Magnusson K., Berggren M., 1993. Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment. *Environ. Pollut.* 79, 59-61.

El-Dakdoky M.H. and Helal M.A., 2007. Reproductive toxicity of male mice after exposure to nonylphenol. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 79, 188-191.

European Commission, 2001. Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. *Official J. European Commun. L* 331, 1-5.

Fan T.J., Xia L., Han Y.R., 2001. Mitochondrion and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)* 33, 7-12.

Fenoglio C., Boncompagni E., Fasola M., Gandini C., Comizzoli S., Milanese G., Barni S., 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotox. Environ. Safe.* 60, 259-268.

Ferguson P.L. and Brownawell B.J., 2003. Degradation of nonylphenol ethoxylates in estuarine sediment under aerobic and anaerobic conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1189-1199.

Ferrara F., Fabietti F., Delise M., Piccioli Bocca A., Funari E., 2001. Alkylphenolic Compounds in Edible Molluscs of the Adriatic Sea (Italy). *Environ. Sci. Technol.* 35, 3109-3112

Finkel E., 2001. The mitochondrion: Is it central to apoptosis? *Science* 292, 624-626.

Fischer U., Jänicke R.U., Schulze-Osthoff K., 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 10, 76-100.

Flouriot G., Pakdel F., Ducouret B., Valotaire Y., 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *J. Mol Endocrinol.* 15, 143-151.

Fuka T. and Pitter P., 1980. Relation between molecular structure and biodegradability of organic compounds. *Sc. VSChT F* 23, 5-45.

Gallien L. and Bidaud O., 1959. Table cronologique de development chez *Triturus helveticus* Razoumovsky. *Bull. Soc. Zool. France* 84, 22-31.

Garnier D. H., 1985. Androgen and estrogen levels in the plasma of *Pleurodeles waltl*, Michah., during the annual cycle II. Female cycle. *Gen. Comp. Endocr.* 60, 414-418.

George S.G. 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In D.C. Malins and G.K. Ostrander, eds., *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. CRC, Boca Raton, FL, USA, pp. 37-85.

Giacoma C., 1988. The ecology and distribution of newts in Italy. *Annuar. Ist. Mus. Zool. Univ. Napoli XXVI*, 49-84.

Giacoma C., Marzona E., Seglie D., 2003. Ambiente montano e modificazioni fenotipiche in un vertebrato pecilotermo, *Triturus alpestris*. *Atti 64° UZI, Varese (21-25 settembre 2003)*, 30.

Giger W., Brunner P.H., Schaffner C., 1984. 4-nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*, 225, 623-625.

Goldblatt P.J., Hampton J.A., DiDio L.N., Skeel K.A., Klaunig J.E., 1987. Morphologic and Histochemical Analysis of the Newt (*Notophthalmus viridescens*) Liver. *The Anat. Rec.* 217, 328-338.

Gong Y. and Han X.D., 2006. Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reprod. Toxicol.* 22, 623-630.

Goksøyr A. and Förlin L., 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* 22, 287-312.

Gray L.E. Jr., Ostby J., Wilson V., Lanbright C., Bobseine K., Hartig P., Hotchkiss A., Wolf C., Furr J., Price M., Perks L., Cooper R.L., Stoker T.E., Laws S.C., Degtz S.J., Jensen K.M., Kahl M.D., Korte J.J., Makynen E.A., Tietge J.E., Ankley G.T., 2002. Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing: filling key data gaps. *Toxicology* 181-182, 371-382.

Greek B.F. and Layman P.L., 1989. Higher costs spur new detergent formulations. *Chem. Engng. News* 23, 29-49.

Griffiths R. A., 1981. Physical abnormalities and accessory limb growth in the smooth newt, *Triturus vulgaris*. *Br. J. Herpetol.* 6, 180-182.

Griffiths R.A., 1985. Diel profile of behaviour in the smooth newt, *Triturus vulgaris* (L): an analysis of environmental cues and endogenous timing. *Anim. Behav.* 33, 573-582.

Grüsser-Cornehls U. and Himsted W., 1976. The Urodele visual system In: Fite K.V. (Ed) *The Amphibian visual system - a multidisciplinary approach*. Academic Press, New York, 203-266.

Guarino F.M., Caputo V., Angelini F., 1992. The reproductive cycle of the newt *Triturus italicus*. *Amphibia-Reptilia* 12, 121-133.

Guengerich F.P., 1992. Cytochrome P450: advances and prospects. *FASEB J.* 6, 667-668.

Guengerich F.P., 1999. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 1-17.

Guida G., Maida I., Gallone A., Boffoli D., Cicero R., 1998. Ultrastructural and functional study of the liver pigment cells from *Rana esculenta* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal.* 34, 393-400.

Haar J.L. and Hightower J.A., 1976. A Light and Electron Microscopic Investigation of the Hepatic Parenchyma of the Adult Newt, *Notophthalmus viridescens*. *Anat. Rec.* 185, 3.

Hacking M.A., Budd J., Hodson K., 1978. The ultrastructure of the liver of rainbow trout: normal structure and modifications after chronic administration of a polychlorinated biphenyl Aroclor 1254. *Can. J. Zoolog.* 56, 477-491.

Hager C.D., 1998. Alkylphenol ethoxylates – biodegradability, aquatic toxicity and environmental activity. In: Karsa DR, editor. *Annual surfactant review*. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press.

Han X.D., Tu Z.G., Gong Y., Shen S.N., Wang X.Y., Kang L.N., Hou Y.Y., Chen J. X., 2004. The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reprod. Toxicol.* 19, 215-221.

Hara Y., Strüssmann C.A., Hashimoto S., 2007. Assessment of Short-Term Exposure to Nonylphenol in Japanese Medaka Using Sperm Velocity and Frequency of Motile Sperm. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 406-410.

Hasemann C.A., Kurumbail R.G., Boddupalli S.S., Peterson J.A., Deisenhofer J., 1995. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* 2, 41-62.

Hasselberg L., Meier S., Svardal A., Hegelund T., Celander M.C., 2004. Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquat. Toxicol.* 67, 303-313.

Hasselberg L., Grosvik B.E., Goksoyr A., Celander M.C., 2005. Interactions between xenoestrogens and ketoconazole on hepatic CYP1A and CYP3A, in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Hepatol.* 4, 2.

Hecht S. A., Gunnarsson J. S., Boese B. L., Lamberson J. O., Schaffner C., Giger W., Jepson P.C., 2004. Influences of sedimentary organic matter quality on the bioaccumulation of 4-nonylphenol by estuarine amphipods. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 865-873.

Hellyer Y., 1991. EPA's Chemical Testing Program; Nonylphenol in general, 4-Nonylphenol in Particular. 9-13. In *Proceedings of Seminar on Nonylphenolethoxylates (NPE) and Nonylphenol (NP)*, Swedish Environmental Protection Agency, Ingvar Bingman.

Hernández-Rodríguez G., Zumbado M., Luzardo O.P., Monterde J.G., Blanco A., Boada L.D., 2007. Multigenerational study of the hepatic effects exerted by the consumption of nonylphenol and 4-octylphenol contaminated drinking water in spargue Dawley rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 73-81.

Hernandez J.P., Chapman L.M., Kretschmer X.C., Baldwin W.S., 2006. Gender-specific induction of cytochrome P450s in nonylphenol-treated FVB/NJ mice. *Toxicol. Appl. Pharm.* 216, 186-196.

Ho S.M., 1987. Vitellogenin synthesis and secretion in all classes of oviparous vertebrates. In Norris DO, Jones RT, eds, *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. Plenum, New York, NY, USA, 145-162.

Hofmann K., 1999. The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 1113-1128.

Hsieh C. Y., Miaw C. L., Hsieh C. C., Tseng H. C., Yang Y. H., Yen C. H., 2009. Effects of chronic 4-n-nonylphenol treatment on aortic vasoconstriction and vasorelaxation in rats. *Arch. Toxicol.* 83, 941-946.

Huang W., Zhang Y., Jia X., Ma X., Li S., Liu Y., Zhu P., Lu D., Zhao H., Luo W., Yi S., Liu X., Lin H., 2010. Distinct expression of three estrogen receptors in response to bisphenol A and nonylphenol in male Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiol. Biochem.* 36, 237-249.

Hugla J.L. and Thomé J.P. 1999. Effects of Polychlorinated Biphenyls on Liver Ultrastructure, Hepatic Monooxygenases, and Reproductive Success in the Barbel. *Ecotox. Environ. Safe.* 42, 265-273.

Humphrey C.D. and Pittman F.E., 1974. A simple methylene blue-azure II-basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue section. *Stain Technol.* 49, 9-14.

Iantorno A., Talarico E., Mazzuca D., Bonacci A., Tripepi S., 2002. Riconoscimento delle larve dei tritoni presenti in Calabria: un approccio morfologico. 4° Congresso nazionale *Societas Herpetologica Italica*, Ercolano (Napoli) 18-22 giugno 2002, 73.

Ishibashi H., Tachibana K., Tsuchimoto M., Soyano K., Tatarazako N., Matsumura N., Tomiyasu Y., Tominaga N., Arizono K., 2004. Effects of Nonylphenol and Phytoestrogen-Enriched Diet on Plasma Vitellogenin, Steroid Hormone, Hepatic Cytochrome P450 1A, and Glutathione-S-Transferase Values in Goldfish (*Carassius auratus*). *Comparative Med.* 54, 54-62.

Islinger M., Willimski D, Völkl A., Braunbeck T., 2003. Effects of 17 α -ethinylestradiol on the expression of three estrogen-responsive genes and cellular ultrastructure of liver and testes in male zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 62, 85-103.

Isobe T., Nishiyama H., Nakashima A., Takada H., 2001. Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1041-1049.

Itoh M., Inoue M., Ishii S., 1990. Annual cycle of pituitary and plasma gonadotropins and plasma sex steroids in a wild population of the toad, *Bufo japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78(2), 242-53.

Jonkers N., Knepper T., Voogt, P., 2001. Aerobic biodegradation studies of nonylphenol ethoxylates in river water using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 35, 335-340.

- Kammann U., Vobach M., Wosniok W., Schäffer A., Telscher A., 2009.** Acute toxicity of 353-nonylphenol and its metabolites for zebrafish embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 227-231.
- Kang H.S., Noh J.S., Gye M.C., 2006.** Effect of Nonylphenol on the Expression of Hepatic Vitellogenin mRNA in Male *Bombina orientalis* (Boulenger). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 77, 15-20.
- Kaptaner B. and Ünal G., 2010.** Effects of 17 β -Ethinylestradiol and Nonylphenol on Liver and Gonadal Apoptosis and Histopathology in *Chalcalburnus tarichi*. Published online in Wiley Inter Science (www.interscience.wiley.com).
- Katchamart S., Miranda C.L., Henderson M.C., Pereira C.B., Buhler D.R., 2002.** Effect of xenoestrogen exposure on the expression of cytochrome p450 isoforms in Rainbow trout liver. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2445-2451.
- Kawana R., Strüssmann C.A., Hashimoto S., 2003.** Effect of *p*-Nonylphenol on sperm motility in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Fish Physiol. Biochem.* 28, 213-214.
- Keith T., Snyder S., Naylor C., Staples C., Summer C., Kannan K., Giesy J. P., 2001.** Identification and Quantitation of Nonylphenol Ethoxylates and Nonylphenol in Fish Tissues from Michigan. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 1.
- Kiesecker J.M., Blaustein A.R., Belden L.K., 2001.** Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410, 681-684.
- Kloas W., Einspanier R., Lutz I., 1999.** Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci. Total Environ.* 225, 59-68.
- Kocarek T.A., Schuetz E.G., Guzelian P.S., 1993.** Regulation of phenobarbital-inducible cytochrome P450 mRNAs by lovastatin and oxysterols in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120.
- Koh Y.K.K., Lester J.N, Scrimshaw M.D., 2005.** Fate and behavior of alkylphenols and their polyethoxylates in an activated sludge plant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 1098-106.
- Kohler A., 1990.** Identification of contaminant-induced cellular and subcellular lesions in the liver of flounder (*Platichthys flesus*) caught at differently polluted estuaries. *Aquat. Toxicol.* 16, 271-294.
- Kolpin D., Furlong E., Meyer M., Thurman E., Zaugg S., Barber L., Buxton H., 2002.** Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202-1211.
- Kravetz L., Chung H., Guin K.F., Shebs W.T., Smith L.S., 1983.** Primary and ultimate biodegradation of an alcohol ethoxylate and a nonylphenol ethoxylate under average winter conditions in the USA. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 731-732.
- Kremer J., 1932.** Die fortlaufender Veränderungen der Amphibienleber im Hungerzustande. *Z. mikr. Anat. Forsch.* 28, 81-157.

- Kroemer G., 1995.** The pharmacology of T cell apoptosis. *Adv. Immunol.* 58, 211-296.
- Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M., 1998.** The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis *Annu. Rev. Physiol.* 60, 619-42.
- Kumar S. and Lavin M.F., 1996.** The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Diff.* 3, 255-267.
- Kyselova V., Peknicova J., Buckiova D., Boubelik M., 2003.** Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 30.
- Labadie P. and Budzinski H., 2006.** Alteration of Steroid Hormone Balance in Juvenile Turbot (*Psetta maxima*) Exposed to Nonylphenol, Bisphenol A, Tetrabromodiphenyl Ether 47, Diallylphthalate, Oil, and Oil Spiked with Alkylphenols. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 552-561.
- Lanza B., 1983.** Anfibi e Rettili (Amphibia, Reptilia). Guida per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, 27. Collana del Progetto Finalizzato "Promozione della qualità dell'ambiente". C.N.R., Roma.
- Laurenzana E.M., Weisa C.C., Bryanta C.W., Newbold R., Delclosa K.B., 2002.** Effect of dietary administration of genistein, nonylphenol or ethinyl estradiol on hepatic testosterone metabolism, cytochrome P-450 enzymes, and estrogen receptor alpha expression. *Food Chem. Toxicol.* 40, 53-63.
- Lavine J.A., Rowatt A.J., Klimova T., Whittington A.J., Dengler E., Beck C., Powell W.H., 2005.** Aryl hydrocarbon receptors in the frog *Xenopus laevis*: two AhR1 paralogs exhibit low affinity for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p dioxin (TCDD). *Toxicol. Sci.* 88, 60-72.
- Lech J.J., Lewis S.K., Ren L., 1996.** In vivo estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout. *Fundam. Appl. Toxicol.* 30, 229-232.
- Lee H.B., 1999.** Review of analytical methods for the determination of nonylphenol and related compounds in environmental samples. *Water Qual. Res. J. Canada* 34, 3-35.
- Lee, P.C., Chakraborty P.S., Struve M., 1996.** Modulation of rat hepatic CYP3A by nonylphenol. *Xenobiotica* 26, 831-838.
- Lee P.C. and Lee W., 1996.** In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 341-348.
- Lee P.C., 1998.** Distruption of male reproductive tract development by administration of the xenoestrogen, nonylphenol, to male newborn rats. *Endocrine* 9, 105-111.
- Lee H.J., Chattopadhyay S., Gong E.Y., Ahn R.S., Lee K., 2003.** Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol. Sci.* 75, 40-46.
- Lemaire P., Berhaut J., Lemaire-Gony S., Lafaurie, M., 1992.** Ultrastructural changes induced by benzo(a)pyrene in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver and intestine: Importance of the intoxication route. *Environ. Res.* 57, 59-72.

Lewis S.K. and Lech J.J., 1996. Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* 26, 813.

Little E.E., Bridges C.M., Linder G., Boone M., 2003. Establishing causality in the decline and deformity of amphibians: the amphibian research and monitoring initiative model. In: Linder, G., Krest, S., Sparling, D., Little, E. (Eds.), *Multiple Stressor Effects in Relation to Declining Amphibian Populations*. American Society Testing and Materials, Conshohocken, PA, USA, pp. 263-277.

Loos R., Hanke G., Umlauf G., Eisenreich S.J., 2007. LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters. *Chemosphere* 66, 690-699.

Loos R., Wollgast J., Huber T., Hanke G., 2007. Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1469-1478.

Lussier S.M., Champlin D., LiVolsi J., Poucher S., Pruell R.J., 2000. Acute toxicity of paranonylphenol to saltwater animals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 617-621.

Lyman W., Reehl W., Rosenblatt D., 1990. *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*: American Chemical Society, Washington, DC.

Madsen S.S., Mathiesen A.B., Korsgaard B., 1997. Effects of 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on smoltification and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.* 17, 303-312.

Maguire R.J., 1999. Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. *Water Qual. Res. J. Canada* 34, 37-78.

Mancino G., 1968. Sulla validità specifica di *Triturus italicus* (Peracca, 1898) (Anfibi: Urodeli). *Lincei - Rend. Sc. fis. mat. e nat.* 44, 697-700.

Mann M. and Jensen O.N., 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* 21, 255-261.

Mann R.M. and Bidwell J.R., 2000. Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. *Aquat. Toxicol.* 51, 19-29.

Mann R.M. and Bidwell J.R., 2001. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frog. *Environ. Pollut.* 114, 195-205.

Manzano M.A., Perales J.A., Sales D., Quiroga J.M., 1999. The effect of temperature on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. *Water Res.* 33, 11, 2593-2600.

Marcomini A., Pavoni B., Sfriso A., Orio A.A., 1990. Persistent metabolites of alkylphenol polyethoxylates in the marine environment. *Marine Chem.* 29, 307-323.

Marunouchi J., Ueda H., Ochi O., 2000. Variation in age and size among breeding populations at different altitudes in the Japanese newts, *Cynops pyrrhogaster*. *Amphibia-Reptilia*, 21, 381-396.

Masuyama H., Hiramatsu Y.M.K., Takafumi K., MacDonald P.N., 2000. Endocrine disrupting chemicals, phthalic acid and nonylphenol, activate pregnane X receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.* 14, 421-428.

Matozzo V., Deppieri M., Moschino V., Marin M.G., 2003. Evaluation of 4-nonylphenol toxicity in the clam *Tapes philippinarum*. *Environ. Res.* 91, 179-185.

McCallum M.L., 2007. Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *J. Herpetol.* 41, 483-491.

McLeese D.W., Sargeant D.B., Metcalfe C.D., Zitko V., Burridge L.E., 1980a. Uptake and excretion of aminocarb, nonylphenol, and pesticides diluent 585 by mussels (*Mytilus edulis*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 575-581.

McLeese D.W., Zitko V., Sargeant D.B., Burridge L., Metcalfe C.D., 1981. Lethality and Accumulation of Alkylphenols in Aquatic Fauna. *Chemosphere* 10, 723-730.

Meador V.P. and Cheville, N.F., 2009. Toxicolog pathology. In *Ultrastructural pathology - The comparative basis of disease* (Ed Cheville N.F.), Iowa State University press. 606-632.

Mehendale H.M., Roth R.A., Gandolfi A.J., Klaunig J.E., Lemasters J.J., 1994. Novel mechanisms in chemically induced hepatotoxicity. *FASEB J.* 8, 1285-1295.

Meucci V. and Arukwe A., 2006 The xenoestrogen 4-nonylphenol modulates hepatic gene expression of pregnane X receptor, aryl hydrocarbon receptor, CYP3A and CYP1A1 in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp. Biochem. Phys. C* 142, 142-150.

Möller A., 1951. Die struktur des auges bei Urodelen verschiedener Körpergröße. *Zool. Jahrb. Abt. Allg. Zool. Physiol. Tiere* 62, 138-182.

Mosconi G., Carnevali O., Franzoni M.F., Cottone E., Lutz I., Kloas W., Yamamoto K., Kikuyama S., Polzonetti-Magni A.M., 2002. Environmental estrogens and reproductive biology in Amphibians. *Gen. Comp. Endocr.* 126, 125-129.

Morse D.C., Weiiler E.K., Wesseling W., Koeman J.H., Brouwer A., 1996. Alteration in rat thyroid hormones status following pre- and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136, 269-279.

Muller S. and Schlatter C., 1998. Natural and Anthropogenic Environmental Oestrogens: The Scientific Basis for Risk Assessment. Oestrogenic Potency of Nonylphenol In Vivo - A Case Study to Evaluate the Relevance of Human Non-Occupational Exposure. *Pure Appl. Chem.* 70, 1847-1853.

Nebert D.W., Nelson D.R., Coon M.J., Estabrook R.W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalas I.C., Johnson E.F., Loer J.C., Sato R., Waterman M.R., Waxman D.J., 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10, 1-14.

Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J., Guengerich F.P., Estabrook R. W., Feyereisen R., 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12, 1-51.

Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D., 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1-42.

Nicholls T.J., Follett B.K., Evennett P.J., 1968. The effects of oestrogens and other steroid hormones on the ultrastructure of the liver of *Xenopus laevis* Daudin. *Zeitschrift Fuer Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie* 90, 19-27.

Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A., 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376 (6535), 37-43.

Nicholson D.W. and Thornberry N.A., 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 299-306.

Nicholson D.W., 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6, 1028-1042.

Nilsen B.M., Berg K., Goksøyr A., 2002. Induction of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish. In: Phillips I.R. & Shephard E.A. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol.107: Cytochrome P450 protocols, Totowa, NJ, Humana Press Inc., 423-438.

Obata T. and Kubota S., 2000. Formation of hydroxy radicals by environmental estrogen-like chemicals in rat striatum. *Neurosci. Lett.* 296, 41-44.

Oesch-Bartlomowicz B. and Oesch F., 2003. Cytochrome-P450 phosphorylation as a functional switch. *Arch. Biochem. Biophys.* 409, 228-234.

Okai Y., Sato E.F., Higashi-Okai K., 2004. Enhancing effect of the endocrine disruptor para-nonylphenol on the generation of reactive oxygen species in human blood neutrophils. *Environ. Health. Perspect.* 112, 553-556.

Okpokwasili G.C. and Olisa A.O., 1991. River-water biodegradation of surfactants in liquid detergents and shampoos. *Water Res.* 25, 1425-1429.

PARCOM 92/8, 2000. Recommendation on nonylphenol-ethoxylates. London, UK. OSPAR Convention.

Park S.Y. and Choi J., 2009. Genotoxic Effects of Nonylphenol and Bisphenol A Exposure in Aquatic Biomonitoring Species: Freshwater Crustacean, *Daphnia magna*, and Aquatic Midge, *Chironomus riparius*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83, 463-468.

Park C.J., Kang H.S., Gye M.C., 2010. Effects of nonylphenol on early embryonic development, pigmentation and 3,5,30-triiodothyronine-induced metamorphosis in *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura). *Chemosphere* 81, 1292-1300.

Patoczka J. and Pulliam G., 1990. Biodegradation and secondary effluent toxicity of ethoxylated surfactants. *Water Res.* 24, 965-972.

Patrolecco L., Capri S., De Angelis S., Pagnotta R., Polesello S., Valsecchi S., 2006. Partition of nonylphenol and related compounds among different aquatic compartments in Tiber river (central Italy). *Water Air Soil Poll.* 172, 151-166.

Policastrese M., 2001. Distribuzione ed ecologia di *Triturus italicus* in Calabria. Tesi di laurea in Scienze Naturali. Università della Calabria. Anno Accademico 2000/2001.

Porter A. and Hayden N., 2001. Processes Affecting the Fate of Nonylphenol During Wastewater Treatment: In Proceedings of 2nd International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water, The National Groundwater Association, October 9-11, 2001, Minneapolis, MN.

Porter A. and Hayden N., 2002. Nonylphenol in the environment: a critical review. Department of Civil and Environmental Engineering, University of Vermont, Burlington, VT 05405.

Qiu Y., Wu D., Zeng X., Zhang H., 2005. Adverse effects of nonylphenol on the reproductive development of F1 male SD rats in sexual maturation period. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 36, 382-385.

Ragghianti M. and Wake D.B., 1986. Genic variation and its evolutionary implications in the Italian newt, *Triturus italicus*. *Herpetologica* 42, 206-214.

Renner R., 1997. European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environ. Sci. Technol. A* 31, 316-20.

Renner R., 2000. European ban on use of surfactant alarms US producers. *Environ. Sci. Technol. A* 34, 68.

Romano R., 1991. Current Studies on Nonylphenol: Physical/Chemical, Biodegradation and Aquatic Effects: In Proceedings of Seminar on Nonylphenoethoxylates (NPE) and Nonylphenol (NP), Swedish Environmental Protection Agency, Ingvar Bingman, 233-238.

Roth G., 1987. *Visual Behaviour in Salamanders.* Springer-Verlag, Berlin.

Sato T., Saito H., Uchiyama T., Fujimoto Y., Katase T., Kai O., 2009. Effects of synthetic para-nonylphenol isomers administered chronically throughout pregnancy and lactation on reproductive system of mouse pups. *Arch. Toxicol.* 83, 1097-1108.

Savill J., 1996. Phagocyte recognition of apoptotic cells. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 1065-1069.

Scala C, Pasquinelli G, Cenacchi G, 1995. *Microscopie in biologia e medicina.* Clueb Editore, Bologna.

Scalzo A., Ripolo D., Rossi F., Dodaro R., Tripepi S. 1988. L'alimentazione di *Triturus italicus*. In: Tripepi S. and Giacomini C. (Eds). *Atti del convegno internazionale "Il parco naturale e l'equilibrio ambientale"*. S. Benedetto Ullano 22-24 settembre 1988, 33-37.

Scillitani G., 1992. Variazione geografica in due specie italiane di tritone, *Triturus italicus* (Peracca, 1898) e *Triturus carnifex* (Laurenti, 1768). (Caudata: Salamandridae). *Analisi*

morfológica ed elettroforetica. Tesi di Dottorato di Ricerca, Università degli Studi di Napoli "Federico II" Napoli, 62 pp.

Scillitani G., Caputo V., Frisenda S., 1992. On the maximum size attained by the Italian newt, *Triturus italicus* (Peracca, 1898) (Caudata: Salamandridae). Boll. Mus. reg. Sc. Nat., Torino, 11 (1), 209-217.

Scillitani G., Rizzi V., Gioiosa M., 1996. Atlante degli Anfibi e dei Rettili della provincia di Foggia. Monografie Mus. Prov. St. Nat. Foggia, C. Stud. Nat. vol. 1. Gitto, Foggia, 120 pp.

Schlenk D., Di Giulio R. T., 2002. Biochemical responses as indicators of aquatic ecosystem health. In: Adams S.M. (ed.), Biological indicators of aquatic ecosystem stress. AFS, Bethesda, 14-17.

Schwartzman R.A. and Cidlowski J.A., 1993. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocr. Rev. 14, 133-151.

Sekela M., Brewer R., Moyle G., Tuominen T., 1999. Occurrence of an Environmental Estrogen (4-Nonylphenol) in Sewage Treatment Plant Effluent and the Aquatic Receiving Environment. Water Sci. Technol. 39, 217-220.

Servos M., 1999. Review of Aquatic Toxicity, Estrogenic Responses and Bioaccumulation of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates. Water Qual. Res. J. Canada 34 (1), 123-177.

Servos M.R., Maguire R.J., Bennie D.T., Lee H.B., Cureton P.M., Davidson N., 2003. An ecological risk assessment of nonylphenol and its ethoxylates in the aquatic environment. Hum. Ecol. Risk Assess. 9, 569-587.

Shang D.Y., MacDonald R.W., Ikonomou M.G., 1999. Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the Strait of Georgia, British Columbia, Canada. Environ. Sci. Technol. 33, 1366-1372.

Shao B., Hu J., Yang M., An W., Tao S., 2005. Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates in River Water, Drinking Water, and Fish Tissues in the Area of Chongqing, China. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 48, 467-473.

Shelby M.D., Newbold R.R., Tully D.B., Chae K., Davis V.L., 1996 Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. Environ. Health Persp. 104, 1296-1300.

Shiu W., Ma K., Varhanickova D., Mackay D., 1994. Chlorophenols and Alkylphenols: A Review and Correlation of Environmentally Relevant Properties and Fate in an Evaluative Environment. Chemosphere 29, 1155-1224.

Sichel G., Scalia M., Mondio F., Corsaro C., 1997 The Amphibian Kupffer Cells Build and Demolish Melanosomes: An Ultrastructural Point of View. Pigment. Cell. Res. 10, 271-287.

Sivarajah K., Anderson M.W., Eling T.E., 1978. Metabolism of benzo(a)-pyrene to reactive intermediates via prostaglandin biosynthesis. *Life Sci.* 23, 2571-2578.

Silversand C, Hylner S.J., Haux C., 1993. Isolation, immunochemical detection and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. *J. Exp. Zool.* 267, 587-597.

Smirlis D., Muangmoonchai R., Edwards M, Phillips I.R., Shephard E.A., 2001. Orphan Receptor Promiscuity in the Induction of Cytochromes P450 by Xenobiotics. *The J. Biol. Chem.* 276, 12822-12826.

Snyder S., Keith T., Verbrugge D., Snyder E., Gross T., Kannan K., Giesy J., 1999. Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2814-2820.

Soares A., Vijayram I.A., Guieysse B., Murto M., Guieysse B., Mattiasson B., 2005. Degradation of non-ionic surfactants under anaerobic conditions. In: Rittmann BE, van Loosdrecht MCM, editors. Third IWA leading-edge conference on water and wastewater treatment technologies. Sapporo, Japan: IWA Publishing.

Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E., Lester J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Int.*, 34, 1033-1049.

Societas Herpetologica Italica, 1996. Atlante provvisorio degli Anfibi e dei Rettili Italiani. Estratto degli annali del Museo Civico di Storia Naturale "G. Doria", Pantograf, Genova, vol. XCI.

Societas Herpetologica Italica sezione Puglia, 2002. Atlante degli Anfibi e dei Rettili della provincia di Bari. Amministrazione Provinciale di Bari, Bari, 102 pp.

Solé M., Lopez de Alda M.J., Castillo M., Porte C., Ladegaard-Pedersen K., Barcelò D., 2000. Estrogenicity Determination in Sewage Treatment Plants and Surface Waters from the Catalonian Area (NE Spain). *Environ. Sci. Technol.* 34, 5076-5083.

Soto A. M., Justicia H., Wray J.W., Sonnenschien C., 1991. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Persp.* 92, 167-173.

Sparling D.W., Bishop C.A., Linder G., 2000. The current status of Amphibian and reptile ecotoxicological research. In: Sparling D. W., Bishop C. A., Linder G. (eds), *Ecotoxicology of Amphibians and reptiles*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry press, Florida, p 1.

Sperone E. and Tripepi S., 2005. Ecological preferences of the Italian newt *Triturus italicus* (Peracca, 1898) in Calabria. *Russian Journal of Herpetology* 12 (suppl), 269-271.

Spornitz U.M., 1975. Studies on the liver of *Xenopus laevis*. I. The ultrastructure of the parenchymal cell. *Anat. Embryol. (Berl)* 146 (3), 245-264.

Staples C.A., Weeks J., Hall J.F., Naylor C.G., 1998. Evaluation of Aquatic Toxicity and Bioaccumulation of C8- and C9-Alkylphenol Ethoxylates. *Environ. Toxicol. Chem.* 17,12, 2470-2480.

Stegeman J.J. and Hahn M.E., 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers Inc., Boca Raton, FL, USA, pp. 87-204.

Sueyoshi T. and Negishi M., 2001. Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 123-143.

Sumpter J.P. and Jobling S., 1995 Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Persp.* 103 (7), 173-178.

Sundaram K.M.S. and Szeto S., 1981. The dissipation of nonylphenol in stream and pond water under simulated field conditions. *J. Environ. Sci. Health (Part B)* B16(6), 767-776.

Sutton V.R., Wowk M.E., Cancilla M., Trapani J.A., 2003. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase auto processing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* 18, 319-329.

Suzuki K.T. and Iwata H., 2010. Cytochrome P450 Family 1 Genes in *Xenopus tropicalis*. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry – Environmental Specimen Bank*, Eds., T. Isobe, K. Nomiyama, A. Subramanian and S. Tanabe, pp. 155-160.

Sweet L.I., Passino-Reader D.R., Meier P.G., Omann G.M., 1999. Xenobiotic-induced apoptosis: Significance and potential application as a general biomarker of response. *Biomarkers* 4, 237-253.

Tabira Y., Nakai M., Asai D., Yakabe Y., Tahara Y., Shinmyozu T., Noguchi M., Takatsuki M., Shimohigashi Y., 1999. Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor. *Eur. J. Biochem.* 262, 240-245.

Takagi H., Shibutani M., Masutomi N., Uneyama C., Takahashi N., Mitsumori K., Hirose M., 2004. Lack of maternal dietary exposure effects of bisphenol A and nonylphenol during the critical period for brain sexual differentiation on the reproductive/endocrine systems in later life. *Arch. Toxicol.* 78, 97-105.

TenEyck M.C. and Markee T.P., 2007. Toxicity of nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, and nonylphenol diethoxylate and mixtures of these compounds to *Pimephales promelas* (Fathead Minnow) and *Ceriodaphnia dubia*. *Arch. Environ. Con. Tox.* 53, 599-606.

Tewari M., Quan L.T., O'Rourke K., Desnoyers S., Zeng Z., Beidler D.R., Poirier G.G., Salvesen G.S., Dixit V. M., 1995. Yama/ CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 81, 801-809.

Thiele B., Gunther K., Schwuger M.J., 1997. Alkylphenol Ethoxylates: Trace Analysis and Environmental Behavior. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* 97, 3247-3272.

Tom M., Myers C.R., Waterman M.R., 2002. Evaluating molar CYP1A level in fish hepatic microsomes by competitive ELISA using recombinant membrane-free CYP1A standard protein. *Aquat. Toxicol.* 59, 101-114.

Tripepi S., Rossi F., Peluso G., 1998. Embryonic development of the newt *Triturus italicus* in relation to temperature. *Amphibia-Reptilia* 19, 345-355.

Tripepi S., Carelli B., Giardinazzo E., Sperone E., Serroni P., 1999a. Distribuzione degli Anfibi nella provincia di Reggio Calabria: dati preliminari. In: S. Tripepi (ed.): Atti II° Convegno Nazionale "Societas Herpetologica Italica" (Praia a Mare, 6-10 ottobre 1998), *Rivista di Idrobiologia* 38, 141-149.

Tripepi S., Serroni P., Brunelli E., 1999b. Guida-Atlante degli Anfibi della Provincia di Cosenza. Pellegrini editore, Cosenza, 116 pp.

Tripepi S., Giardinazzo E., Talarico E., Sperone E., 2002. Gli anfibi del Parco Nazionale del Pollino: distribuzione e note sulla conservazione. 63° Congresso UZI, Arcavacata di Rende (CS) 22-26 settembre 2002, 85.

Trumbo J., 2005. An Assessment of the Hazard of a Mixture of the Herbicide Rodeo® and the Non-Ionic Surfactant R-11® to Aquatic Invertebrates and Larval Amphibians. *Calif. Fish Game* 91(1), 38-46.

Tsai J.Y., Huang C.C., Cheng H.H., Lin K.L., Liao W.C., Jan C.R., 2009. Nonylphenol-Induced Cytosolic Ca²⁺ Elevation and Death in Renal Tubular Cells. *Drug Develop. Res.* 70, 370-377.

Tyler C.R., Jobling S., Sumpter J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 319-361.

Tyler M.J., 1994. Australian Frog: A Natural History. Reed Books, Chatswood.

United States Environmental Protection Agency, 2003. Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Nonylphenol - Draft. 822-R-03-029.

Van Ry D., Dachs J., Gigliotti C., Brunciak P., Nelson E., Eisenreich S., 2000. Atmospheric Seasonal Trends and Environmental Fate of Alkylphenols in the Lower Hudson River Estuary. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2410-2417.

Verschueren K., 1983. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals. Van Nostrand Reinhold Co. New York, NY.

Vivacqua A., Recchia A.G., Fasanella G., Gabriele S., Carpino A., Rago V., Di Gioia M.L., Leggio A., Bonofiglio D., Liguori A., Maggiolini M., 2003. The Food Contaminants Bisphenol A and 4-Nonylphenol Act as Agonists for Estrogen Receptor α in MCF7 Breast Cancer Cells. *Endocrine* 22, 275-284.

XueFei L., QunFang Z., MaoYong S., GuiBin J., Jing S., 2007. Vitellogenic responses of male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) exposed to the individual or binary mixtures of 17 β -estradiol and nonylphenol. *Chinese Sci. Bull.* 52, 3333-3338.

Wake D.B., 1991. Declining amphibian populations. *Science*, 253, 860.

Watanabe H., Suzuki A., Goto M., Lubahn D. B., Handa H., Iguchi T., 2004. Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 243-252.

Weber C.H. and Vincenz C., 2001. The death domain superfamily: a tale of two interfaces [review]? *Trends Biochem. Sci.* 26, 475-481.

Weber L.P., Kiparissis Y., Hwang G.S., Nimi A.J., Janz D.M., Metcalfe C.D., 2002. Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 131, 51-59.

Yang F.X., Xu Y., Wen S., 2005. Endocrine-disrupting effects of nonylphenol, bisphenol A and p,p-DDE on *Rana nigromaculata* tadpoles. *B. Environ. Contam. Tox.* 75, 1168-1175.

Yang L., Lin L., Weng S., Feng Z., Luan T. 2008. Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on male silver carp (*Carassius auratus*) in aquatic microcosms. *Ecotox. Environ. Safe.* 71, 400-411.

Yao G., Yang L., Hu Y., Liang J., Liang J., Hou Y., 2006. Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis involved caspase-3 activation and mitochondrial depolarization. *Mol. Immunol.* 43, 915-926.

Ying G.G., Williams B., Kookana R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates-a review. *Environ. Int.* 28, 215-226.

Yoshimura K., 1986. Biodegradation and fish toxicity of nonionic surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63, 1590-1596.

Zerani M., Vellano C., Amabili F., Carnevali O., Andreoletti G.E., Polzonetti-Magni A. 1991. Sex steroid profile and plasma vitellogenin during the annual reproductive cycle of the crested newt (*Triturus cristatus* Laur.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 82(3), 337-44.

Zhivotovsky B., Burgess D.H., Vanags D.M., Orrenius S., 1997. Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 481-488.

Grazie...

*Ai miei angeli custode,
che sono sempre stati al mio fianco
e sempre lo saranno*

*Alle persone che mi amano,
che danno senso alla mia vita
e mi spronano a dare il meglio*

*A Madre Natura,
che ispira ogni mio giorno.*