

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

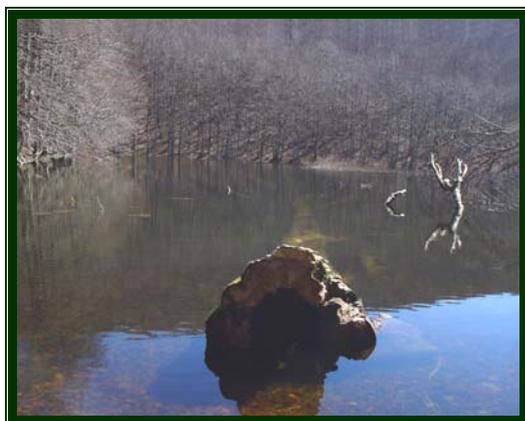
Dottorato di Ricerca in Biologia Animale

(Settore disciplinare BIO-05)

XX Ciclo

(2004-2007)

**Tossicità ed alterazioni dell'apparato branchiale
di *Bufo bufo* (*Amphibia, Anura*) dopo
esposizione acuta e cronica ad endosulfan**



Dott.ssa Ilaria BERNABÒ

Coordinatore
Chiar.mo Prof.
Bruno TOTA

Docente Tutor
Chiar.mo Prof.
Sandro TRIPEPI

... a quanti mi hanno sopportato e sostenuto e .

..

nonostante tutto continuano a farlo.

INDICE

INTRODUZIONE	pag.	1
--------------	------	---

CAPITOLO I DECLINO DEGLI ANFIBI

1.1. Principali cause ipotizzate	»	6
1.2. Gli Anfibi come bioindicatori	»	8
1.3. Pesticidi e Anfibi	»	9

CAPITOLO II ENDOSULFAN

2.1. Campo d'impiego, formulazioni ed uso	»	14
2.2. Classificazione e status	»	14
2.3. Proprietà fisiche e chimiche	»	15
2.4. Degradazione e destino nell'ambiente	»	16
2.5. Residui e concentrazioni in natura	»	17
2.6. Tossicità ed effetti sulla salute umana	»	19
2.6.1. Tossicità acuta	»	20
2.6.2. Tossicità cronica	»	20
2.6.3. Endocrine disruption	»	21
2.7. Ecotossicità	»	22
2.7.1. Invertebrati acquatici	»	22
2.7.2. Uccelli	»	22
2.7.3. Pesci	»	22
2.8. Bioaccumulo e biomagnificazione	»	24
2.9. Endosulfan ed Anfibi	»	25

CAPITOLO III
SPECIE ED ORGANO TARGET

3.1. Specie studiata	»	27
3.1.1. Caratteristiche generali	»	28
3.1.2. Riproduzione	»	29
3.1.3. Habitat ed ecologia	»	30
3.1.4. Larve di <i>Bufo bufo</i>	»	31
3.2. Apparato branchiale degli Anfibi Anuri	»	32
3.3. Le branchie interne in <i>Bufo bufo</i>	»	34
3.3.1. Filtri branchiali	»	35
3.3.2. Ciuffi branchiali	»	37

CAPITOLO IV
MATERIALI E METODI

4.1. Larve: raccolta e mantenimento	»	41
4.2. Tossicità acuta	»	41
4.3. Tossicità cronica	»	42
4.3.1. Parametri rilevati per gli effetti subletali	»	44
4.3.1.1. Attività di nuoto	»	44
4.4. Analisi morfologica dell'apparato branchiale	»	45
4.5. Allestimento dei preparati per la microscopia ottica e microscopia elettronica a scansione e a trasmissione	»	46
4.5.1. Prelievo	»	47
4.5.2. Fissazione	»	47
4.5.3. Disidratazione	»	48
4.5.4. Infiltrazione o inclusione (solo per MO e TEM)	»	49
4.5.5. Taglio e colorazione (solo per MO e TEM)	»	50
4.5.6. Essiccamento e ricopertura (solo per SEM)	»	51
4.6. Allestimento dei preparati per la microscopia confocale	»	52
4.6.1. Fissazione	»	52
4.6.2. Disidratazione	»	52
4.6.3. Inclusione	»	53
4.6.4. Metodo dell'immunofluorescenza	»	55

4.7.	Analisi statistica	»	55
4.7.1.	LC ₅₀	»	55
4.7.2.	Analisi dei dati cronici	»	55

CAPITOLO V TOSSICITÀ ACUTA

5.1.	LC ₅₀	»	57
5.2.	Analisi morfologica	»	59
5.2.1.	Morfologia delle branchie interne dopo 24 h di esposizione	»	59
5.2.2.	Morfologia delle branchie interne dopo 48 h di esposizione	»	59
5.2.3.	Morfologia delle branchie interne dopo 96 h di esposizione	»	62
5.3.	Analisi funzionale	»	67
5.3.1.	Espressione iNOS in esemplari di controllo	»	67
5.3.2.	Espressione iNOS dopo 24 h di esposizione	»	68
5.3.3.	Espressione iNOS dopo 48 h di esposizione	»	68
5.3.4.	Espressione iNOS dopo 96 h di esposizione	»	70

CAPITOLO VI TOSSICITÀ CRONICA

6.1.	Analisi discriminante parziale (PLS-DA)	»	71
6.2.	Analisi delle componenti principali (PCA)	»	71
6.3.	Partial least-squares regression (PLS)	»	72
6.4.	Attività di nuoto	»	72
6.5.	Mortalità	»	76
6.6.	Crescita, massa larvale e alla metamorfosi	»	77
6.7.	Sviluppo e deformità	»	78
6.8.	Metamorfosi	»	81
6.9.	Analisi morfologica dell'apparato branchiale	»	82

6.10. Osservazioni al SEM sull'apparato branchiale dopo esposizione cronica	»	82
6.10.1. Bassa concentrazione (0.01 mg/l)	»	82
6.10.2. Media (0.05 mg/l) ed alta concentrazione (0.1 mg/l)	»	85
6.11. Osservazioni al TEM sull'apparato branchiale dopo esposizione cronica	»	86

CAPITOLO VII

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

7.1. LC ₅₀	»	90
7.2. Morfologia ed ultrastruttura dell'apparato branchiale di <i>Bufo bufo</i> dopo esposizione a breve termine a 0.2 mg/l di endosulfan	»	91
7.3. Morfologia ed ultrastruttura dell'apparato branchiale di <i>Bufo bufo</i> dopo esposizione cronica a diverse concentrazioni subletali di endosulfan	»	95
7.4. Tolleranza all'endosulfan	»	96
BIBLIOGRAFIA	»	105

INTRODUZIONE

Durante gli ultimi decenni il declino degli Anfibi è apparso come esempio chiave della “crisi” della biodiversità su scala globale (Davidson *et al.* 2002). Sono state ipotizzate numerose cause per spiegare tale fenomeno e molte di queste implicano fattori di stress riconducibili alle attività dell’uomo come l’eccessivo utilizzo di pesticidi (Blaustein *et al.* 2003; Davidson 2004).

Gli Anfibi sono ottimi bioindicatori della qualità ambientale e del suo stato di salute; mostrano, inoltre, una particolare vulnerabilità ai contaminanti a causa sia delle loro caratteristiche biologiche, avendo una pelle altamente permeabile, branchie ed uova che possono assorbire facilmente le sostanze chimiche (Materna *et al.* 1995), sia della loro ecologia che li mette a rischio nell’ambiente terrestre e soprattutto in quello acquatico. La maggior parte infatti delle specie di anfibi trascorre lo sviluppo embrionale e larvale negli ambienti acquatici adiacenti alle zone coltivate, dove sono applicati i pesticidi, e possono essere quindi esposti ai contaminanti durante tali cruciali e delicate fasi. Nonostante ciò, gli studi ecotossicologici sugli Anfibi sono lunghi dall’essere esaustivi e hanno avuto scarsa attenzione rispetto ad altri Vertebrati (Venturino *et al.* 2003).

Tra i pesticidi, l’endosulfan è un organoclorurato globalmente ed estensivamente utilizzato su diverse colture ed in altri settori. Questo composto, di cui l’Italia è il secondo principale consumatore, colpisce numerosi organismi non-target specialmente quelli acquatici (Murty 1986). Sebbene numerosi lavori abbiano testimoniato la sua pericolosità per uomini ed animali (EFSA 2005; German Federal

Environment Agency 2007) i risultati della rete mondiale di monitoraggio rivelano che il suo uso è ancora abbondante ed anzi ha subito un aumento (Pozo *et al.* 2006; Harner *et al.* 2006).

Aumentare le nostre conoscenze per affrontare i problemi legati alla conservazione degli Anfibi implica indagare come le specie possano reagire a determinate trasformazioni del loro ambiente naturale e a fattori limitanti o di impatto quali appunto la presenza di pesticidi.

In tale ottica di ricerca va inserito il presente lavoro: esso ha inteso valutare gli effetti letali e subletali nelle larve di *Bufo bufo* dopo esposizione acuta e cronica ad endosulfan. Il rospo comune è stato preso in esame perché è una specie diffusa in Europa negli ambienti agro-culturali e un marcato decremento nelle popolazioni è stato osservato su scala locale (Pavignano & Giacoma 1990). Inoltre, si riproduce all'inizio della primavera e lo sviluppo larvale, che va da 40 a 80 giorni, può coincidere con il periodo di applicazione dell'endosulfan.

Il nostro lavoro nasce, inoltre, dall'evidenza di scarse informazioni disponibili in letteratura sui possibili effetti dell'endosulfan sugli Anfibi.

Sono stati quindi eseguiti test di tossicità acuta e cronica su larve, a partire dallo stadio 25 di Gosner; si è scelto di partire da questa fase larvale in quanto è stato accertato che l'endosulfan non ha effetti su uova, embrioni, e, in ultimo, sul successo di schiusa grazie agli involucri gelatinosi che offrono sufficiente protezione dal contatto diretto (Berrill *et al.* 1998).

Nostro interesse è stato non solo l'accertamento e lo studio delle concentrazioni di endosulfan che possono causare direttamente la morte degli individui (LC₅₀) ma, anche, di quelle basse concentrazioni che producono effetti subletali che indirettamente

riducono l'abilità di un individuo di adattarsi o sopravvivere attraverso alterazioni morfologiche o comportamentali. A tal fine, durante l'esposizione cronica, sono stati valutati la sopravvivenza, la crescita larvale, lo sviluppo, le caratteristiche alla metamorfosi e l'attività di nuoto. Secondo le nostre conoscenze, nessuno studio ha mai investigato gli effetti dell'endosulfan, su anfibi anuri, in seguito ad esposizione durante tutto lo sviluppo larvale.

Come è noto la respirazione degli Anfibi, allo stadio larvale, è in parte affidata alla presenza di branchie che insieme con la pelle sono uno dei primi siti di contatto ed assorbimento con il mezzo esterno.

Nei Pesci, le branchie sono uno dei principali organi target studiati in ecotossicologia ed i cambiamenti nell'apparato respiratorio sono considerati tra le più comuni e riconosciute risposte all'inquinamento dell'ambiente acquatico (Mallatt 1985; Laurent & Perry 1991; Perry & Laurent 1993). Attualmente, eccetto il lavoro compiuto da Lajamanovich e collaboratori (1998), non esistono altri studi che considerano, negli Anfibi, le branchie come organo target e biomarker di esposizione; di conseguenza non vi sono dati sulla morfologia ed ultrastruttura dell'apparato branchiale dopo esposizione a pesticidi organoclorurati.

Parallelamente dunque sono state studiate le modificazioni morfologiche, funzionali ed ultrastrutturali dell'apparato branchiale di *Bufo bufo* esposto a breve ed a lungo termine a concentrazioni subletali di endosulfan.

CAPITOLO I

DECLINO DEGLI ANFIBI

Da alcuni decenni ormai la comunità scientifica ha rivolto la propria attenzione al crescente problema del declino degli Anfibi. Secondo Stuart e collaboratori (2004) un terzo delle specie di anfibi in tutto il mondo risulta minacciata ed almeno il 43% di tutte le specie sta subendo un declino nelle popolazioni. In alcuni casi si può pensare a normali fluttuazioni ma, come suggerito da McCallum (2007), “the current amphibian extinction rate may range from 25,039-45,474 times the background extinction rate for amphibians. It is difficult to explain this unprecedented and accelerating rate of extinction as a natural phenomenon”.

Le potenziali cause sono numerose ed includono sia fattori diretti, di tipo antropogenico, sia fattori indiretti, che agiscono a livello ambientale, definibili come “human-mediate changes”.

L’ipotesi di un “Global Amphibian Decline” è nata a partire dal 1990 dalla constatazione di un fenomeno che interessava molte aree diverse e distanti tra loro (Blaustein 1990; Wake 1991; Pechmann *et al.* 1991). Un’ulteriore conferma di tale ipotesi proviene dalle analisi statistiche compiute su casistiche provenienti da numerosi studi di popolazioni di anfibi in varie aree del pianeta (Houlahan *et al.* 2002). Le tante ipotesi formulate hanno contemplato anche l’incidenza di fattori su vasta scala quali le deposizioni acide, l’innalzamento della temperatura o il trasporto a lunga distanza di inquinanti chimici, in particolare, nei casi di declini “enigmatici” verificatisi in popolazioni presenti in aree remote o protette. Inoltre, è possibile supporre che in molti casi è avvenuta un’interazione sinergica tra i vari fattori (Blaustein *et al.* 2003).

1.1. Principali cause ipotizzate

Nell'ampio range di cause proposte per spiegare il declino nelle popolazioni di anfibi si ricordano qui brevemente:

⊙ **Distruzione, alterazione e frammentazione dell'habitat**

A fronte di una crescente globalizzazione ed iperproduzione, l'agricoltura intensiva ed i cambiamenti d'uso del suolo agricolo hanno stravolto l'assetto tradizionale di molti ambienti e territori dal punto vista ecologico e paesaggistico. Nell'ultimo secolo, la compromissione di molte zone umide è avvenuta a causa delle bonifica per uso agricolo, per l'espansione urbanistica o a causa della captazione di corpi idrici per usi industriali ed agricoli. Inoltre, un grave fattore d'impatto si è rivelata la scomparsa, all'interno degli attuali agroecosistemi, delle zone umide minori quali pozze, stagni, acquitrini e piccole raccolte d'acqua artificiali necessari per la sopravvivenza di alcune specie di anfibi. Infine devono essere considerati anche lo sfruttamento intensivo delle foreste e la conseguente frammentazione dell'habitat forestale, così come l'elevata frequenza di incendi soprattutto nel sud Europa (Scocciati 2001).

⊙ **Acidificazione**

Il grado di acidità degli habitat, in conseguenza delle deposizioni acide o all'azione delle attività dell'uomo, potrebbe essere una delle cause dei fenomeni di declino osservati per alcune specie (Bradford *et al.* 1992).

⊙ **Radiazione ultravioletta**

L'aumento delle radiazioni UV-B attraverso l'atmosfera, in conseguenza della diminuzione dello strato di ozono, costituisce una forte minaccia per gli ecosistemi e gli organismi viventi. Negli Anfibi sono stati

dimostrati effetti negativi diretti su embrioni e larve (ritardo nella schiusa, malformazioni, morte, variazioni nel comportamento) e sugli individui metamorfosati e adulti (alterazioni retiniche e lesioni della cute) (Blaustein *et al.* 1995, 1998; Ovaska *et al.* 1997).

⊙ **Riscaldamento globale**

L'incremento delle temperature ed i connessi cambiamenti nei regimi delle precipitazioni e nel grado di umidità del suolo costituiscono una grave minaccia per gli Anfibi. Il riscaldamento globale è stato infatti indicato come causa di alcuni casi di declino verificatisi nella riserva di Monteverde in Costa Rica (Pounds & Crump 1994; Pounds *et al.* 1999; Pounds 2001).

⊙ **Invasione di specie aliene**

Le introduzioni di specie aliene possono essere causa diretta ed indiretta di cambiamenti ecologici dell'habitat e dei processi biologici che regolano e caratterizzano gli ecosistemi. La diffusione di specie alloctone è stata pertanto ipotizzata per alcuni casi di declino (Fisher & Schaffer 1996; Knapp *et al.* 2001).

⊙ **Patologie infettive**

L'eziologia infettiva è stata considerata tra le cause in conseguenza di alcuni casi di mortalità di massa in popolazioni di anfibi in diverse aree geografiche (Cunningham *et al.* 1996; Berger *et al.* 1998). Inoltre, l'interazione con altri fattori di stress ambientale ha contribuito in notevole misura al diffondersi di agenti patogeni abbassando la soglia di recettività degli Anfibi (Carey *et al.* 1999; Carey 2000).

⊙ **Sostanze chimiche inquinanti**

Gli effetti sull'ambiente dell'uso di sostanze chimiche inquinanti sono stati considerati come un'altra possibile e rilevante causa (Carey & Bryant 1995). Un'ampia gamma di contaminanti può avere effetti negativi sugli anfibi: pesticidi, erbicidi, fungicidi, fertilizzanti, metalli pesanti e numerose altre sostanze (Howe *et al.* 1998; Sparling *et al.* 2000; Glennemeier & Denver 2001; Boone & Bridges 2003).

Le implicazioni dell'uso di contaminanti ambientali quali i pesticidi risultano, ai fini della nostra ricerca, di rilevante importanza e verranno trattati nel paragrafo successivo.

1.2. Gli Anfibi come bioindicatori

Il declino nelle popolazioni di anfibi è un fenomeno che può avere significative implicazioni per l'equilibrio di molti ecosistemi. Gli Anfibi, infatti, sono una componente integrale all'interno di questi ultimi e spesso costituiscono la più alta frazione di biomassa vertebrata giocando un ruolo importante, sia come predatori che come prede, all'interno delle dinamiche trofiche (Duellman & Trueb 1986).

Inoltre, è ormai ampiamente riconosciuta la loro importanza come potenziali indicatori ed eccellenti sentinelle dello stato di salute globale (Blaustein & Wake 1995; Diamond 1996). Questa classe di Vertebrati, infatti, a causa della duplice vita che li porta a colonizzare sia habitats acquatici che terrestri, può essere esposta ad inquinanti in entrambi gli ambienti e subire gli effetti di diverse sostanze chimiche durante le delicate fasi dello sviluppo larvale. Per di più, gli Anfibi sono particolarmente sensibili e vulnerabili potendo assorbire xenobionti attraverso la loro pelle altamente permeabile, le branchie durante le fasi larvali o per mezzo di prede contaminate.

1.3. Pesticidi e Anfibi

Pesticida è un termine generico utilizzato per designare tutte le sostanze o i prodotti chimici usati per controllare, limitare e distruggere alcuni organismi viventi considerati come nocivi ed infestanti. Sono composti molto diversi tra loro e ne esistono moltissimi tipi in commercio, di origine naturale o sintetica, ciascuno attivo rispetto a determinati parassiti.

I pesticidi si possono distinguere in base alla classe chimica cui appartengono in: carbammati, organofosforati, piretroidi ed organoclorurati.

Secondo dati della FAO, sono oggi presenti sul mercato circa 70.000 prodotti chimici differenti, e oltre 1.500 nuovi ne vengono introdotti ogni anno. L'uso, di conseguenza, di una grande quantità e varietà di pesticidi, implica la contaminazione dei diversi comparti ambientali ed effetti diretti ed indiretti su specie non-target (fra cui l'uomo stesso) e sugli ecosistemi.

Il crescente interesse per il declino delle popolazioni di anfibi ha messo in luce la necessità di indagare il potenziale impatto di tali sostanze su questi animali. Contaminazioni da inquinanti agrochimici ed, in particolare modo, organoclorurati sono stati correlate con pattern spaziali di declino in numerose specie di anfibi (Russell *et al.* 1995; Stallard 2001); inoltre, numerosi studi di laboratorio e di campo hanno supportato l'evidenza di queste correlazioni e sono emersi dati sufficienti a confermare, tra i Vertebrati, l'ipotesi di una grande sensibilità della classe degli Anfibi.

Come detto in precedenza, oltre l'elevata vulnerabilità gli Anfibi hanno specifiche esigenze d'habitat. Dato infatti il loro ciclo vitale, molte specie trascorrono la maggior parte del loro sviluppo larvale in corpi d'acqua temporanei, vasche e altri microhabitat acquatici, vicini alle zone

agroculturali dove sono applicati i pesticidi. Se è vero che uova e larve non possono sottrarsi attivamente agli effetti tossici di questi prodotti, in realtà anche gli adulti possono, durante i momenti di estivazione o svernamento, essere minacciati da condizioni di inquinamento.

La contaminazione degli ambienti umidi e dei corpi idrici può avvenire direttamente per irrorazione se presenti nelle vicinanze delle zone coltivate o indirettamente a seguito di fenomeni di ruscellamento e dilavamento delle superficie irrorate. Nel determinare una maggiore o minore contaminazione sono coinvolti diversi fattori: tempo di persistenza e proprietà chimico-fisiche della sostanza utilizzata, forma di somministrazione, quantità e modo di impiego ma anche caratteristiche idrogeologiche dell'area o quelle delle precipitazioni durante i periodi successivi all'applicazione (Scoccianti 2001). Ovviamente, nei vari casi di contaminazione di un habitat, è possibile supporre che quelli più a rischio siano i corpi idrici più piccoli e con scarsa possibilità di ricambio e di conseguenza di diluizione della sostanza dispersa.

Nonostante quanto detto finora, l'ecotossicologia riguardante gli Anfibi ha ricevuto scarse attenzioni comparata con quella di altri Vertebrati (Venturino *et al.* 2003); la letteratura su tali studi tossicologici è comunque piuttosto recente e la maggior parte è stata effettuata in nord America ed in Australia, di conseguenza le specie testate, le dosi e i metodi di trattamento delle colture si riferiscono a tali ambienti (Scoccianti 2001).

Per indagare gli effetti che l'uso dei pesticidi può causare sulle popolazioni di anfibi, nei test di tossicologia vengono utilizzati uova e larve che rappresentano, come già detto, le fasi maggiormente a rischio. Le conseguenze di tali "chemical stressors" possono essere letali, subletali, dirette o indirette. Oltre agli effetti nocivi che derivano

dall'esposizione a concentrazioni elevate di pesticidi è necessario studiare anche gli effetti subletali, che derivano da concentrazioni relativamente basse capaci, agendo con alterazioni a diversi livelli, di generare gravi rischi per la sopravvivenza delle popolazioni.

Gli effetti subletali includono alterazioni nella crescita, nello sviluppo e nel comportamento (Bridges 1997, 2000). Queste anomalie nello sviluppo e nel comportamento possono alterare, di conseguenza, la sensibilità alla predazione (Bridges 1999a), la competizione e decrementare il successo riproduttivo (Bridges 1999b, Relyea & Mills 2001, Boone & Semlitsch 2002). I pesticidi possono causare, inoltre, un indebolimento del sistema immunitario rendendo gli Anfibi maggiormente sensibili a parassiti, alle malattie e alle radiazioni UV (Blaustein *et al.* 2003, Christin *et al.* 2003, Gendron *et al.* 2003). Alcuni composti possono invece interferire con il sistema endocrino (endocrine-disrupting chemicals) e causare danni sul normale sviluppo sessuale, portando a malformazioni sessuali o ad ermafroditismo (Hayes *et al.* 2002b, Hayes *et al.* 2003). Infine, alcuni pesticidi possono colpire indirettamente gli Anfibi alterando le dinamiche della catena alimentare (Boone & Bridges 2003).

CAPITOLO II

ENDOSULFAN

L'endosulfan è un insetticida ed acaricida organoclorurato a vasto spettro usato su un'ampia varietà di colture. Nel 2001, Sparling e collaboratori hanno indicato l'inquinamento da tale pesticida tra le principali cause del drastico declino in popolazioni di anfibi anuri nell'ovest degli Stati Uniti nel corso degli ultimi 15 anni.

L'endosulfan è stato introdotto intorno al 1950 ed è usato, a livello mondiale, come alternativa al DDT e ad altri pesticidi organoclorurati (EFSA 2005); è stato quindi commercializzato in un periodo in cui la sensibilità ambientale e le conoscenze scientifiche circa il destino nell'ambiente e la tossicologia di tali pesticidi era piuttosto scarsa. Oggi nella letteratura scientifica sono disponibili un gran numero di informazioni sull'endosulfan, in relazione alla sua tossicità, al destino e alle concentrazioni nell'ambiente, ai residui ed ai danni sulla salute degli uomini e degli animali.

Negli ultimi decenni numerosi casi di avvelenamento e vari dossier pubblicati a riprova della sua pericolosità, hanno permesso di restringere o bandire l'uso di tale composto. Nonostante ciò, i risultati presentati dal network mondiale di monitoraggio dei POPs (Persistent Organic Pollutant) rivelano che l'endosulfan è ancora il più riscontrato nell'ambiente e che il suo uso è al contrario incrementato, soprattutto nei paesi in via di sviluppo (Pozo *et al.* 2006; Harner *et al.* 2006).

2.1. Campo d'impiego, formulazioni ed uso

L'endosulfan è usato come insetticida per la difesa di agrumi, mandorlo, nocciolo, pomacee, pesco, vite, pomodoro, cucurbitacee con buccia non commestibili, soia, patata, barbabietola da zucchero, riso, cereali, mais, erba medica, trifoglio, lupinella, sulla, tabacco, caffè, tè, cotone, floreali, ornamentali, forestali, pioppo, vivai. È, inoltre, utilizzato nel controllo delle termiti e della mosca tsetse.

L'endosulfan è disponibile in diverse formulazioni quali microgranuli, liquido emulsionabile, polvere bagnabile e polvere secca ed è venduto sotto una grande varietà di nomi: Afidan, Beosit, Cyclofan, Devisulfan, Endocel, Endocide, Endosol, Hexasulfan, Hildan, Insectophene, Malix, Thiodan, Thimul, Thifor, e Thionex. È compatibile con molti altri pesticidi e sono disponibili formulazioni in miscela con carbaryl, dimetoato, fosalone, malathion, metomil, paratio-metile.

La produzione mondiale è stimata intorno a 10.000 tonnellate annue. L'endosulfan è prodotto principalmente in Israele, India, Cina e Sud Korea (Hermann 2003). All'interno dell'Unione Europea l'unico produttore rimane la Germania. Nel 1999 circa il 90% del totale di endosulfan consumato era stato usato nell'area Mediterranea. Spagna, Italia, Grecia e Francia sono i principali paesi consumatori ed il nostro paese è il 2° dopo la penisola Iberica (German Federal Environment Agency 2007). Inoltre, man mano che composti organoclorurati più persistenti come DDT ed eldrin vengono banditi, aumenta l'utilizzo dell'endosulfan, in special modo nei paesi in via di sviluppo (IPEN 2004).

2.2. Classificazione e status

L'Unione Europea e la U.S. Environmental Protection Agency (EPA) classificano l'endosulfan nella categoria Ib come "Highly Hazardous". Al contrario, la World Health Organisation (WHO) lo classifica nella

categoria II come “Moderately Hazardous”. La classificazione adottata dalla WHO risulta inappropriata considerando quella seguita da altre agenzie e paesi e, soprattutto, le attuali conoscenze tossicologiche. Si presume che la causa di questa discordanza sia da ricercare nell’utilizzo da parte del WHO di valori di LD₅₀ assunti dai dati sulla tossicità acuta generati dalle compagnie stesse (Romeo & Quijano 2000).

L’endosulfan anche se non è stato inizialmente annesso nella lista dei Persistent Organic Pollutants della Stockholm Convention è comunque ritenuto come un POP nella Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (LRTAP) e come PTS (Persistent Toxic Substance) dalla UNEP (United Nation Environmental Program).

L’endosulfan è attualmente bandito in: Belize, Singapore, Tonga, Siria, Germania, USA, Brasile, UK, Svezia, Olanda, Colombia, e nello stato indiano del Kerala. L’uso dell’endosulfan è limitato in: Australia, Bangladesh, Indonesia, Cambogia, Giappone, Corea, Khazakhstan, Kuwait, Filippine, Lituania, Sri Lanka, Taiwan, Thailandia, Danimarca, Jugoslavia, Norvegia, Finlandia, Russia, Venezuela, Repubblica Dominicana e Canada.

2.3. Proprietà fisiche e chimiche

L’endosulfan è una miscela diastomerica di due isomeri (α -endosulfan e β -endosulfan) in un rapporto di 7:3 circa.

Tab. 2.1 Proprietà chimico-fisiche dell’endosulfan

IUPAC	6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxid
Chem. Abstracts	6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5,6,9,9-hexahydro-3-oxide
Formula	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S
Massa molecolare	406.95 g/mol

	α -endosulfan	β -endosulfan
Melting Point, °C	106-109	207-213
Solubility in water pH 5, at 25°C, mg/l	0.33	0.32
Vapour Pressure, Pa, 25 °C	1.9 E-03	9.2 E-05
Henry's Law constant Pa m ³ mol ⁻¹ , at 20 °C	0.7-12.9	0.04-2.12
log K _{ow} at pH 5.1	4.63 – 4.74	4.34 - 4.79

2.4. Degradazione e destino nell'ambiente

L'endosulfan è rilasciato nell'ambiente principalmente a causa dell'abbondante uso come pesticida entrando a far parte di suolo, sedimenti e atmosfera (German Federal Environment Agency 2007). La degradazione avviene per fotolisi, idrolisi, biodegradazione ed è strettamente dipendente dalle condizioni di pH, temperatura e dai microorganismi presenti nel terreno. Una volta nell'ambiente il destino dell'endosulfan è differente per i due isomeri e dipende dalle caratteristiche del mezzo in cui si deposita. Il principale prodotto di degradazione è l'endosulfan solfato più stabile e persistente dei composti principali (WHO 1984; ATSDR 2000). In generale, l'isomero β -endosulfan è molto più persistente dell' α -endosulfan; in condizioni di basso pH e anaerobiosi, la vita media di entrambi gli isomeri nel suolo può aumentare fino a 5 mesi (ATSDR 2000). L'EPA (2002) riporta: "Half-lives in acidic to neutral soils range from one to two months for α -endosulfan and from three to nine months for β -endosulfan under aerobic condition. The estimated half-lives for the combined toxic residues (α - and β -endosulfan, endosulfan sulfate) ranged from roughly 9 months to 6 years".

In acqua l'endosulfan ha una vita media da 30 a 200 giorni a seconda della quantità di ossigeno disciolto e del pH (ATSDR 2000) .

Nelle piante l'endosulfan è rapidamente degradato in sulfato e può avere una vita media da 1.95 a 2.74 giorni (WHO 1984).

L'endosulfan può entrare a far parte dell'atmosfera dopo le applicazioni spray o per volatilizzazione dalla superficie delle acque o delle piante (Simonich & Hites 1995); entrando a far parte delle masse d'aria può essere trasportato ad ampie distanze, in aree remote e lontane dalla sorgente di applicazione come in Artico (Gregor & Gummer 1989; Ahmad *et al.* 1995; German Federal Environment Agency 2007).

2.5. Residui e concentrazioni in natura

L'uomo può essere esposto all'endosulfan per inalazione o ingestione di cibo e acqua contaminata, toccando suolo inquinato o fumando sigarette prodotte con tabacco trattato.

I limiti massimi di residui (MRL) variano all'interno dei paesi dell'Unione Europea e a seconda dei vari tipi di frutta e vegetali; il range va da 0.05 mg/kg per cereali e pomodori a 0.5 mg/kg per agrumi, uva e altri tipi di frutta. Secondo l'annuale dossier "Pesticidi nel piatto 2007" realizzato da Legambiente, l'endosulfan risulta tra i principi attivi più spesso riscontrati sia nei campioni irregolari che in quelli regolari, su frutta, verdura e derivati. Nell'Unione Europea secondo un programma di monitoraggio per i residui di pesticidi, l'endosulfan risulta il più frequente (16.9%) (Annual EU-wide Pesticide Residues Monitoring Reports). I livelli di riferimento per l'ADI (acceptable daily intake) è di 0.006 mg/kg/day, secondo il WHO. Nonostante limiti e controlli si sono verificati comunque molti casi di avvelenamento (Oktay *et al.* 2003).

Gli animali selvatici possono essere esposti a tale pesticida consumando piante trattate con il composto, per ingestione o contatto di suolo contaminato e per inalazione.

La contaminazione degli ambienti acquatici può avvenire per scorrimento superficiale dai campi coltivati dopo l'applicazione o per deposizione dopo trasporto nell'atmosfera anche per lunghe distanze.

Recenti dati di monitoraggio riportano la presenza di endosulfan in acque di laghi isolati del Nord America e in laghi montani di alta quota, sulle Alpi e sui Pirenei (UNEP 2002). Tali dati dimostrano come, anche in zone lontane da quelle d'uso, l'endosulfan costituisca un grave pericolo di contaminazione a causa del trasporto atmosferico e della sua alta persistenza.

Le guide linea che specificano i livelli accettabili per le acque dolci e salate sviluppate dall'Australian and New Zealand Environment and Conservation Council, decretano un livello di 0.01 µg/l. L'U.S. EPA raccomanda che i livelli di endosulfan in fiumi, laghi e corsi d'acqua non superi i 74 ppb (ATSDR 2001). Per il Directorate for Environmental Protection and for Chemicals of The Netherlands i limiti massimi permissibili sono riassunti in Tab. 2.2 (van de Plassche 1994).

Tab. 2.2 Concentrazione massima permessa (MPC) per acque di superficie e suolo basata sugli effetti su uccelli e mammiferi

Freshwater [µg/l]	Saltwater [µg/l]	Aquatic combined [µg/l]	Soil [mg/kg]
0.013	0.0004	0.0004	0.05
Bird [mg/kg food]	Mammal [mg/kg food]	Bird/mammal Combined [mg/kg]	
8.1	0.68	0.68	

(da German Federal Environment Agency 2007)

In realtà, i campionamenti di controllo hanno rilevato in natura concentrazioni eccedenti del 25% e più i limiti stabiliti (German Federal Environment Agency 2007).

“Reports of endosulfan residue in food, soil, air, water and body tissues are available from all parts of the globe” (IPEN 2004). Residui di endosulfan sono stati rilevati nell’aria, nell’acqua (di superficie, sotterranea e marina), nel suolo e nei sedimenti in India (UNEP 2002), in acqua e nei sedimenti in Ghana ed Australia (Ntow 2001; Leonard *et al.* 2001), in acque di fiume in Cina (Zhang *et al.* 2004), lagune in Spagna ed acque di superficie e sotterranee in Portogallo e Sud Africa (Cerejiera *et al.* 2003; Dalvie *et al.* 2003), in acque potabili, di superficie, sotterranee e marine in Sud Africa (Fatoki & Awofolus 2004). In Honduras, Messico, Argentina, Giamaica, America Centrale e Caraibi, alcuni laghi, acque costiere e superficiali e ambienti umidi sono risultati contaminati (Gonzalez-Farias *et al.* 2002; Miglioranza *et al.* 2004). Alte concentrazioni di endosulfan sono state rilevate in campioni di corteccia di alberi raccolti in varie parti del mondo (Simonich & Hites 1995, 1997).

2.6. Tossicità ed effetti sulla salute umana

Le proprietà tossicologiche dell’endosulfan sono ben documentate e numerosi sono i dati relativi ai suoi effetti acuti e cronici su animali da laboratorio e sugli uomini.

Un’alta prevalenza di disordini neuro-comportamentali, malformazioni congenite in bambine e anomalie nel sistema riproduttore maschile sono stati ricollegati all’uso (spesso eccessivo ed improprio) dell’endosulfan in villaggi di paesi in via di sviluppo come l’Africa, il sud dell’Asia e l’America Latina (Indian council for medical research 2002; EJF 2002). È del 2000 l’indagine redatta dall’ATSDR sul profilo tossicologico dell’endosulfan.

2.6.1. Tossicità acuta

La tossicità acuta per via orale è più alta di quella per via dermica e per inalazione; la LD₅₀ dell'endosulfan varia a seconda della via di somministrazione ma anche della specie, del veicolo e del sesso dell'animale. I valori riportati di LD₅₀ orale variano da 18 a 160 mg/kg nel ratto, 7.36 mg/kg nel gatto e 77 mg/kg nel cane (Hoechst 1975, 1987, 1990). I valori di LD₅₀ per via dermale, invece, nel ratto sono compresi tra 78 e 359 mg/kg (Smith 1991). L' α -isomero è considerato più tossico del β -isomero (ATSDR 2000).

Si conoscono numerosi casi di avvelenamento acuto da endosulfan. L'ingestione o l'introduzione per via aerea di elevate dosi di endosulfan può condurre a convulsioni e morte. Sintomi di avvelenamento includono iperattività, dispnea, apnea, perdita di coscienza, diarrea, nausea, vomito, insonnia, cianosi, tremori, perdita di equilibrio e mancanza di coordinazione, epilessia (Sang & Petrovic 1999; ATSDR 2000; Kutluhan *et al.* 2003). L'endosulfan causa numerosi effetti neurotossici in uomini ed animali da laboratorio attraverso l'alterazione dei livelli di neurotrasmettitori (colpendo la sintesi, la degradazione e/o i tassi di rilascio e riassorbimento) e interferendo con i legami dei neurotrasmettitori con i loro recettori (EFSA 2005).

2.6.2. Tossicità cronica

L'endosulfan può provocare danni al sistema endocrino, nervoso, circolatorio, riproduttivo, respiratorio, escretorio e sul feto in sviluppo (Naqvi & Vaishnavi 1993; Paul & Balasubramaniam 1997; Sinha *et al.* 1997; Sang & Petrovic 1999). Studi su animali e sugli uomini evidenziano la possibilità di danni a carico di fegato, reni e testicoli (Vengateshwarlu *et al.* 2000).

Una recente ricerca condotta dall'ospedale universitario San Cecilio di Granada ha rilevato, su un campione significativo di donne incinte, la presenza (insieme ad altri composti organoclorurati) di Diolo Endosulfan nella placenta e ha previsto problemi di sviluppo per i bambini nati dalle donne maggiormente esposte a tale composto (Fernandez *et al.* 2007). Residui sono stati ritrovati anche nel latte materno (Cerrillo *et al.* 2005).

L'endosulfan induce l'espressione dell'iNOS e di citochine proinfiammatorie nei macrofagi di topo provocando un'alterazione della risposta immunitaria (Han *et al.* 2007). Studi su animali e sugli uomini non hanno dimostrato inequivocabilmente la carcinogenicità (EFSA 2005; German Federal Environment Agency 2007), ma alcuni studi hanno suggerito che il composto possa essere genotossico e mutageno. Usha Rani e colleghi (1980, 1986) hanno riscontrato un incremento statisticamente significativo nelle aberrazioni cromosomali degli spermatozoi di topo ma non, un incremento altrettanto significativo, nella frequenza dei micronuclei negli eritrociti del midollo osseo di gatto. Induzione di aberrazioni cromosomali sono state inoltre osservate in *Drosophila melanogaster* (Velazquez *et al.* 1984). Dati raccolti da esperimenti in vitro ed in vivo dimostrano che l'endosulfan può essere ritenuto mutagenico e clastogenico, e può indurre effetti sulla cinetica cellulare (Yadav *et al.* 1982; Pandey *et al.* 1990; Chaudhuri *et al.* 1999).

2.6.3. Endocrine disruption

Diverse evidenze sperimentali hanno provato che l'endosulfan è un distruttore endocrino e, come tutti gli endocrine disrupting chemicals, può interferire con le normali comunicazioni cellulari e minare la sintesi e l'attività degli ormoni naturali, alterando le loro normali funzioni regolatrici (Soto *et al.* 1994); ha proprietà estrogeniche comparabili a

quelle del DDT e compete con l'estradiolo per il legame con i recettori estrogenici (Anderson *et al.* 2000; Grumfeld & Jorgensen 2004). L'endosulfan può causare ritardo della maturità sessuale, danneggiare il sistema riproduttivo maschile, colpendo la qualità e quantità degli spermatozoi (Saiyed *et al.* 2003); inibisce la biosintesi di androgeni testicolari in animali da laboratorio e può provocare danni renali e testicolari (Pandey *et al.* 1990; Sang & Petrovic 1999; Dalsenti *et al.* 1999).

2.7. Ecotossicità

Esiste un'ampia letteratura che testimonia la tossicità dell'endosulfan sugli organismi selvatici non-target, ed è stato dimostrato che l'insetticida è altamente tossico per gli organismi acquatici anche nel rispetto dei livelli di applicazione (Karim *et al.* 1985; Romeo & Quijano 2000; Leonard *et al.* 2001; Hermann 2003; Swartz *et al.* 2003).

2.7.1. Invertebrati acquatici

La LC₅₀ per diverse specie di gamberi varia da 0.04 a 17 µg/l. Il più basso valore di LC₅₀ a 96 h riportata per il crostaceo *Penaeus duorarum* è di 0.04 µg/l, per *Crangon septemspinosa* di 0.2 µg/l, mentre per altre specie di crostacei è più grande di 0.4 µg/l (Schimmel *et al.* 1977).

2.7.2. Uccelli

L'Endosulfan è da moderatamente ad altamente tossico per molte specie di uccelli; i valori di LD₅₀ per via orale nell'anatra selvatica variano da 31 a 243 mg/kg, nei fagiani da 80 a 320 mg/kg (Hudson 1984).

2.7.3. Pesci

L'endosulfan è altamente tossico per i Pesci ed Invertebrati acquatici (Sunderam *et al.* 1992). Lo scorrimento superficiale da zone

agroculturali, nonostante il rispetto delle norme, ha provocato massicce morie di pesci in varie parti del mondo (EJF 2002, IPEN 2004).

La media geometrica per i valori di LC₅₀, calcolata da 41 studi di tossicità acuta condotti su diverse specie di pesci, è risultata 2.0 µg/l; la media stimata per la protezione del 95% di tutte le specie risulta in una LC₅₀ di 0.14 µg/l (log distribution) e in una LC₅₀ di 0.13 µg/l (normal distribution) (German Federal Environment Agency 2007).

Tab. 2.3 Tossicità acuta dell'endosulfan su Pesci

Tipo di studio	Specie	LC ₅₀	Reference
Static	rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	1.6 µg/l	Nebeker <i>et al.</i> 1983
Dynamic	rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	0.3 µg/l	
Static	fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	0.8 µg/l	
Dynamic	fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	1 µg/l	
Semi-static	(<i>Channa punctata</i>)	4.5-7.5 µg/l	Haider & Imbaray 1986
Static	juvenile catfish (<i>Clarias batrachus</i>)	0.014 µg/l	Gopal <i>et al.</i> 1981
Static	bluegill sunfish (<i>Lepomis macrochirus</i>)	1.8-3.3 µg/l	Fischer 1984

Numerosi effetti fisiologici, morfologici ed etologici sono riportati in letteratura a concentrazioni di endosulfan comprese tra 0.5 e 5 µg/l (Jauhar & Kulshrestha 1985; Sinha *et al.* 1991). Studi istologici hanno dimostrato effetti acuti sulle branchie con evidente infiammazione,

necrosi e distacco dell'epitelio respiratorio (Zaccone *et al.* 1989; Jonsson & Toledo 1993). Cambiamenti istopatologici nelle branchie, nel fegato e nel cervello sono stati riportati in pesci esposti in acque contaminate da endosulfan (Matthiessen & Roberts 1982). Recentemente Dutta e collaboratori (2006) hanno riportato, attraverso analisi istopatologica, gravi alterazioni nella struttura dei testicoli in *Lepomis macrochirus* dopo esposizione per due settimane a 0.1 µg/l di endosulfan.

Un'esposizione a breve termine a concentrazioni subletali, in diverse specie di pesci, provoca una crescente attività di nuoto ed elevati livelli di glucosio nel sangue (Gopal *et al.* 1980; Singh & Srivastava 1981). Aumentati livelli di perossidazione lipidica sono stati riscontrati nel fegato, nei reni e nelle branchie di *Channa punctatus* dopo esposizione a bassi livelli di endosulfan per 24 h (Pandey *et al.* 2001). Danni neuronali ed alterato comportamento motorio (iperattività) e di alimentazione (riduzione) sono stati ritrovati in *Thalassoma pavo* esposto a 1.3 µg/l di endosulfan (Giusi *et al.* 2005). In *Oryzias latipes* 0.01, 0.10, e 1,0 µg/l di endosulfan, dopo 24 h di esposizione alla schiusa, provocano effetti negativi sulla crescita, sul comportamento e sulla performance riproduttiva (Gormley & Teather 2003).

2.8. Bioaccumulo e biomagnificazione

Secondo l'EPA (2002) l'endosulfan può avere "a high potential to bioaccumulate in fish, and hence may affect animals higher up the food chain". I valori di BCF (measured bioconcentration factors) riportati in vari organismi acquatici variano in un ampio range (German Federal Environment Agency 2007); in ostriche e bivalvi i valori di BCF sono □100 (Rajendran & Venugopalan 1991); in altri organismi acquatici e nei Pesci i fattori di bioconcentrazione vanno da 1,400X fino a 11,000X (De la Cruz & Yarbrough 1982; Toledo & Jonsson 1992; Jonsson & Toledo 1993).

Klemens e collaboratori nel 2003 hanno rilevato, all'interno di un'area protetta in Costa Rica, che l'endosulfan è il composto presente ai livelli più elevati in diverse specie di anfibi, tartarughe ed uccelli.

L'endosulfan è stato riscontrato nel tessuto adiposo e nel sangue di orsi polari in Svalbard (il valore medio dell' α -endosulfan era di 3.8 ± 2.2 ng/g wet weight (min-max: 1.3-7.8 ng/kg) e 2.9 ± 0.8 ng/g per il β -endosulfan (min-max: 2.2-4.3 ng/g) (Gabrielsen *et al.* 2004). Nonostante ciò, i dati riguardanti eventuali fenomeni di biomagnificazione sono ancora insufficienti (German Federal Environment Agency 2007).

2.9. Endosulfan ed Anfibi

Rispetto ad altri pesticidi poco numerosi ed esaustivi sono i test tossicologici riguardanti gli effetti dell'endosulfan sugli Anfibi.

Innanzitutto la maggior parte degli studi si è concentrata sulla tossicità acuta (Gopal *et al.* 1981; Vardia *et al.* 1984; Berrill *et al.* 1998). Gopal *et al.* (1981) hanno riportato che l'endosulfan è un ordine di magnitudine più tossico per i girini di *Rana tigrina* esposti per 24 h che per *Clarias batrachus* e ninfee di *Enallagma* spp.

Per quanto riguarda la tossicità cronica, in *Ambystoma barbouri* Rohr e collaboratori (2003a) hanno dimostrato che un'esposizione a lungo termine a 10 e 100 $\mu\text{g/l}$ di endosulfan causa una diminuzione della sopravvivenza e della crescita delle larve, insieme a deformità degli arti, stress respiratorio ed alterazione del comportamento.

In *Notophthalmus viridescens* basse dosi di endosulfan (5 ppb), alterando la morfologia delle ghiandole feromonalì, interferiscono con i segnali ormonali e il successo riproduttivo (Park *et al.* 2001; Park & Propper 2002). Recentemente, effetti genotossici da parte dell'endosulfan sono stati riscontrati in larve di *Hyla pulchella* attraverso il test dei micronuclei (Lajmanovich *et al.* 2005).

CAPITOLO III

SPECIE ED ORGANO TARGET

3.1. Specie studiata

Bufo bufo (Linnaeus, 1758) - Rospo comune

Inquadramento sistematico	
Phylum	<i>Chordata</i>
Classe	<i>Amphibia</i>
Ordine	<i>Anura</i>
Famiglia	<i>Bufo</i>
Genere	<i>Bufo</i>
Specie	<i>Bufo bufo</i>

Il rospo comune è, tra le specie di anfibi presenti in Italia, una fra le più diffuse; è una specie opportunista capace di colonizzare qualsiasi tipo d'ambiente, anche ad elevato impatto antropico. The World Conservation Union lo classifica nella categoria "Lower Risk" (IUCN 1999). Nonostante quanto detto, negli ultimi decenni il numero di popolazioni si è ridotto in maniera significativa parallelamente al declino generale delle altre specie di anfibi. Tra i fattori responsabili identificati vi sono: l'elevato traffico automobilistico che provoca vere e proprie stragi durante le migrazioni riproduttive (Ferri 2000); il rapporto sessi fortemente sbilanciato a favore dei maschi (da 5:1 sino a 20:1) che

causa ridotte dimensioni effettive di molte popolazioni (Castellano & Giacoma 1990). In ultimo, ma al primo posto tra i fattori di rischio ed alla luce di questo nostro studio, vi è la progressiva scomparsa dei siti adatti alla riproduzione ed il deterioramento di quelli rimasti a causa delle pratiche agricole intensive (Pavignano & Giacoma 1990).

3.1.1. Caratteristiche generali

Il rospo comune ha una distribuzione eurocentrasiatica-maghrebina. È assente in Irlanda, Sardegna, Corsica, Baleari, Malta e Creta. In Italia sono tradizionalmente riconosciute due sottospecie: nelle regioni peninsulari la sottospecie *Bufo bufo spinosus* (Linnaeus 1758), nelle regioni alpine la sottospecie *Bufo bufo bufo* (Daudin 1802). È una specie diffusa su un'ampia fascia altitudinale, dal livello del mare fino ad altitudini medio-alte come 2200m (Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia 2006).

Bufo bufo è tra le tre specie di bufonidi europei quello di maggiori dimensioni; presenta corpo tozzo con cute verrucosa, ha pupilla orizzontale ellittica, l'iride è rossa o color rame più o meno screziata di nero; nel maschio può presentare delle pigmentazioni dorate o appena rossastre. Le ghiandole parotoidi sono molto sviluppate e non presenta il sacco vocale. La colorazione dorsale è variabile dal bruno giallastro o rossastro al grigio-olivastro, con macchie e marmorizzazioni scure; le parti ventrali sono invece bianco-sporche o grigiastre, soprattutto in corrispondenza delle cosce; la pigmentazione delle parti inferiori può essere uniforme o presentare una colorazione variegata marrone o nerastra. Le dita del piede presentano tubercoli sottoarticolari doppi, il lato interno del tarso è privo di plica.

Il dimorfismo sessuale è molto accentuato, i maschi hanno di solito dimensioni più piccole (fino a 10 cm di lunghezza, contro i 18-21 cm

delle femmine) e presentano arti anteriori più robusti e provvisti di callosità cornee nerastre particolarmente evidenti nel periodo riproduttivo; la femmina ha la pelle meno verrucosa e la palmatura dei piedi è meno estesa.

Il periodo di attività e la stagione riproduttiva hanno, generalmente, inizio a febbraio e durano fino a giugno ma possono variare a seconda delle condizioni meteorologiche, della latitudine e dell'altitudine; l'attività del rospo comune è soprattutto notturna (Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia 2006).

3.1.2. Riproduzione

Come in tutti gli Anuri, il rospo comune è strettamente legato all'acqua per la sua riproduzione. I maschi attraggono le femmine emettendo dei suoni di richiamo. I luoghi in cui avviene l'accoppiamento sono rappresentati, generalmente, da stagni perenni con una profondità che si aggira intorno ai 40 cm, ma che può arrivare anche fino ai 70 cm. Il luogo di riproduzione è rappresentato spesso dallo stagno natio che il maschio raggiunge compiendo delle vere e proprie migrazioni e coprendo lunghe distanze.

L'accoppiamento è ascellare e dal momento della formazione della coppia e la deposizione delle uova possono trascorrere diversi giorni durante i quali la competizione tra i maschi è elevata. La deposizione avviene in acque ferme o debolmente correnti e dura varie ore. Ciascuna ovatura è composta da due cordoni gelatinosi, contenenti da 4000 a 6000 uova nere con diametro di 1.5-2 mm, che vengono fatti aderire alla vegetazione sommersa. La schiusa avviene dopo circa due settimane e l'embrione rimane attaccato al cordone tramite gli organi adesivi. Lo sviluppo larvale dura dai due ai tre mesi. I neo-metamorfosati hanno dimensioni di poco superiori al centimetro. La maturità sessuale nei

maschi è raggiunta dopo 3-4 anni e nelle femmine dopo 4-5 anni (Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia 2006).

3.1.3. Habitat ed ecologia

Come detto precedentemente, *Bufo bufo* è un anuro abbastanza comune in tutti gli ambienti sia naturali che di origine antropica. Il rospo comune si adatta ad una vastissima gamma di ambienti, dai boschi di conifere, alle campagne, ai prati, ma lo si può incontrare anche in ambienti privi di acqua quali, ad esempio, zone aride incolte e boschi di macchia mediterranea; non è raro trovarlo anche in città. Conduce vita generalmente terrestre ma, nel periodo della riproduzione, si trova in qualsiasi luogo umido (purché la temperatura dell'acqua sia tra gli 8°C e i 27°C); utilizza laghi, fiumi, stagni, pozze, acquitrini, vasche in cemento nonché torbiere e risaie. Predilige acque lentiche ma lo si può trovare anche in acque lotiche a corrente non troppo rapida. È attivo soprattutto nelle ore crepuscolari e notturne, e particolarmente con tempo piovoso o comunque molto umido; durante il giorno rimane nascosto in vari tipi di rifugi. Il suo range di temperatura va dai 10°C ai 20°C. Durante la stagione avversa, inverno o estate, *Bufo bufo* tende a cadere in uno stato di torpore che può durare da qualche mese ad alcune settimane, a seconda se si trova ad alte quote o in pianura. A tale scopo il rospo comune utilizza cavità naturali di vario tipo all'interno delle quali può compiere movimenti verticali a seconda dei gradienti termici che si instaurano; vengono utilizzate tane di micromammiferi, ceppaie marcescenti e tutto ciò che lo protegge dal rigore invernale e fa conservare un certo grado di umidità, come grotte, accumuli di detriti, ruderi (Scillitani *et al.* 1996).

Gli adulti sono prevalentemente carnivori e si nutrono solo sulla terra ferma. Durante l'ibernazione, l'estivazione e la fregola digiunano. La

loro dieta è composta da vermi, molluschi, e soprattutto insetti. La cattura della preda avviene proiettando fulmineamente la lingua vischiosa in fuori e, se questa è di grossa taglia, viene ingoiata con l'aiuto degli arti anteriori (Tripepi *et al.* 1999).

3.1.4. Larve di *Bufo bufo*

Le larve degli anfibii rappresentano gli stadi di sviluppo post-embryonali non riproduttivi, conducono vita acquatica e respirano attraverso branchie esterne e interne, e vanno incontro a processi metamorfici che le portano alla fase adulta. Fra i tre ordini di Anfibi, le larve degli anuri, si discostano molto dagli stadi post-metamorfici dal punto di vista morfologico, fisiologico e trofico.

Le larve di *Bufo bufo* si trovano generalmente nei torrenti, negli stagni, nei laghi ma anche nelle raccolte d'acqua temporanee quali pozze o fossati; esse sono vegetariane, si alimentano rasgando il substrato o nutrendosi delle particelle sospese nell'acqua, ma non disdegnano cibo di origine animale ed è frequente il cannibalismo. Questo tipo di alimentazione richiede la presenza di parti buccali specializzate e di un apparato digerente estremamente differenti rispetto a quelli che caratterizzano l'adulto. Il loro apparato boccale, dotato di una forte presa a ventosa, aiuta, inoltre, i girini a mantenersi aderenti al substrato e a non farsi portare via dalla corrente.

Alla schiusa, il girino ha un aspetto pisciforme; il corpo è breve (circa il 25-35% della lunghezza totale) e di forma ovoidale. Il girino presenta colorazione bruno-nerastra o nera superiormente e grigio-nerastra nelle parti inferiori; la coda è compressa lateralmente, molto più lunga che alta, ed è arrotondata all'estremità (Tripepi *et al.* 1999).

Al principio dello sviluppo le larve di *Bufo bufo*, come in tutti gli Anuri, hanno branchie esterne anteriormente alle quali si trova una piega

cutanea. Le branchie vengono poi incluse nella camera opercolare che si apre all'esterno attraverso lo spiracolo a forma di imbuto posto sul lato sinistro. Gli occhi del girino sono leggermente prominenti e privi di palpebra e le narici sono piuttosto ampie. La cavità orale è provvista di file di sottili dentelli che derivano dall'ispessimento dell'epidermide, i cheratodonti; essi sono disposti su due file sul labbro superiore e tre sul labbro inferiore.

Durante la sua vita larvale il girino mantiene il suo aspetto fusiforme mentre gli arti si sviluppano con il procedere dell'accrescimento diventando però funzionali solo verso il completamento della metamorfosi.

3.2. Apparato branchiale degli Anfibi Anuri

Durante la fase larvale acquatica la maggior parte degli anfibi respira mediante la cute e l'apparato branchiale; negli Urodela le branchie sono esterne per tutta la durata della vita larvale mentre nelle larve degli Anuri, dopo i primissimi stadi di sviluppo, le branchie esterne regrediscono e vengono sostituite da branchie interne.

Le branchie esterne o transienti sono costituite da 3 filamenti portati dagli archi branchiali III, IV e V (Hourdry 1974). I filamenti sono costituiti da un supporto connettivale riccamente vascolarizzato rivestito da un epitelio bistratificato attraverso il quale si effettuano gli scambi gassosi (Brunelli *et al.* 2004; Tripepi *et al.* 1999).

Dopo la regressione delle branchie esterne, le branchie interne compaiono sul III, IV, V e VI arco branchiale. Le quattro paia di branchie sono localizzate in due cestelli branchiali, situati ai lati del cuore, ricoperti dall'opercolo. La camera branchiale è separata dalla faringe da un lembo epiteliale che sorge dal pavimento della cavità boccale: il velo ventrale. L'acqua entra nel sistema branchiale attraverso la cavità

boccale, attraversa le fessure branchiali e, infine, passa nella camera opercolare uscendo poi dallo spiracolo (Gradwell 1972; McIndoe & Smith 1984). La cartilagine cerato branchiale agisce da supporto per il cestello branchiale; il velo ventrale funge da valvola respiratoria durante l'inspirazione e, grazie alla secrezione di muco sulla sua superficie, riesce ad intrappolare particelle di cibo in sospensione (Gradwell 1970).

Il sangue viene fornito da quattro archi aortici, le arterie branchiali.

Il sistema branchiale appare come una struttura ramificata costituito da due porzioni: dorsalmente i filtri branchiali e ventralmente i ciuffi branchiali. I filtri branchiali, che sono orientati trasversalmente rispetto agli archi branchiali, sono delle estroflessioni di tessuto connettivo che ricopre l'arco branchiale. Nella parte inferiore gli archi branchiali portano i ciuffi, irregolarmente ramificati, simili a fitte arborescenze.

Le branchie dei girini, a differenza di quanto accade nelle larve di Urodela e Gimnofioni, costituiscono un sistema piuttosto complesso in conseguenza del loro duplice ruolo: respiratorio ed alimentare.

La porzione dorsale della branchia costituita dai filtri branchiali, infatti, è una struttura deputata all'alimentazione ed ha la funzione di intrappolare le particelle alimentari che oltrepassano il velo ventrale ed entrano nella faringe. La funzione dei filtri è quella prevalentemente meccanica di trappola per il cibo e quindi la sua composizione cellulare risulta piuttosto semplice ed è priva di cellule specializzate (Wassersug 1972). Al contrario, la porzione ventrale costituita dai ciuffi branchiali rappresenta la parte maggiormente implicata nella funzione respiratoria (McIndoe & Smith 1984). Essi appaiono costituiti da un sostegno connettivale piuttosto ridotto, sono molto vascolarizzati e la composizione cellulare rispecchia le esigenze fisiologiche di questa porzione della branchia, come vedremo in seguito.

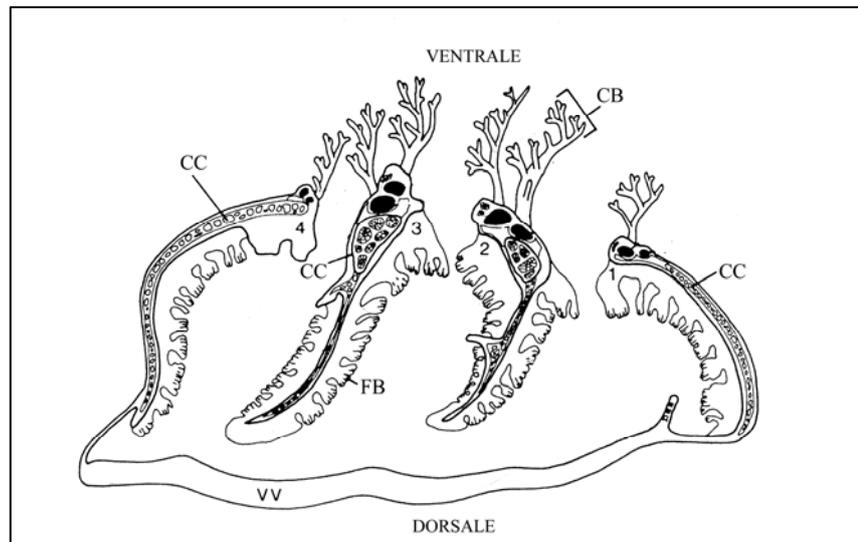


Fig. 3.1 Apparato branchiale. (CC) cartilagine; (FB) Filtri branchiali; (CB) Ciuffi branchiali; (VV) Velo ventrale (Modificato da: McIndoe & Smith 1984)

3.3. Le branchie interne in *Bufo bufo*

Le branchie interne dei girini di *Bufo bufo* compaiono allo stadio di sviluppo 23-24 secondo Gosner (1960) subito dopo la regressione delle branchie esterne.

Come detto in precedenza, il lato dorsale degli archi branchiali è ricoperto da una piastra ordinata di filtri branchiali che svolgono funzione alimentare; la parte propriamente respiratoria è rappresentata dai ciuffi branchiali situati sulla porzione ventrale e laterale degli archi branchiali (Fig. 3.2). I ciuffi che si trovano sul secondo e terzo arco branchiale sono molto più numerosi di quelli che sono posti sul primo e sul quarto.

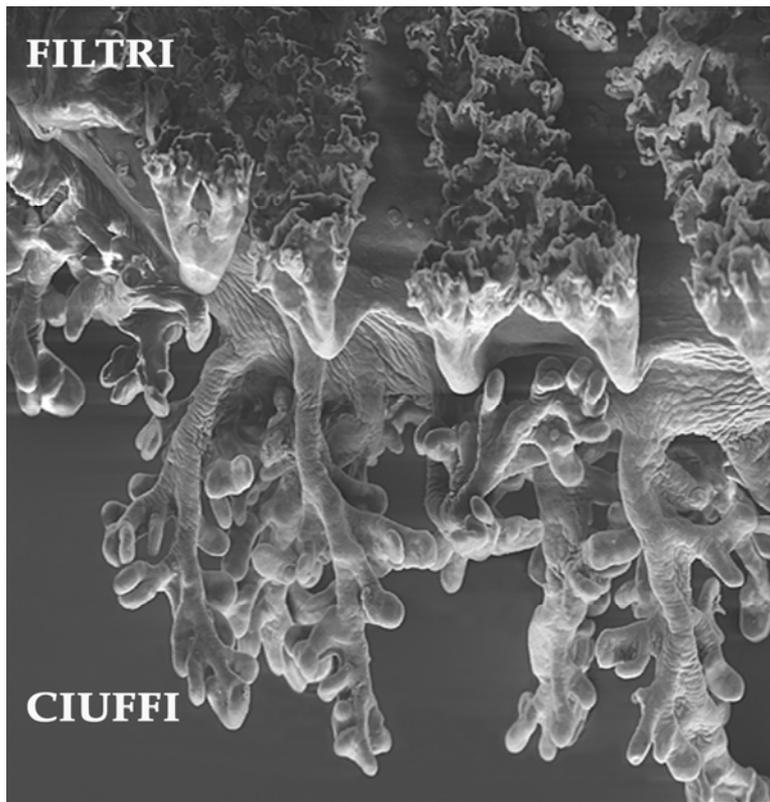


Fig. 3.2 Struttura delle branchie di *Bufo bufo* osservate al SEM. Sono visibili le due porzioni: dorsalmente i filtri branchiali e ventralmente i ciuffi. 140x

3.3.1. Filtri branchiali

I filtri branchiali di *Bufo bufo* sono costituiti da un asse portante appiattito in senso dorso-ventrale, caratterizzato da un andamento leggermente zigzagante, da cui si dipartono brevi ramificazioni laterali di forma lamellare (Figg. 3.2, 3.3). Tali processi laterali sono costituiti da tessuto connettivo di sostegno rivestito da uno o due strati di cellule epiteliali; all'apice l'epitelio si ispessisce ed è formato da cellule cubiche (Fig. 3.4).

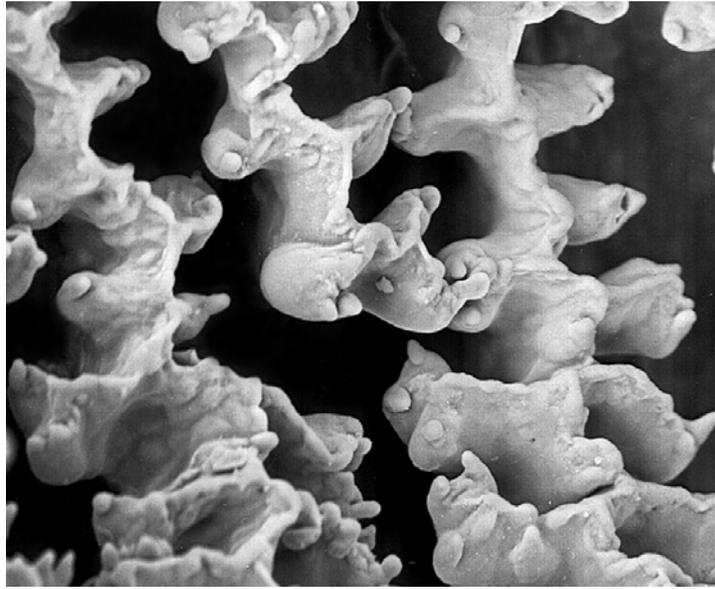


Fig. 3.3 Filtri branchiali di *Bufo bufo* osservati al SEM. 500x

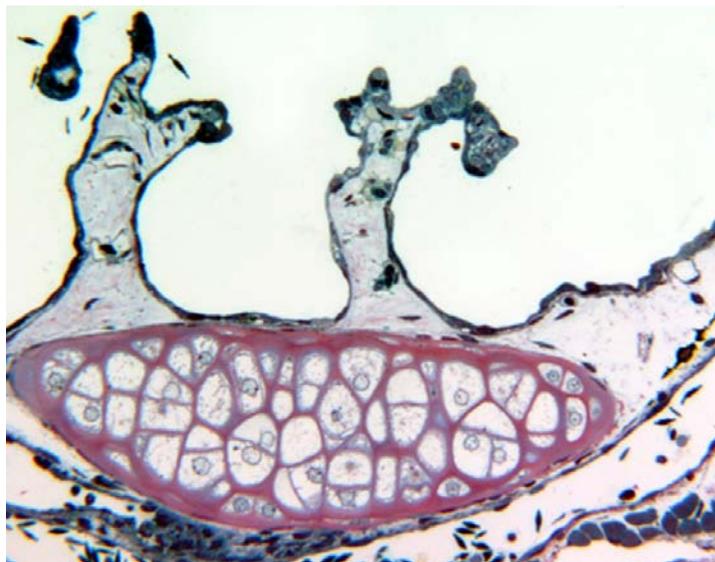


Fig. 3.4 Sezione trasversale dei filtri di *Bufo bufo* osservati al MO. 40x

A livello ultrastrutturale, nell'epitelio dei filtri branchiali si distinguono: cellule basali, cubiche e pavimentose. Le prime hanno una tipica forma allungata e costituiscono lo strato a diretto contatto con il tessuto connettivo. Le cellule cubiche hanno un alto rapporto nucleo/citoplasma e possono costituire uno strato epiteliale intermedio nella porzioni terminali dei filtri. Le cellule appiattite di superficie, le pavimentose, sono caratterizzate da una superficie libera ricoperta da microcreste e contengono un apparato di Golgi con numerose vescicole associate che formano uno strato continuo sottostante la membrana citoplasmatica.

3.3.2. Ciuffi branchiali

I ciuffi branchiali di *Bufo bufo* presentano un asse principale di diametro maggiore, detto rachide, dal quale si dipartono diverse ramificazioni terminali (Fig. 3.5). I ciuffi sono ricoperti da cellule epiteliali poligonali dotati sulla loro superficie, di numerose microcreste e microvilli.

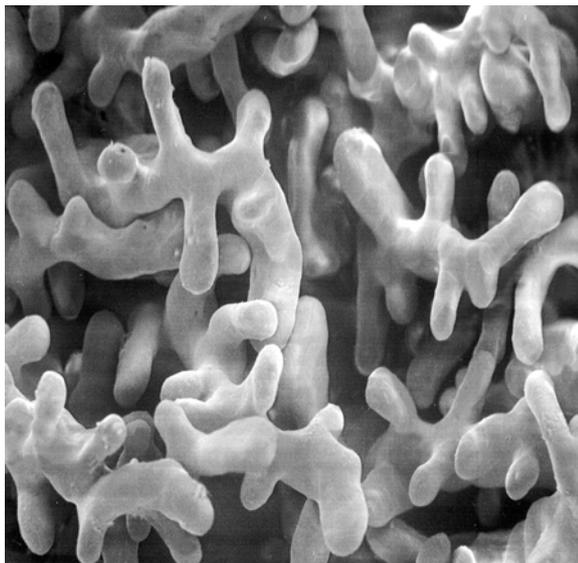


Fig. 3.5 Immagine al SEM dei ciuffi branchiali: ramificazioni laterali.550x

L'epitelio del rachide dei ciuffi appare bi- o multi-stratificato; in corrispondenza degli apici del ciuffo, l'epitelio si presenta con un'organizzazione molto più semplice e sottile.

Il tessuto epiteliale è costituito da 4 tipi cellulari: cellule basale, cubica, pavimentosa e mitochondria-rich cell.

- **Cellula basale (BC)**

Le cellule basali hanno una tipica forma appiattita e formano lo strato interno dell'epitelio a diretto contatto con il sottostante tessuto connettivo. Anche il nucleo appare appiattito ed è circondato da una scarsa quantità di citoplasma che si prolunga a formare lembi citoplasmatici, separando il tessuto connettivo dallo strato interno dell'epitelio (Fig. 3.6).

- **Cellula pavimentosa (PVC)**

Le cellule pavimentose sono la tipologia cellulare più abbondante sulla superficie esterna dell'epitelio respiratorio. La superficie cellulare è caratterizzata dalla presenza di numerose microcreste; sono cellule particolarmente appiattite ed allungate (Fig. 3.6); il nucleo ha forma irregolare ed appare anch'esso appiattito e di dimensioni tali da occupare gran parte del volume cellulare. Il citoplasma è caratterizzato dalla presenza di numerosi granuli di secrezione che prendono origine dall'apparato di Golgi e riversano il loro contenuto sulla superficie esterna formando lo strato di muco in cui sono immerse le microcreste.

- **Cellula cubica (CC)**

Le cellule cubiche appaiono voluminose, con un elevato rapporto nucleo/citoplasma. Le altre caratteristiche ultrastrutturali sono simili a quelle riscontrate nelle cellule pavimentose; sono connesse con lo strato sottostante attraverso desmosomi.

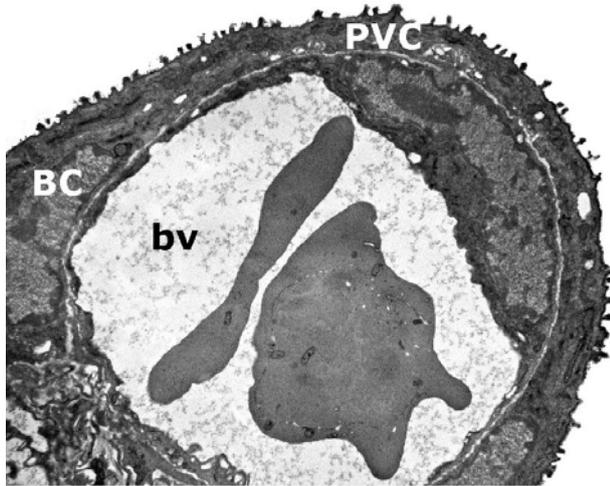


Fig. 3.6 Apice di ciuffo branchiale di *Bufo bufo* osservato al TEM. Visibili intorno al vaso (bv) una cellula pavimentosa (PVC) appiattita e una cellula basale (BC). 3000x

- **Mitochondria-rich cell (MRC)**

Il nome di questo tipo cellulare deriva dalla presenza di numerosi mitocondri disposti prevalentemente nella porzione apicale del citoplasma. I mitocondri mostrano dimensioni più o meno costanti e sono di forma tondeggianti od ovoidali; all'interno, le creste mitocondriali sono ben organizzate e numerose. Il nucleo, meno elettron denso del citoplasma, ha contorni irregolari ed è localizzato nella porzione basale della cellula (Fig. 3.7). Nel citoplasma della cellula è presente un apparato di Golgi ben sviluppato e numerosi granuli di secrezione. Le MRCs sono numerose nella porzione basale del ciuffo branchiale mentre tendono a diventare più rare nella porzione apicale. Nelle MRCs la superficie apicale è interamente ricoperta da numerosi microvilli sottili ed allungati nettamente diversi dalle microcreste delle cellule pavimentose (Fig. 3.8).

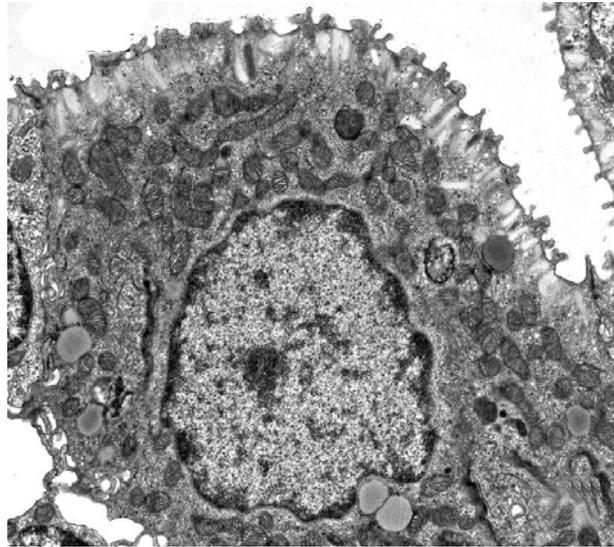


Fig. 3.7 MRC in un ciuffo branchiale di *Bufo bufo*. Sono evidenti i mitocondri ed i microvilli apicali. 4400x

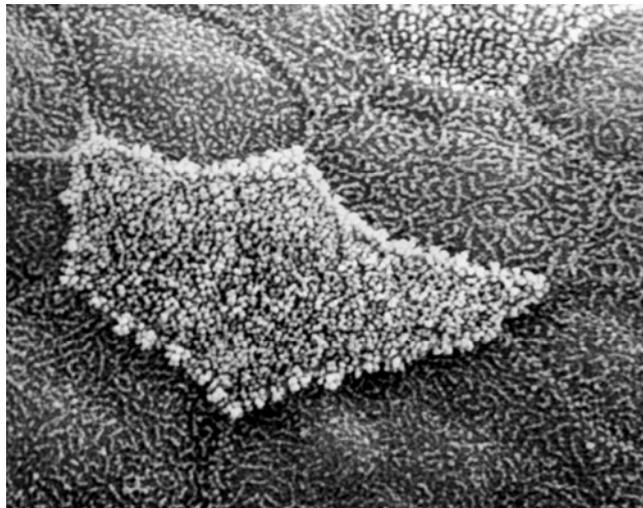


Fig. 3.8 MRC osservata al SEM. 3000x

CAPITOLO IV

MATERIALI E METODI

4.1. Larve: raccolta e mantenimento

Tutte le larve di *Bufo bufo* utilizzate sono state prelevate, come ovature, dallo stagno permanente Lago della Paglia, situato nel comune di Fagnano Castello (CS) a 1082 m slm.

In laboratorio lo stadio di sviluppo è stato determinato in base ad alcuni caratteri morfologici distintivi e in accordo con le apposite tavole cronologiche di sviluppo (Gosner 1960). In tutti gli esperimenti eseguiti sono state scelte larve con branchie interne completamente opercolate (stadio di sviluppo 25).

Prima sia degli esperimenti di tossicità acuta che di quella cronica, le larve sono state mantenute per quattro giorni in acquari da 50 litri con acqua di rubinetto. La temperatura è stata mantenuta costante intorno ai $22^{\circ} \pm 1^{\circ}C$ ed i girini sono stati nutriti *ad libitum* con spinaci bolliti.

4.2. Tossicità acuta

In questa fase del nostro studio sono stati condotti due set di esperimenti.

Nel primo si è proceduto esponendo i girini a concentrazioni crescenti di endosulfan al fine di valutare la concentrazione letale a 96 h.

Nel secondo set, invece, le larve sono state esposte per 96 h ad una concentrazione sub-letale con lo scopo di fornire una descrizione morfo-funzionale ed ultrastrutturale delle modificazioni indotte a livello dell'apparato branchiale.

L'endosulfan (Chem Service Inc., West Chester, PA, USA purity 99%) è stato disciolto in acqua di rubinetto per ottenere le seguenti concentrazioni nominali: 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4, 0.5, 0.6 mg/l.

Nel primo set di esperimenti 30 individui, allo stadio 25 di Gosner e con dimensioni più o meno simili, sono stati scelti e trasferiti per ogni unità sperimentale in acquari da 30 L. Gli animali di controllo sono stati mantenuti in acqua di rubinetto. In accordo con le procedure standard (ASTM 1997) è stato usato il sistema di esposizione statico, di conseguenza nell'arco delle 96 h l'acqua non è stata rinnovata. Infatti, come riportato in altri studi (Broomhall 2004), i livelli di biodegradazione dell'endosulfan dopo tale periodo risultano minori del 15% della concentrazione iniziale.

Gli esperimenti sono stati condotti con un ciclo 12:12 h di luce-buio, un pH medio di 7.3, e temperatura dell'acqua di $22^{\circ} \pm 1$ °C. Durante l'esposizione gli animali non sono stati alimentati. Per ciascuna concentrazione testata, incluso il controllo, sono state eseguite tre repliche.

Una volta determinata la concentrazione letale, è stato allestito il secondo set di esperimenti; 35 girini di *Bufo bufo* sono stati esposti per 24, 48 e 96 h alla concentrazione subletale di 0.2 mg/l ed altri 35 individui mantenuti in condizioni basali. Sia per gli animali esposti ad endosulfan che per i controlli sono state mantenute le stesse condizioni sperimentali precedentemente descritte e sono state effettuate due repliche.

4.3. Tossicità cronica

I test cronici sono stati eseguiti per determinare gli effetti di una esposizione a lungo termine ad endosulfan. Gli esperimenti sono stati condotti in due anni successivi utilizzando gli stessi metodi e le stesse condizioni sperimentali ottenendo così due repliche.

Il periodo di esposizione ha coperto l'intera fase di sviluppo larvale: dallo stadio 25 secondo Gosner (1960) fino allo stadio 46 (fine della metamorfosi e completo riassorbimento della coda).

L'endosulfan è stato disciolto in acqua di rubinetto per ottenere le seguenti concentrazioni nominali: 0.01 mg/l (Bassa), 0.05 mg/l (Media) o 0.1 mg/l (Alta).

Le concentrazioni utilizzate nei test cronici si basano sui livelli di sensibilità delle larve di *Bufo bufo* ottenuti durante quelli acuti. La più bassa concentrazione testata è stata scelta, inoltre, perché corrispondente ai criteri di qualità delle acque di superficie stabilite dall'EPA per l'endosulfan (2001).

Dopo la fase di acclimatazione, 30 larve di dimensioni simili sono state trasferite, per ciascuna unità sperimentale, in acquari da 30 L. Il gruppo di controllo è stato mantenuto in acqua di rubinetto. Lo static-renewal test è stato usato come metodo di esposizione in accordo con le procedure standard (ASTM 1997). L'acqua è stata cambiata ogni 72 h; la concentrazione nominale di endosulfan durante questo intervallo di tempo rimane infatti costante a causa della elevata stabilità e della lunga vita media in acqua del composto (Miles & Moy 1979).

Gli animali sono stati mantenuti in condizioni di laboratorio controllate: ciclo 12:12 h di buio-luce, pH medio di 7.3 e temperatura dell'acqua di $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. I girini sono stati alimentati con lattuga o spinaci bolliti *ad libitum* tre volte alla settimana fino all'inizio della metamorfosi (Gosner stage 41) in cui i girini passano alla dieta carnivora.

Al momento della comparsa delle zampe anteriori i girini sono stati rimossi dagli acquari di trattamento e trasferiti fino al completamento della metamorfosi in acqua-terrari allestiti in modo tale che i girini avessero accesso ad un ambiente asciutto e all'acqua (acqua di trattamento).

4.3.1. Parametri rilevati per gli effetti subletali

Il periodo di trattamento, entrambi gli anni, è durato all'incirca 48 giorni, ovvero fino al momento in cui tutti i sopravvissuti avevano metamorfosato. Durante tale periodo la tolleranza all'endosulfan e gli effetti subletali indotti sono stati valutati prendendo in considerazione i seguenti parametri: sopravvivenza, massa larvale (accrescimento in peso), stadio di sviluppo, presenza di deformità, massa alla metamorfosi, alterazioni comportamentali ed attività di nuoto.

Dopo aver registrato il peso corporeo iniziale, i girini sono stati pesati ogni 8 giorni; durante questa operazione sono stati asciugati, con estrema delicatezza, con carta assorbente e pesati al milligrammo nel minor tempo possibile per non provocare troppo stress.

La presenza di deformità e la mortalità sono state controllate ogni giorno; gli individui morti sono stati rimossi e conservati in alcol al 70%. Settimanalmente, per determinare lo stadio di sviluppo, un sottocampione di animali per ciascun gruppo è stato esaminato mediante stereomicroscopio. Per ogni individuo sono state registrate man mano la sopravvivenza, la massa alla metamorfosi, i giorni impiegati a raggiungerla e l'eventuale presenza di deformità. Durante il periodo di test è stato raccolto vario materiale fotografico mediante fotocamera digitale Sony DSC F 707.

Tutti gli animali sopravvissuti al trattamento sono stati sacrificati con un'overdose di anestetico (MS-222 tricaine methanesulfonate), fissati in Bouin per 24 h e conservati in alcol al 70%.

4.3.1.1. Attività di nuoto

Le osservazioni comportamentali, al fine di valutare la performance di nuoto, sono state condotte dopo 4, 12, 20 e 28 giorni di esposizione. All'inizio di ogni osservazione sono stati scelti 5 individui, in maniera

casuale, da ciascuna unità sperimentale incluso il controllo e trasferiti in camere di osservazione contenenti 5 L di acqua con le rispettive concentrazioni nominali di endosulfan.

Dopo una fase di acclimatazione di 10 minuti, il comportamento in ciascuna camera è stato registrato con l'ausilio di una videocamera Panasonic NV-GX7 per 30 minuti ed i video sono stati scaricati su un computer. In questo modo è stato possibile per l'osservatore distinguere il movimento di ogni singolo individuo fra i cinque nell'acquario.

L'attività di nuoto di tutti i girini in ciascun acquario è stata analizzata per 60 secondi (intervalli di un minuto per un totale di 30 minuti). Durante l'analisi dei video sono stati individuate tre tipologie di movimento: regolare, irregolare e "resting", annotate per ogni singolo individuo ad ogni dato momento.

Il nuoto irregolare è stato registrato nel caso di convulsioni, nuoto scoordinato e body twisting; il "resting" è stato definito come immobilità in ogni momento durante i 60 sec.

L'unità sperimentale d'origine dei girini non è stata resa visibile all'osservatore per evitare ogni influenza nella valutazione.

4.4. Analisi morfologica dell'apparato branchiale

Per analizzare le alterazioni morfologiche ed ultrastrutturali subite dall'apparato respiratorio delle larve di *Bufo bufo* sono stati allestiti acquari con le stesse concentrazioni d'inquinante utilizzate per le esposizioni acute e croniche.

Il prelievo è stato effettuato dopo 24-48 e 96 h (test acuto) per analizzare gli effetti dell'esposizione a 0.2 mg/l di endosulfan sulle branchie interne (Tab. 4.1). Il prelievo è stato effettuato dopo 96 ore e 8-14 e 20 giorni durante i test di tossicità cronica (Tab. 4.1).

Parallelamente sono stati sacrificati gli esemplari di controllo per il confronto tra le condizioni basali e le condizioni sperimentali.

Per ogni gruppo sperimentale e tempo di esposizione sono stati scelti e osservati, rispettivamente, tre campioni per la microscopia elettronica a scansione, a trasmissione e confocale.

Tab.4.1 Prelievi: concentrazioni e tempi di esposizione

TOSSICITÀ ACUTA				
Concentrazione	Tempi di esposizione			
0.20 mg/l	24 h	48 h	96 h	
TOSSICITÀ CRONICA				
0.10 mg/l	96 h	8 gg	14 gg	20 gg
0.05 mg/l	96 h	8 gg	14 gg	20 gg
0.01 mg/l	96 h	8 gg	14 gg	20 gg

4.5. Allestimento dei preparati per la microscopia ottica e microscopia elettronica a scansione e a trasmissione

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), 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: il prelievo, la fissazione e la disidratazione. Le fasi successive si diversificano: con l'essiccamento dei preparati per la microscopia elettronica a scansione, con l'inclusione, il taglio e la colorazione per la microscopia ottica e per quella elettronica a trasmissione.

4.5.1. Prelievo

I prelievi delle branchie interne sono stati effettuati secondo lo schema presente in Tab. 4.1. Gli animali da sacrificare sono stati anestetizzati con MS 222 (tricaine methanesulphonate). Sono stati utilizzati forbici e bisturi perfettamente puliti ed i campioni sono stati costantemente perfusi con soluzione di lavaggio o fissativo. Dopo il prelievo, i campioni sono stati lavati con la soluzione di lavaggio (isotonica ed allo stesso pH dell'ambiente cellulare) per allontanare eventuali contaminanti, frammenti extracellulari, sostanze proteiche e polisaccaridi presenti sulla superficie del campione. Le fasi di prelievo, riduzione e lavaggio sono state effettuate nel minor tempo possibile per evitare modificazioni a carico della struttura cellulare.

Le dimensioni finali dei campioni sono state, come di norma, quelle compatibili con una buona penetrazione degli agenti chimici (circa 1 mm³).

4.5.2. Fissazione

La fase di fissazione del campione rappresenta la prima fase di modificazione artificiale dell'ambiente cellulare: permette che le strutture cellulari non vadano incontro a processi degenerativi, arresta le attività metaboliche della cellula ed immobilizza tutti i componenti molecolari e macromolecolari.

I campioni sono stati sottoposti ad una fissazione primaria aldeidica seguita da una post-fissazione in tetrossido di osmio. Nel nostro protocollo la prima fissazione è stata eseguita utilizzando la glutaraldeide al 3%, veicolata da un tampone fosfato (fosfato monobasico e bibasico di sodio, 0.1 M, pH 7.2) che ha il vantaggio di mantenere il pH cellulare costante durante l'intero periodo di fissazione. La glutaraldeide garantisce una stabilizzazione sufficientemente rapida da evitare un'estrazione delle componenti cellulari da parte del veicolo.

Per la post-fissazione è stato utilizzato il tetrossido di osmio all'1%, veicolato sempre da un tampone fosfato. Come soluzione di lavaggio (tra le due fissazioni e al termine della seconda fissazione) è stato ugualmente utilizzato il tampone fosfato in quanto ha il vantaggio di avere una composizione chimica simile a quella dei fluidi extracellulari.

SCHEMA DI FISSAZIONE

Pre-fissazione	2 h in glutaraldeide al 3% in tampone fosfato 0.1 M (pH 7.2) a 4°C
Lavaggio	3-4 passaggi di 30' in tampone fosfato 0.15 M
Post-fissazione	2 h in OsO ₄ al 1% in tampone fosfato 0.1 M (pH 7.2) a 4°C
Lavaggio	3-4 passaggi di 10' in tampone fosfato 0.15 M (pH 7.2)

4.5.3. Disidratazione

Nella fase di disidratazione vengono rimossi tutti i liquidi presenti nel tessuto. Nel caso della microscopia elettronica a trasmissione, i liquidi devono essere sostituiti con un solvente organico compatibile con la resina utilizzata nella fase di inclusione.

Gli agenti disidratanti sono solventi organici ad elevata forza e, per questa ragione, è inevitabile un certo grado di coartazione ed estrazione dei costituenti cellulari. Al fine di evitare l'estrazione di qualche componente cellulare, la disidratazione deve essere effettuata in modo graduale e nel minor tempo possibile in relazione al tipo di tessuto ed alle sue dimensioni. Nel nostro caso, l'agente disidratante utilizzato è stato l'etanolo il quale, non essendo direttamente miscibile con le resine epossidiche, ha imposto l'impiego successivo di un solvente di transizione (ossido di propilene).

SCHEMA DI DISIDRATAZIONE

Etanolo al 30%	2 passaggi di 5'
Etanolo al 50%	2 passaggi di 5'
Etanolo al 70%	2 passaggi di 5'
Etanolo al 95%	2 passaggi di 5'
Etanolo al 100%	3 passaggi di 5'

4.5.4. Infiltrazione o inclusione (solo per MO e TEM)

L'inclusione 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 impregnare completamente il tessuto. Come accennato, la procedura di inclusione in resina epossidica prevede l'utilizzo di un solvente di transizione quale l'ossido di propilene. Nel nostro studio è stata utilizzata una resina epossidica ottenuta dalla miscela di Epon 812 e Araldite (in presenza di agenti acceleratori e induttori); successivamente la resina viene fatta polimerizzare, ottenendo il blocchetto di inclusione. Tutte le operazioni di inclusione sono state effettuate sotto cappa, mentre la polimerizzazione è stata condotta in stufa a 60°C.

SCHEMA DI INCLUSIONE

Ossido di propilene	3 passaggi di 10' a 4°C
Ossido di propilene + resina (al 50%)	2-6 ore a 4°C
Resina	12 h o più a temperatura ambiente e sotto cappa
Stufa	3 giorni a 60°C

4.5.5. Taglio e colorazione (solo per MO e TEM)

I campioni, inclusi nei blocchetti di resina, sono stati sezionati utilizzando l'ultramicrotomo LKB Ultratome III. Lo spessore delle sezioni destinate alla microscopia ottica (sezioni semifini) è di 1-2 μm , mentre le sezioni ultrasottili per la microscopia elettronica a trasmissione hanno uno spessore di circa 60-90 nm.

Prima di procedere con il sezionamento è stata effettuata l'operazione di "trimming", che consiste nella rimozione della resina superflua finché non si ottiene un blocco avente la forma di un tronco di piramide, con la faccia superiore a forma di trapezio e il campione immediatamente sottostante. Il blocco così ottenuto viene montato sul braccio dell'ultramicrotomo che oscillando determina il taglio delle sezioni.

- **Trattamento delle sezioni semifini**

Le sezioni semifini vengono utilizzate come sezioni "orientative" per localizzare, sul campione, la zona da dove ottenere poi le sezioni ultrasottili. Esse possono tuttavia essere utilizzate come elemento diagnostico sostituendo i preparati inclusi in paraffina (utilizzati in microscopia ottica tradizionale) e consentire di sfruttare al meglio il potere di risoluzione del microscopio ottico.

Le colorazioni da noi utilizzate, per meglio evidenziare particolari strutture o i diversi tipi cellulari, sono state due: la tecnica secondo Humphrey e Pittman (blu di metilene, azzurro II, fucsina basica) e la tecnica tribasica secondo Grimley. Le sezioni semifini sono state successivamente osservate e fotografate al microscopio ottico LEITZ Dialux EB 20.

- **Trattamento delle sezioni ultrasottili**

Dalle osservazioni effettuate sulle sezioni semifini sono state ricavate le ultrasottili che, adagiate sulle apposite griglie (o retini), vengono sottoposte ad un trattamento di "colorazione". La contrastazione

avviene trattando i campioni con metalli pesanti in grado di fissarsi selettivamente alle differenti strutture sub-cellulari, con conseguente aumento dello scattering con il fascio elettronico del microscopio. Le sezioni ultrasottili subiscono quindi un doppio trattamento con acetato di uranile e citrato di piombo in soluzione al 2%. I sali di uranio si fissano in particolare agli acidi nucleici, evidenziando la cromatina nucleare ed i ribosomi mentre i sali di piombo potenziano l'azione dell'osmio e dell'uranio delineando l'ultrastruttura cellulare. Dopo la contrastazione segue la fase di metallizzazione. Infatti, per aumentare la stabilità meccanica del campione e migliorarne la stabilità termica, i retini vengono rivestiti da una pellicola di carbone a bassa densità elettronica. L'operazione di rivestimento delle sezioni avviene per mezzo 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.

4.5.6. Essiccamento e ricopertura (solo per SEM)

Per le osservazioni al microscopio elettronico a scansione i campioni vengono sottoposti dopo le fasi di prelievo, di stabilizzazione e di disidratazione, all'essiccamento e alla ricopertura.

La fase di essiccamento consiste nell'allontanamento dei fluidi presenti nel campione, generalmente, acqua o solventi utilizzati nella disidratazione. Si tratta di una fase delicata in quanto un cattivo essiccamento può causare 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. I campioni, dopo questa fase, vengono posti su un apposito porta campioni (stub) e sottoposti alla fase di ricopertura che prevede l'impiego di sostanze metalliche ad elevato

peso atomico (in questo caso oro). La metallizzazione è stata eseguita mediante l'utilizzo di speciali evaporatori che operano in condizioni di alto vuoto.

Le osservazioni sono state condotte al microscopio elettronico a scansione Zeiss DSM 940.

4.6. Allestimento dei preparati per la microscopia confocale

Per compiere gli studi sulla funzionalità, dopo il prelievo, i campioni sono stati fissati, disidratati ed inclusi seguendo un protocollo modificato al fine di preservare l'integrità dei siti antigenici.

4.6.1. Fissazione

Il liquido di Bouin è stato utilizzato come fissativo perché altamente penetrabile e compatibile con quasi tutti i metodi di colorazione. I campioni dopo 24 h in Bouin subiscono un passaggio diretto in etanolo.

4.6.2. Disidratazione

La disidratazione avviene in maniera graduale utilizzando concentrazioni crescenti di etanolo.

SCHEMA DI DISIDRATAZIONE

Etanolo al 50%	4-5 passaggi di 5'
Etanolo al 50%	1 passaggio di 1 h
Etanolo al 70%	1 passaggio di 1 h
Etanolo al 80%	1 passaggio di 1 h (conservazione)
Etanolo al 90%	1 passaggio di 1 h
Etanolo al 95%	1 passaggio di 12 h
Etanolo al 100%	3 passaggi di 1 h

4.6.3. Inclusione

L'etanolo viene sostituito, sempre in maniera graduale, con lo xilolo che si presta meglio per il legame con la paraffina durante l'inclusione.

SCHEMA DI INCLUSIONE

Miscela Etanolo al 100%Xilolo (1:1)	1 passaggio di 10'
Xilolo	1 passaggio di 10'
Xilolo	1 passaggio di 10'
Miscela Xilolo-Paraffina a 56° (1:1)	1 passaggio di 15' a 56°
Paraffina a 56°	1 passaggio di 1 h in stufa
Paraffina a 56°	1 passaggio di 1 h in stufa
Paraffina a 56°	1 passaggio di 1 h in stufa
Paraffina a 56°	1 passaggio di 1 h in stufa
Preparazione del blocchetto	

4.6.4. Metodo dell'immunofluorescenza

Sezioni sagittali di 7 µm sono state tagliate e montate su slide. È stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta secondo Coons *et al.* (1995). L'anticorpo primario non coniugato si lega ai siti antigenici presenti sulla sezione e l'incubazione si protrae over night.

ANTICORPO	SPECIE HOST	DILUIZIONE	CASA PRODUTTRICE
iNOS	Mouse	1:100	Sigma

In seguito, nello stesso mezzo di reazione viene aggiunto l'anticorpo secondario coniugato con fluoresceina isotiocianato e suscitato contro gamma-globuline della stessa specie usata per la produzione del primo

anticorpo. L'anticorpo primario è riconosciuto quindi come antigene dall'anticorpo secondario. La fluoresceina isotiocianato appartiene alla classe dei fluorocromi, molecole capaci di emettere luce di lunghezza d'onda superiore. Al fine di evitare l'insorgere di reazioni aspecifiche, le sezioni vengono in un primo momento trattate con Normal Serum della stessa specie utilizzata per la produzione dell'anticorpo secondario. Le osservazioni sono state effettuate al microscopio confocale a scansione laser Leica TCS SP2.

SCHEMA DI SPARAFFINATURA

Xilolo	5 minuti
Etanolo assoluto	2 minuti
Etanolo assoluto	2 minuti
Etanolo al 95%	2 minuti
Acqua distillata	2 minuti

PROTOCOLLO DI IMMUNOMARCATURA INDIRETTA

Tampone PBS	10'
100 ml di Tampone+0.875 ml di H₂O₂ al 40%	30'
Lavaggi in Tampone PBS	3 passaggi di 5'
Coprire le sezioni con Normal Serum 1:50	10' in camera umida
Incubazione con Anticorpo Primario	Tutta la notte a 4 C° in camera umida
Lavaggi in Tampone PBS	3 passaggi di 5'
Anticorpo secondario coniugato con FITC	30' in camera umida
Lavaggi in Tampone PBS	3 passaggi di 5'
Chiusura con Tampone PBS	

4.7. Analisi statistica

4.7.1. LC₅₀

La concentrazione letale per il 50% degli animali (LC₅₀) è stata determinata utilizzando il Finney's Probit Analysis LC₅₀ Determination Method (Finney 1971). I dati di mortalità sono stati raggruppati con un intervallo di confidenza del 95% e analizzati mediante il software, sviluppato dall'EPA, LC₅₀ Software Program Version 1.00 (1999).

4.7.2. Analisi dei dati cronici

Tutti i dati sono stati sottoposti, dapprima, ad analisi multivariata utilizzando il software SIMCA-P+ version 11.0 (Umetrics AB, Umeå, Sweden). Tale strumento di analisi risulta utile soprattutto allorquando si ha a che fare con un numero di variabili considerevole da cui si vogliono estrarre le maggiori informazioni possibili pur lavorando con un set più ristretto di variabili.

È stato utilizzato un livello di significatività di 0.05 e i dati sono stati pretrattati con i metodi di scalatura e centratura (varianza unitaria) (Wold *et al.* 1987). La determinazione del numero significativo di componenti è stata eseguita per mezzo di convalida incrociata. Sono stati considerati valori di $R^2 > 0.7$ (variazione spiegata) e di $Q^2 > 0.4$ (variazione predetta) per fissare un modello accettabile nell'analisi di dati biologici (Lundstedt *et al.* 1998).

Il metodo dell'analisi discriminante parziale (PLS-DA) (Wold *et al.* 1984), utile per comparare due o più gruppi, è stato impiegato per identificare le variabili discriminanti che potrebbero contribuire ad una separazione tra i due anni di esperimenti cronici (le due repliche).

L'analisi delle componenti principali (PCA) è stata impiegata nella prima fase di elaborazione dei dati per dare una visione generale dei "trends" e dei "groupings", per capire le relazioni tra gli oggetti e/o le classi

considerate e fornire, quindi, un'indicazione preliminare sul ruolo delle variabili.

Successivamente il metodo Partial least-squares regression-projection to latent structures (PLS) è stato utilizzato per mettere in relazione le concentrazioni di endosulfan con le variabili osservate/misurate.

Per comparare le differenze nella mortalità e nell'incidenza di deformità, fra il gruppo di controllo e quelli trattati, è stato applicato il Fisher's exact probability test; la regressione lineare, inoltre, è stata utilizzata per valutare gli effetti dell'endosulfan sulla mortalità e la massa larvale (crescita) durante l'intero periodo di esposizione.

Per quanto riguarda i dati sugli effetti dell'endosulfan sulla massa larvale e quella alla metamorfosi, e sulla proporzione di metamorfosati (numero di individui che raggiungono la metamorfosi/numero inizialmente stoccato) è stata condotta l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal post test di Dunnett, per comparare il controllo con ciascun trattamento.

Quest'ultime analisi statistiche sono state effettuate con l'ausilio di Graph Pad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

CAPITOLO V

TOSSICITÀ ACUTA

5.1. LC₅₀

Non essendo noti in bibliografia dati sulla sensibilità delle larve di *Bufo bufo* all'endosulfan è stato condotto uno studio preliminare finalizzato all'identificazione della LC₅₀ a 96 h. Per calcolare la LC₅₀ i dati di mortalità sono stati raggruppati con un intervallo di confidenza del 95% utilizzando il metodo secondo Finney (1971).

La concentrazione nominale di endosulfan alla quale avviene la morte del 50% degli individui a 96 h risulta di 0.43 mg/l.

Nessuna mortalità è osservata durante questo periodo nel gruppo di controllo e nelle tre concentrazioni più basse da noi testate (0.01, 0.05 e 0.1 mg/l). Inoltre, in tutti i gruppi il tasso di mortalità è più basso del 50% durante le prime 24 h di esposizione.

La relazione tra le concentrazioni di endosulfan e il tasso di mortalità sono mostrate nella Tabella 5.1 in cui la morte nel campione, la morte prevista e quella stimata sono espresse in percentuale; la morte prevista è la morte che ci si aspetta se nel gruppo di controllo non si hanno morti, come nel nostro caso; la morte stimata è quella che si avrebbe se il modello matematico e l'esperimento fittassero completamente.

Nella Tabella 5.2 sono rappresentati i valori di LC₅₀ stimati ed i limiti di confidenza calcolati al 95% in accordo con il metodo Finney.

Tab.5.1 Relazione fra le concentrazioni di endosulfan e il tasso di mortalità di *Bufo bufo*

Concentrazione (mg/l)	Numero trattati	Numero morti	Morte nel campione	Morte prevista	Morte stimata
0.010	90	0	0.0000	0.0000	0.0000
0.050	90	0	0.0000	0.0000	0.0000
0.100	90	0	0.0000	0.0000	0.0007
0.200	90	9	0.1000	0.1000	0.0465
0.300	90	18	0.2000	0.2000	0.2148
0.350	90	24	0.2667	0.2667	0.3259
0.400	90	33	0.3667	0.3667	0.4372
0.500	90	54	0.6000	0.6000	0.6299
0.600	90	78	0.8667	0.8667	0.7679

Tab.5.2 Valori di LC₅₀ stimati e limiti di confidenza

Point	Concentration (mg/l)	95% confidence limits	
		Lower	Upper
LC 1.00	0.149	0.096	0.190
LC 5.00	0.203	0.149	0.242
LC 10.00	0.240	0.188	0.277
LC 15.00	0.268	0.219	0.303
LC 50.00	0.430	0.392	0.480
LC 85.00	0.689	0.591	0.900
LC 90.00	0.771	0.646	1.053
LC 95.00	0.909	0.737	1.331
LC 99.00	1.240	0.938	2.070

5.2. Analisi morfologica

Dopo la determinazione della concentrazione letale, si è proceduto con gli esperimenti volti a verificare eventuali alterazioni a carico dell'apparato branchiale di *Bufo bufo* in seguito ad esposizione ad una concentrazione subletale di endosulfan pari a 0.2 mg/l.

5.2.1. Morfologia delle branchie interne dopo 24 h di esposizione

Comparata con gli esemplari di controllo, già dopo 24 h di esposizione, la morfologia e l'ultrastruttura delle branchie degli animali trattati appare alterata.

Osservata al SEM (Fig. 5.1), la branchia mostra le prime alterazioni a carico dei ciuffi branchiali con una perdita di turgore che interessa prevalentemente la porzione distale. A livello ultrastrutturale (Fig. 5.2) le cellule epiteliali mantengono il loro aspetto tipico ed è possibile osservare nelle PVCs numerosi granuli in posizione subapicale, mentre l'endotelio dei capillari mostra un profilo irregolare. La regione dei filtri branchiali non sembra subire alcuna modificazione.

5.2.2. Morfologia delle branchie interne dopo 48 h di esposizione

Dopo 48 h dall'inizio del trattamento, le alterazioni si accentuano e interessano esclusivamente la porzione respiratoria della branchia. I ciuffi perdono il loro turgore, mostrandosi fortemente disidratati; la porzione apicale, in alcuni casi, subisce un collasso (Fig. 5.3). Questi fenomeni di disidratazione si riflettono a livello ultrastrutturale, come dimostrano le osservazioni al TEM (Figg. 5.4, 5.5), in un ampliamento degli spazi intercellulari con conseguente perdita di contatto tra lo strato epiteliale esterno e quello interno. Inoltre, sono osservabili nelle PVCs di tutti i campioni trattati, numerosi granuli di secrezione subapicali e la presenza di grosse vescicole secrete intra-citoplasmatiche (fig. 5.5).

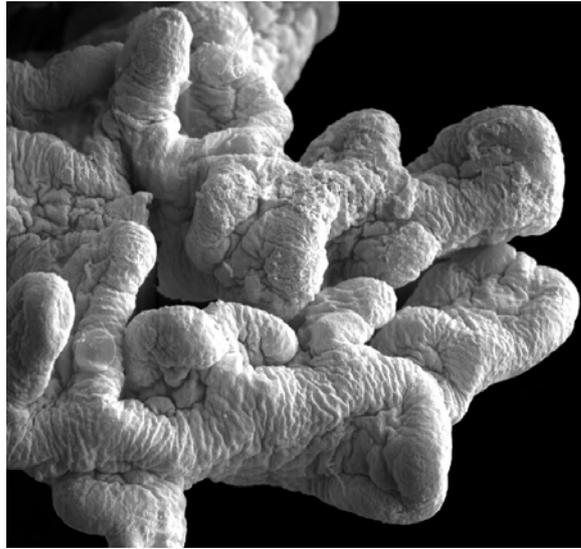


Fig. 5.1 Ciuffo branchiale di *Bufo bufo*. Si nota l'aspetto irregolare e il ripiegamento della superficie epiteliale. 560x

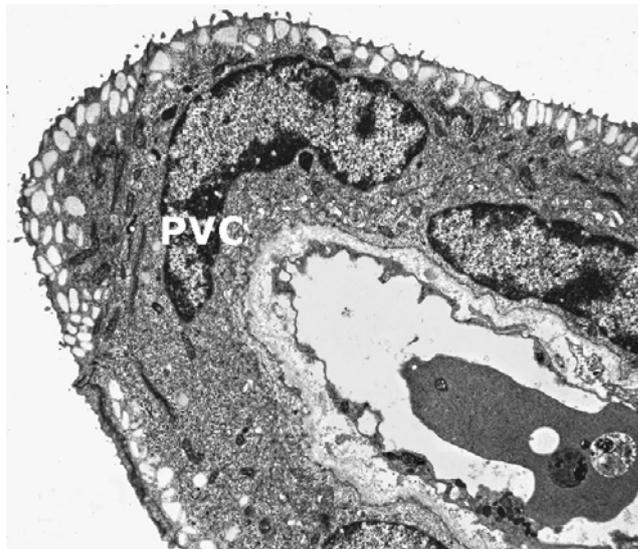


Fig. 5.2 Cellula pavimentosa. Sono visibili i granuli di secrezione subapicali e il profilo endoteliale irregolare. 12000x

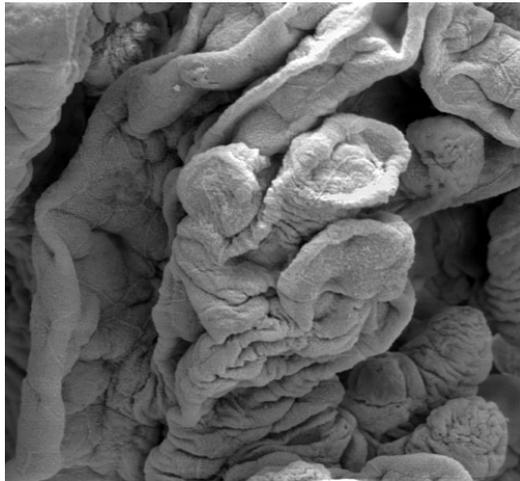


Fig. 5.3 Dopo 48 h i ciuffi branchiali appaiono fortemente disidratati. 862x

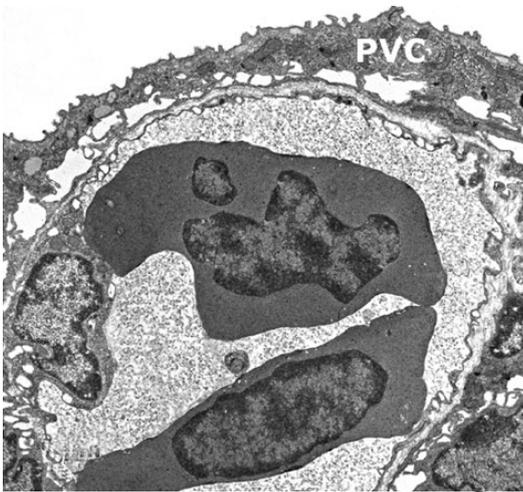
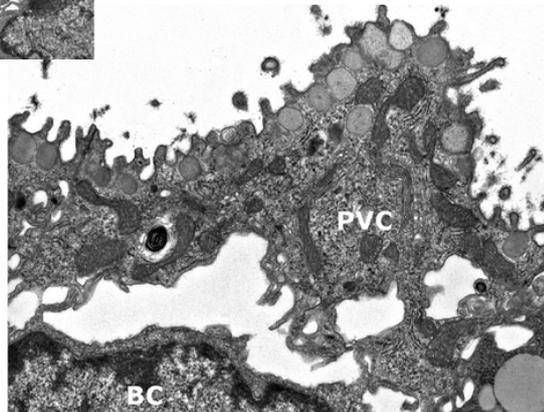


Fig. 5.4 Ciuffi branchiali dopo 48 h di esposizione. Si nota l'inizio della formazione di spazi intercellulari che comporta il distacco tra lo stato epiteliale interno e lo strato esterno. 4400x

Fig. 5.5 Cellula pavimentosa con numerosi granuli di secrezione subapicali e alcune vescicole secretrici di dimensioni maggiori. 7000x



5.2.3. Morfologia delle branchie interne dopo 96 h di esposizione

Dopo 96 h di esposizione le alterazioni strutturali diventano cospicue. L'osservazione al SEM (Figg. 5.6, 5.7), mostra come i ciuffi, a causa dell'intensa coltre mucosa che li riveste insieme a fenomeni di collasso e disidratazione, perdono la loro normale morfologia.

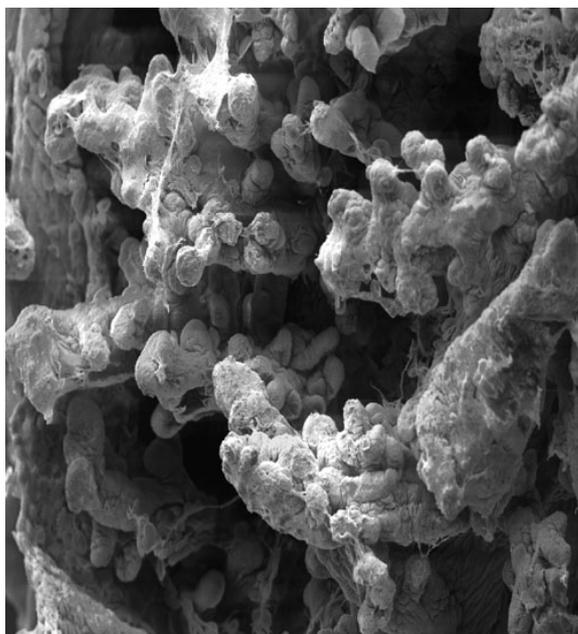


Fig. 5.6 I ciuffi branchiali appaiono ricoperti da uno spesso strato mucoso. 200x

Fig. 5.7 Porzione apicale di un ciuffo branchiale. Si notano gli evidenti fenomeni di disidratazione e collasso. 828x



Al contrario, i filtri branchiali sembrano mantenere il loro assetto strutturale (Fig. 5.8), ma da un'analisi a maggiore ingrandimento è possibile osservare la numerosa presenza, sulla loro superficie, di piccole cellule dotate di lunghi microvilli (Fig. 5.9).

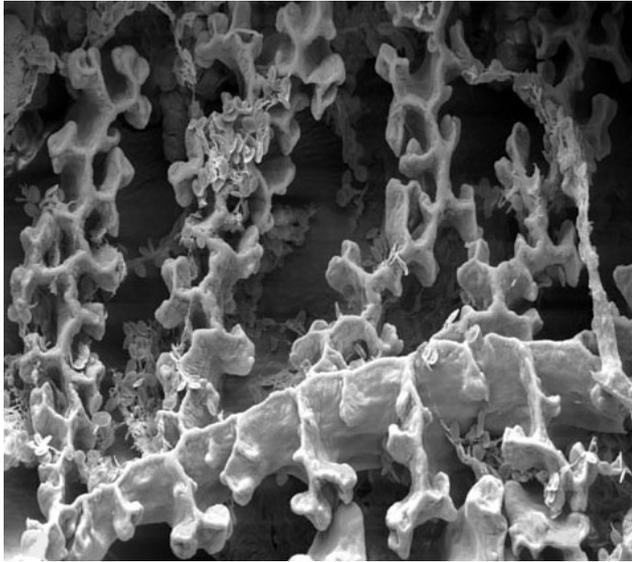


Fig. 5.8 96 h. La struttura morfologica dei filtri branchiale appare intatta. 166x

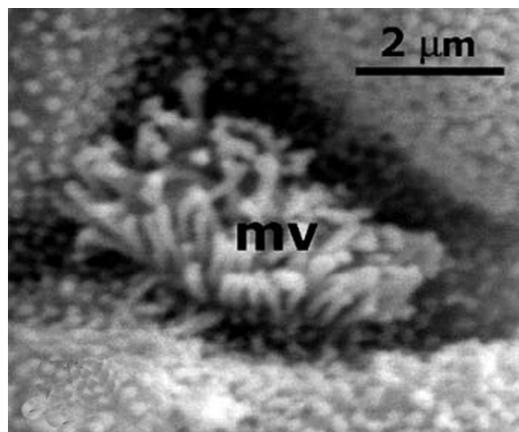


Fig. 5.9 SEM, particolare a maggiore ingrandimento in cui si notano i microvilli delle cellule osservate sulla superficie dei filtri.

Le caratteristiche ultrastrutturali di tale tipologia cellulare sono: la forma allungata (Fig. 5.10), il citoplasma ricco di reticolo endoplasmatico rugoso e vescicole tubulari (Figg. 5.10, 5.11) e la notevole estensione di apparato del Golgi.

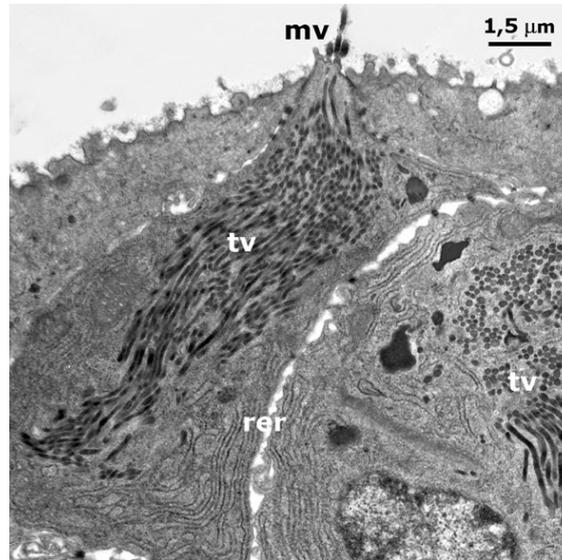


Fig. 5.10 Filtri branchiali dopo 96 h. Cellula vescicolo-tubulare in cui sono evidenti il reticolo endoplasmatico rugoso e le vescicole tubulari.

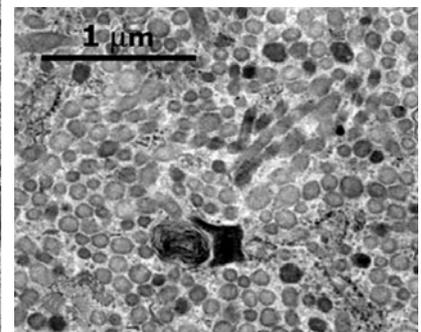


Fig. 5.11 Sezione trasversale di una cellula vescicolo-tubulare in cui sono ben visibili le vescicole tubulari.

Dopo 96 h di esposizione a 0.2 mg/l di endosulfan l'epitelio dei ciuffi branchiali appare notevolmente alterato.

L'analisi al TEM conferma l'ulteriore ampliamento degli spazi intercellulari che porta alla formazione di vere e proprie lacune (Fig. 5.12). Le grosse vescicole secretrici, notate già dopo 48 h di esposizione, riempiono ormai il citoplasma delle cellule pavimentose ed è possibile notare, inoltre, la numerosa presenza di corpi lamellari (Figg. 5.12, 5.13).

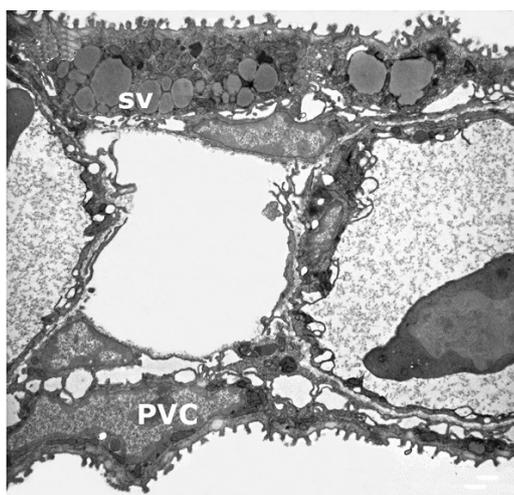


Fig. 5.12 Ciuffi branchiali. Le osservazioni al TEM mostrano la presenza di ampie lacune intercellulari e di numerose vescicole secrete. 3000x

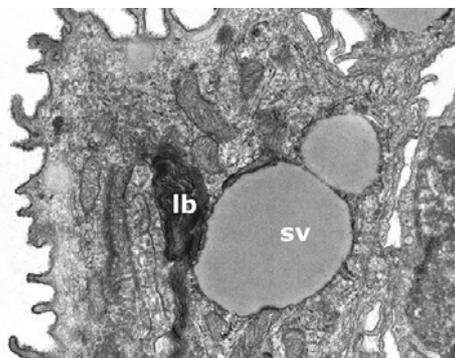


Fig. 5.13 Particolare di una PVC: vescicola secrete e corpo lamellare. 12000x

Dopo 96 h dall'inizio del trattamento, la presenza di vescicole secrete diventa cospicua anche nel citoplasma delle MRCs (Figg. 5.14, 5.15). I mitocondri sono numerosissimi ed assumono in molti casi conformazioni tipiche (Fig. 5.14).

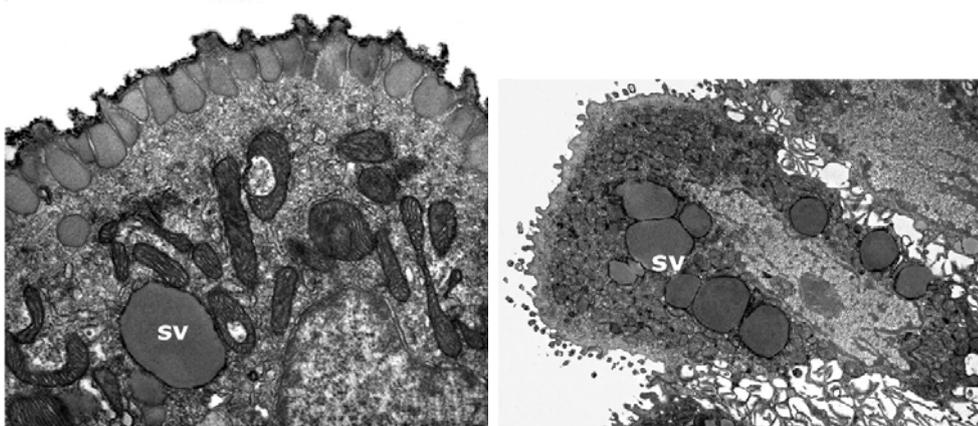


Fig. 5.14 - Fig. 5.15 MRCs. Si notano le vescicole secrete. 12000x, 3000x

L'analisi ultrastrutturale mette in evidenza, oltre all'intensa attività secretoria, fenomeni più o meno estesi di degenerazione cellulare. In tutti i campioni trattati è possibile notare, rispetto ai controlli, la presenza di numerosi macrofagi (Fig. 5.16) sia nei ciuffi che nei filtri branchiali. Invece, l'intensa attività di digestione intracellulare, iniziata già a 48 h, è testimoniata dall'elevato numero di corpi residui (Fig. 5.17).

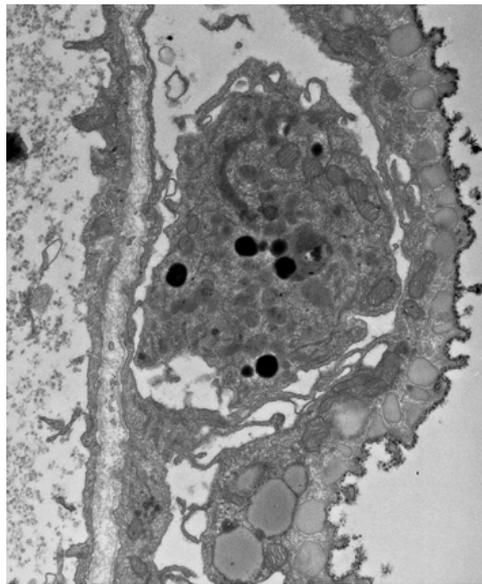


Fig. 5.16 Le osservazioni al TEM mostrano la numerosa presenza di macrofagi. Sono evidenti le numerose vescicole secretrici. 7000x

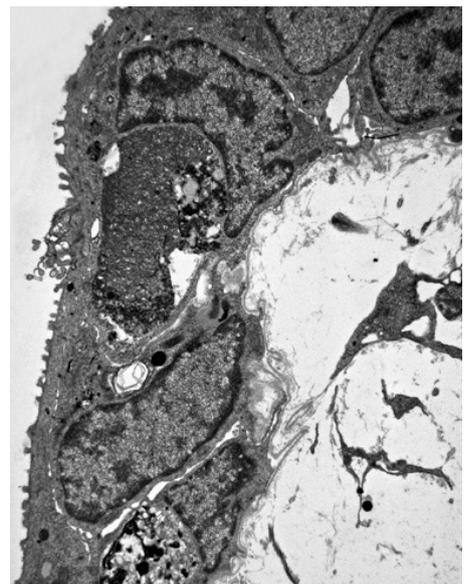


Fig. 5.17 Corpi residui in filtri branchiali. 3000x

5.3. Analisi funzionale

All'analisi morfologica è seguita quella funzionale attraverso le osservazioni sull'espressione di una delle tre isoforme di ossido nitrico sintasi, quella inducibile (iNOS), nelle branchie di esemplari di controllo ed in seguito ad esposizione a 0.2 mg/l di endosulfan. È stato valutato il pattern d'espressione di questa isoforma, conosciuta come maggiormente coinvolta nei processi infiammatori e in condizioni patologiche, tenendo conto delle molteplici funzioni che esso svolge nella regolazione del ciclo cellulare e del tono vasale, al fine di valutare il coinvolgimento dell'NO in alcuni fenomeni da noi osservati: la notevole presenza di macrofagi, la difficoltà di scambio capillare e la sofferenza cellulare.

5.3.1. Espressione iNOS in esemplari di controllo

In esemplari di controllo l'iNOS è espresso con bassa intensità a livello basale. L'immunolocalizzazione rivela nessuna o una debole colorazione, in tutti i tempi di esposizione, sia nei filtri che nei ciuffi branchiali (Fig. 5.18).

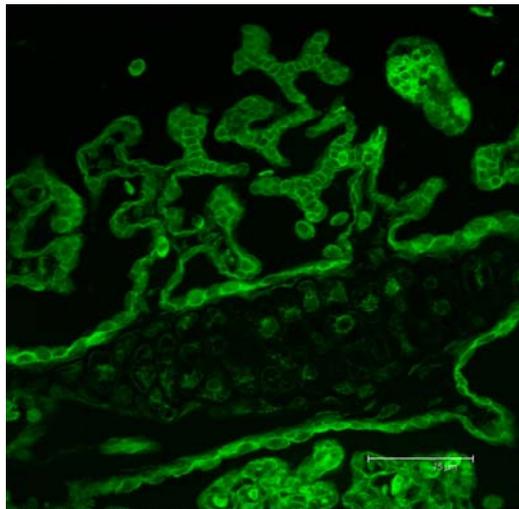


Fig. 5.18 Branchie di esemplari di controllo. Immunolocalizzazione della iNOS: la marcatura si presenta a bassa intensità. 40x

5.3.2. Espressione iNOS dopo 24 h di esposizione

Dopo 24 h di esposizione, in tutti gli individui esposti ad endosulfan, l'intensità della marcatura negli strati germinativi risulta aumentata ed il pattern di distribuzione è il medesimo in entrambe le porzioni che costituiscono la branchia (Fig.5.19).

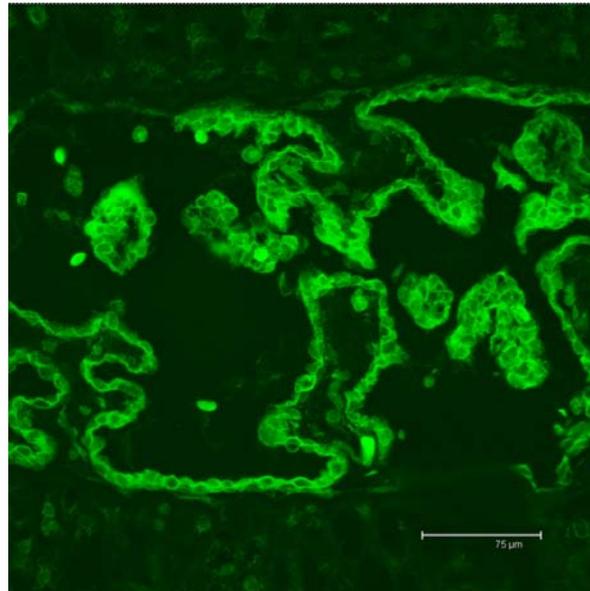


Fig. 5.19 Ciuffi e filtri branchiali dopo 24 h di esposizione. Si nota un aumento della marcatura. 40x

5.3.3. Espressione iNOS dopo 48 h di esposizione

L'intensità della marcatura aumenta dopo 48 h di trattamento raggiungendo la sua massima espressione in tutti gli esemplari osservati (Fig. 5.20). Il pattern è lo stesso sia nell'epitelio dei ciuffi che in quello dei filtri. Le cellule epiteliali mostrano una marcata e graduale reattività per l'enzima; cellule immunopositive, intensamente marcate, sono riconoscibili in corrispondenza dei vasi sanguigni e dell'endotelio (Fig.5.21).

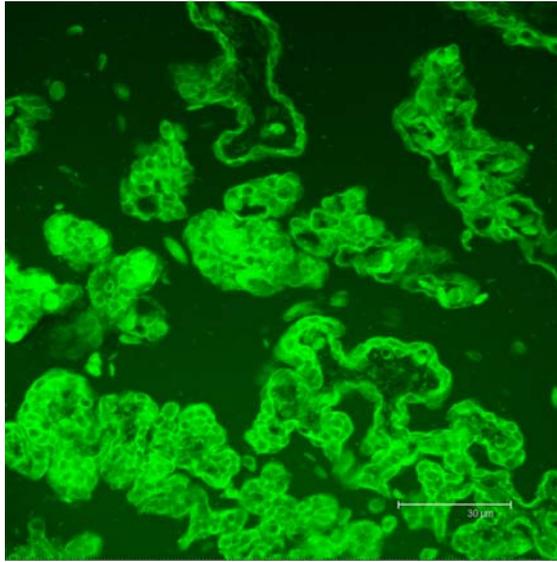


Fig. 5.20 Ciuffi e filtri branchiali. Dopo 48 h di esposizione l'intensità di marcatura incrementa e raggiunge la massima espressione. 40x

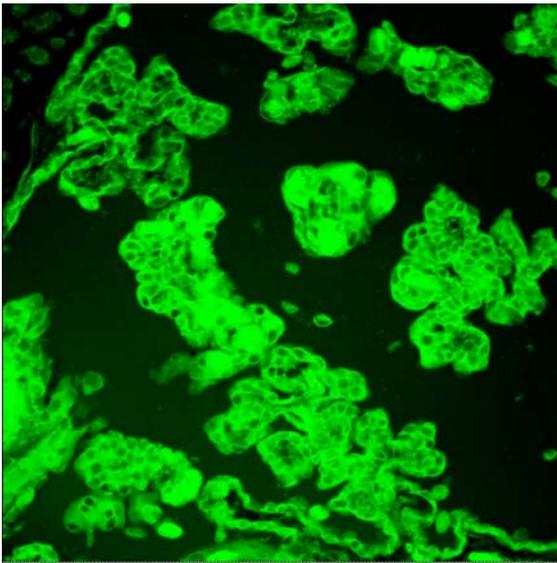


Fig. 5.21 La iNOS mostra un pattern di intensa immunomarcatura in corrispondenza dei vasi, dell'endotelio e lì dove ci sono i macrofagi. 40x

5.3.4. Espressione iNOS dopo 96 h di esposizione

A 96 h infine si ha nuovamente un brusco abbattimento dell'espressione dell'iNOS in tutti i campioni trattati (Fig. 5.22).

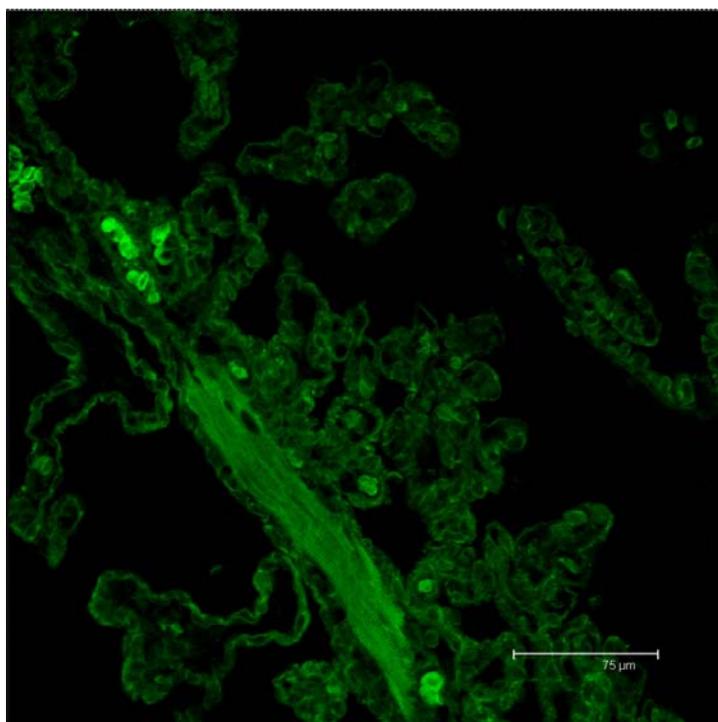


Fig. 5.22 Immunolocalizzazione con iNOS. Ciuffi e filtri branchiali dopo 96 h di esposizione. Si nota come la marcatura dell'iNOS è fortemente diminuita. 40x

CAPITOLO VI

TOSSICITÀ CRONICA

Nella seconda parte della ricerca sono stati investigati gli effetti su *Bufo bufo* di un'esposizione cronica a 0.01, 0.05 e 0.1 mg/l di endosulfan durante tutto lo sviluppo larvale; di seguito ci riferiremo ai diversi gruppi come bassa, media ed alta concentrazione, rispettivamente. In entrambi gli anni di esperimenti, il periodo di trattamento è durato approssimativamente 48 giorni, ovvero quando tutti gli individui del gruppo di controllo e della bassa avevano ormai metamorfosato ed è stato ritenuto improbabile che i sopravvissuti nelle altre due concentrazioni potessero raggiungere la metamorfosi a causa di severi deficit nella crescita.

6.1. Analisi discriminante parziale (PLS-DA)

Il modello PLS-DA, utilizzato per analizzare le differenze tra i due anni di esperimenti, ha bassi valori di R^2 e Q^2 ($R^2Y=0.12$ e $Q^2=0.10$), e non risulta un modello significativo. Questo significa che non si può predire a quale anno un individuo appartiene. Inoltre, l'analisi mostra come i girini siano più grandi il primo anno rispetto al secondo. Il peso corporeo iniziale infatti per il primo anno è di 0.07 ± 0 g e per il secondo di 0.045 ± 0.005 g (mean \pm SD).

6.2. Analisi delle componenti principali (PCA)

La PCA ha alti valori di R^2 e Q^2 ($R^2X=0.85$ e $Q^2=0.67$, due componenti significative); ciò significa che c'è un sistematico e consistente cambiamento nelle risposte misurate. I girini del gruppo di controllo e quelli della bassa risultano simili nelle loro risposte (Tavola 1 A e Tab. 6.1) durante il periodo di test e presentano uno sviluppo ed una crescita normale. Gli individui

esposti alla media ed alla alta concentrazione di endosulfan mostrano anch'essi delle similarità nelle loro risposte che, tuttavia, differiscono notevolmente da quelle degli animali dei gruppi di controllo e bassa (Tavola 1 A e Tab. 6.1). Nel loading plot (Tavola 1 B) sono espresse le variabili responsabili di tale separazione tra i due gruppi contrapposti: controllo e bassa da una parte e media ed alta dall'altra.

6.3. Partial least-squares regression (PLS)

Il modello PLS, in cui le concentrazioni di endosulfan sono espresse in ordinate e le rispettive risposte misurate sono riportate in ascissa, ha alti valori di R^2 e Q^2 ($R^2X=0.70$, $R^2Y=0.85$ e $Q^2=0.85$, una componente significativa); ciò significa che c'è un sistematico e consistente cambiamento nelle risposte misurate con l'aumentare della concentrazione di endosulfan. Le variabili misurate definite come nuoto regolare, massa larvale e corpo normale risultano negativamente correlate con la concentrazione di endosulfan (diminuiscono quando la concentrazione aumenta); al contrario il nuoto irregolare, il resting (immobilità durante il periodo di osservazione), corpo con deformità e mortalità risultano positivamente correlate con la concentrazione di endosulfan e quindi aumentano con essa (Tavola 2 A e B).

6.4. Attività di nuoto

Dall'analisi PCA e dal modello PLS (Tavole 1 e 2) si nota che gli animali del gruppo di controllo e di bassa concentrazione nuotano sempre in maniera regolare durante tutto il periodo di esposizione. Nei gruppi di media ed alta concentrazione, al contrario, i girini nuotano o in maniera irregolare o rimangono immobili (resting) adagiati sul fondo. Inoltre, l'attività di nuoto irregolare risulta essere il primo effetto negativo in assoluto per le due concentrazioni più alte (Tavola 1 B).

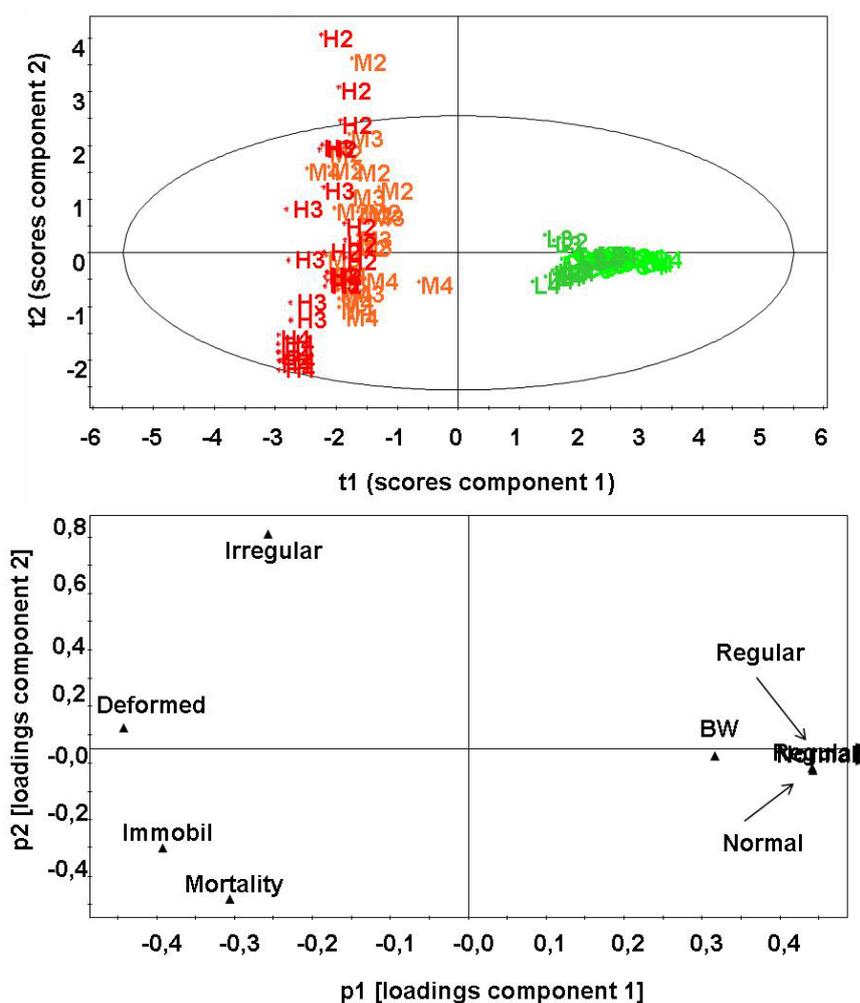


Tavola 1 Principal component analysis (PCA) $R^2X=0.85$ e $Q^2=0.67$, due componenti significative. **A)** Score plot dove le osservazioni in verde sono C=control e L=Low (0.01 mg/l) i girini esposti alla bassa concentrazione, in arancione quelli nella intermedia M=Medium (0.05 mg/l) e in rosso quelli nella più alta H=High (0.1 mg/l). I numeri 2, 3 e 4 si riferiscono al periodo: 2=12 giorni di esposizione, 3=20 e 4 =28. L'ellisse rappresenta l'Hotellings T² (0.05). **B)** Loading plot con le rispettive risposte. Regular=nuoto regolare, Normal=corpo normale, BW=massa larvale, Irregular=nuoto irregolare, Deformed=corpo deforme, Immobil=resting, Mortality=percentuale del numero di morti/numero iniziale.

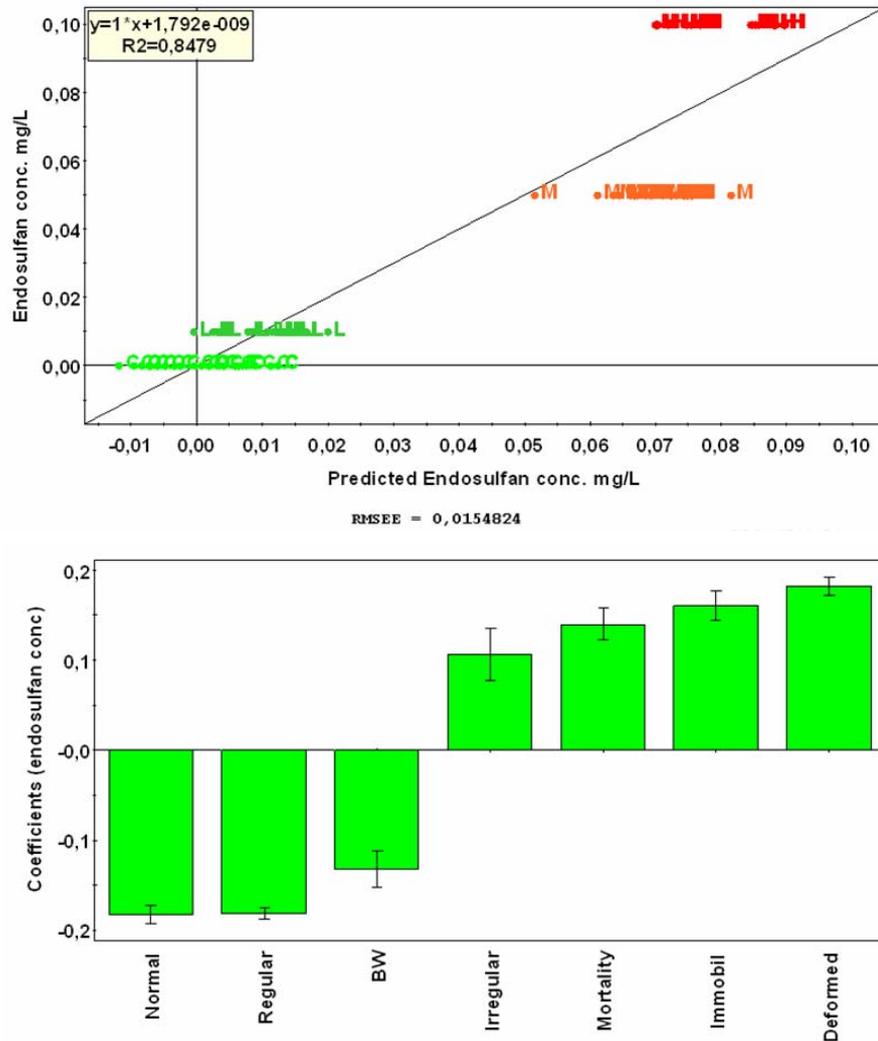


Tavola 2. Partial least squares regression (PLS) $R^2X=0.70$, $R^2Y=0.85$ e $Q^2=0.85$, una componente significativa. **A)** Concentrazione di endosulfan osservata versus quella predetta dal modello. **B)** Coefficient plot con le rispettive risposte. Regular=nuoto regolare, Normal=corpo normale, BW=massa larvale sono negativamente correlati con la concentrazione di endosulfan; Irregular=nuoto irregolare, Deformed=corpo deforme, Immobil=resting, Mortality=percentuale del numero di morti/numero iniziale sono le variabili positivamente correlate con la concentrazione di endosulfan.

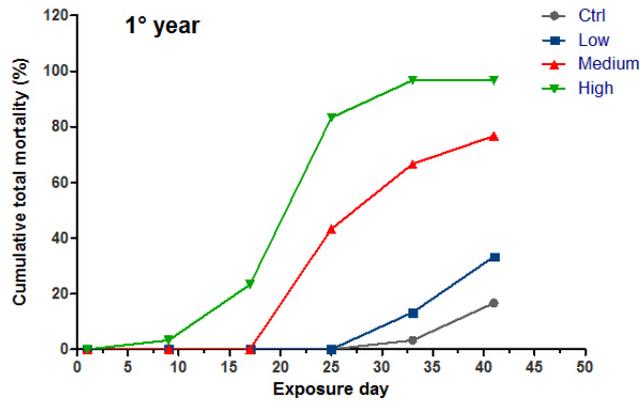
Tab 6.1 Esposizione di *Bufo bufo* ad endosulfan durante lo sviluppo. Massa larvale (Body Weight), sviluppo normale o deforme, mortalità e metamorfosati espressi come la percentuale, rispettivamente, del numero di morti o metamorfosati sul numero inizialmente usato.

	Year	Control	Low (0.01mg/l)	P ¹	Medium (0.05 mg/l)	P ¹	High (0.1 mg/l)	P ¹
BW	1	0.20	0.13	ns	0.08	**	0.07	**
	2	0.19	0.10	ns	0.09	*	0.065	**
Normal	1	100%	100%	ns	0%	***	0%	***
	2	100%	100%	ns	0%	***	0%	***
Deformed	1	0%	3.3%	ns	100%	***	100%	***
	2	0%	10%	ns	100%	***	100%	***
Mortality	1	16%	33%	ns	76%	***	96.7%	***
	2	3.3%	20%	ns	53%	***	90%	***
Metamor phosed	1	83%	67%	ns	0%	***	0%	***
	2	97%	70%	ns	0%	***	0%	***

¹ p-value quando comparato con il gruppo di controllo: ns = non significativo, *p<0.05, **p< 0.01 e ***p<0.001

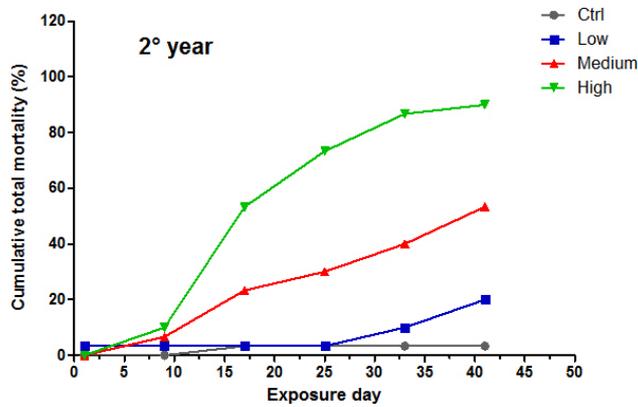
6.5. Mortalità

Dopo 48 giorni di trattamento, l'endosulfan causa una significativa mortalità (Tab. 6.1, Figg. 6.1, 6.2) nei gruppi sperimentali a più alta concentrazione, in entrambi gli anni. I girini muoiono prima nella alta arrivando ad 1 solo girino sopravvissuto il primo anno e 3 il secondo. La sopravvivenza non differisce tra il gruppo di controllo e la bassa concentrazione sebbene in quest'ultima si osserva un incremento della mortalità all'inizio del periodo cruciale della metamorfosi.



Figg. 6.1, 6.2
 Regressione lineare in cui è mostrato l'andamento della mortalità cumulativa durante l'intero periodo di test.

F = 11.4877. DFn=3 DFd=16 P=0.0002889



F = 31.4139. DFn=3 DFd=16 P<0.0001

6.6. Crescita, massa larvale e alla metamorfosi

Gli effetti sulla crescita sono stati valutati misurando il peso corporeo di ciascun girino una volta ogni otto giorni. L'endosulfan produce effetti significativi nel tempo sulla massa dei girini nella media e nella alta concentrazione (Tab.6.1 e Figg. 6.3, 6.4). Gli individui del gruppo di controllo e della bassa mostrano un aumento costante del peso fino all'inizio del climax metamorfico. Inoltre, nella bassa concentrazione si nota una tendenza, durante tutto il periodo di esposizione, ad avere un peso corporeo minore rispetto al controllo sebbene tale differenza non risulta statisticamente significativa (ANOVA $p=0.17$) (Tab.6.1 e Fig. 6.3); di conseguenza sebbene la differenza non risulti statisticamente significativa (ANOVA $p=0.14$) la massa alla metamorfosi negli animali esposti a 0.01 mg/l è minore rispetto al controllo (Tab.6.1 e Fig. 6.4).

Fig. 6.3

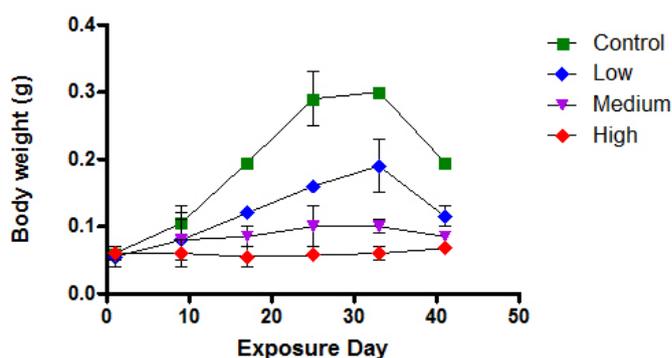
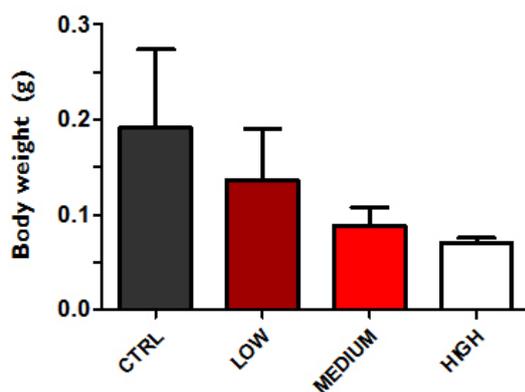


Fig. 6.4



6.7. Sviluppo e deformità

Lo sviluppo larvale nella media ed alta concentrazione risulta significativamente ritardato durante l'intero periodo di test. In maniera correlata alla dose infatti gli stadi di sviluppo subiscono un ritardo o sono bloccati rispetto a quanto si osserva invece nei gruppi di controllo e di bassa (Figg. 6.7, 6.8, 6.9). Inoltre, entrambi gli anni già dopo 8 giorni di trattamento, gli animali trattati con le due concentrazioni più alte presentano tutti deformità (Tab. 6.1). I girini mostrano edemi e rigonfiamenti (Figg. 6.5, 6.8), depigmentazione dal nero al marrone pallido e anormalità ed escrescenze della bocca (Fig. 6.6), coda ricurva o asimmetrica e malformazioni scheletriche (Figg. 6.5, 6.7, 6.8, 6.9).

Nella bassa concentrazione, per quanto riguarda la presenza di deformità (Tab. 6.1) il primo anno c'è un unico individuo deforme che raggiunge ugualmente la metamorfosi nei tempi e nei modi degli individui appartenenti al suo stesso gruppo, mostrando quindi di recuperare. Il secondo anno invece gli individui deformati sono tre e non raggiungono la metamorfosi prima del 52° giorno di trattamento. Questi individui sono stati esclusi quindi dall'analisi statistica.



Fig. 6.5 Girini esposti a 0.1 mg/l di endosulfan dopo 10 gg. Si nota la presenza di edema e di deformità nella colonna vertebrale e nella coda.



Fig. 6.6. Girino trattato con 0.05 mg/l di endosulfan dopo 40 gg. Evidente il cambiamento di colorazione e la deformità del disco orale insieme alla presenza di un'escrescenza.



Fig. 6.7 Dopo 25 gg di trattamento gli individui esposti a 0.05 mg/l rispetto al controllo risultano deformati ed in ritardo nello sviluppo.

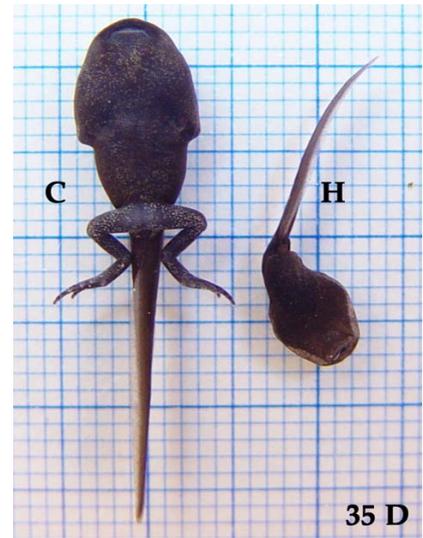


Fig. 6.8 Girino esposto a 0.1 mg/l di endosulfan dopo 35 gg di trattamento. È possibile notare la presenza di edema e di una malformazione scheletrica. Lo sviluppo è chiaramente fermo ad uno stadio precoce ed indefinito.



Fig. 6.9 Dopo 40 gg gli individui esposti a 0.1 mg/l risultano deformati e lo sviluppo è bloccato rispetto agli individui esposti a 0.01 mg/l.

6.8. Metamorfosi

Nessun individuo, nelle due concentrazioni più alte da noi testate, raggiunge la metamorfosi entrambi gli anni (Tab. 6.1); non risulta alcuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo di controllo e il gruppo della bassa nella proporzione di individui metamorfosati (Tab. 6.1, Fig. 6.10) entrambi gli anni (Fig. 6.11, 6.12).

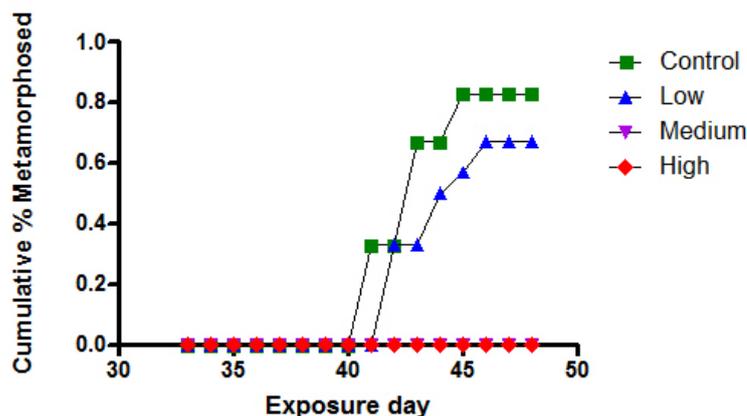


Fig. 6.10 Andamento della percentuale cumulativa di metamorfosati durante il periodo di climax metamorfico (ANOVA).

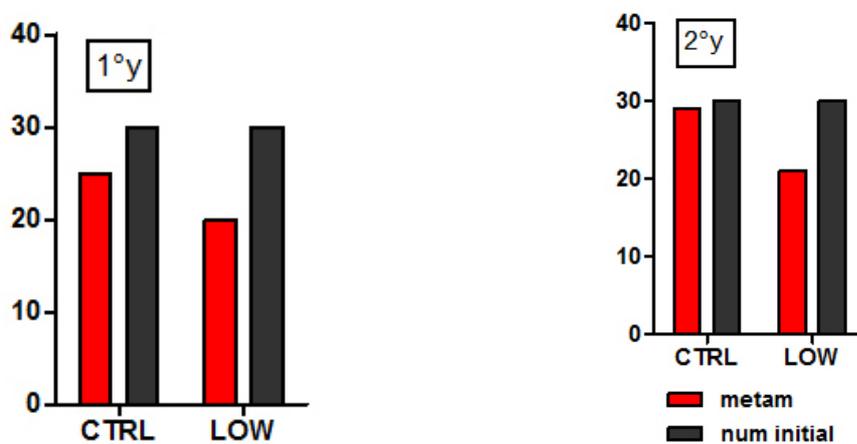


Fig. 6.11 Numero di metamorfosati: non esiste differenza significativa (Fisher's exact test $p > 0.05$) tra il gruppo di controllo e di bassa.

6.9. Analisi morfologica dell'apparato branchiale

In comparazione con le osservazioni sulla tolleranza e con l'analisi statistica, abbiamo utilizzato l'approccio morfologico per verificare eventuali alterazioni a carico dell'apparato branchiale di *Bufo bufo*, dopo esposizione cronica alle tre concentrazioni subletali di 0.01, 0.05 e 0.1 mg/l di endosulfan. Le osservazioni sono state effettuate dopo 4, 8, 14 e 20 giorni di esposizione.

6.10. Osservazioni al SEM sull'apparato branchiale dopo esposizione cronica

6.10.1. Bassa concentrazione (0.01 mg/l)

L'analisi morfologica dell'apparato branchiale degli individui esposti alla più bassa concentrazione (0.01 mg/l) da noi testata mostra già dopo 4 giorni di esposizione segni evidenti di alterazione, rispetto agli esemplari di controllo, a carico della porzione respiratoria della branchia. I ciuffi infatti appaiono leggermente disidratati nella parte distale, mentre i filtri mantengono il loro normale assetto morfologico (Figg. 6.12, 6.13).

Dopo 8 giorni ed in maggior grado dopo 14 e 20 giorni la morfologia delle branchie, di tutti gli animali trattati a bassa concentrazione, presenta alterazioni significative a carico sia dei ciuffi che dei filtri branchiali (Figg. 6.14, 6.15, 6.16, 6.17).

I ciuffi appaiono fortemente disidratati e raggrinziti (Figg. 6.14, 6.16).

I filtri si mostrano ripiegati o appiattiti nella porzione di sostegno (Fig. 6.15), mentre dopo 20 giorni si osserva una riduzione delle lamelle secondarie (Fig. 6.17). Inoltre, è evidente una notevole ed eccessiva presenza di muco già dopo 8 giorni di trattamento (Figg. 6.16, 6.18).



Fig. 6.12 Immagine al SEM. Ciuffi branchiali dopo 4 gg di trattamento. Si nota una leggera disidratazione nella parte distale. 185x

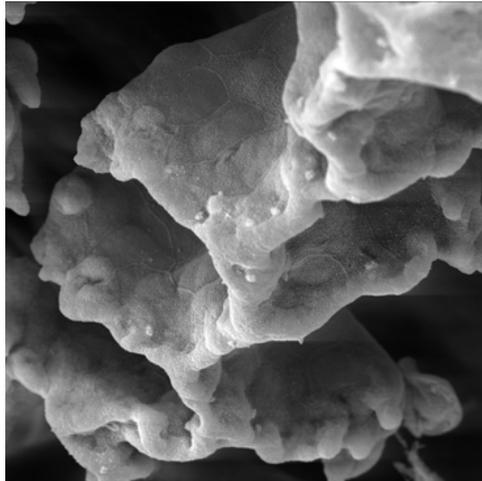


Fig. 6.13 Filtri branchiali dopo esposizione a 0.01 mg/l di endosulfan. Dopo 4gg non sono visibili alterazioni morfologiche. 1000x

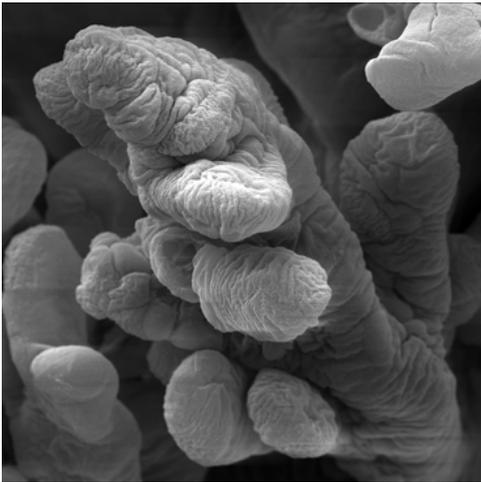


Fig. 6.14 Ciuffi branchiali dopo 14 gg di trattamento. Sono visibili fenomeni di disidratazione e collasso. 671x

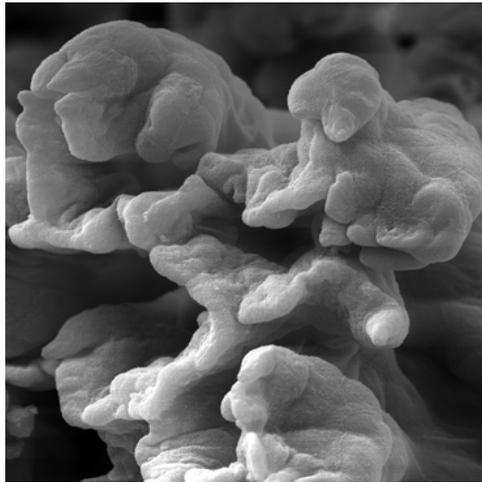


Fig. 6.15 Dopo 14 gg di trattamento i filtri branchiali appaiono ripiegati. 940x



Fig. 6.16 Immagine al SEM di ciuffi branchiali dopo 20 gg di esposizione a 0.01 mg/l di endosulfan. Si nota la presenza di muco, la riduzione e la disidratazione dei ciuffi. 378x

Fig. 6.17 I filtri branchiali dopo 20 gg di trattamento mostrano una riduzione delle lamelle secondarie. 500x

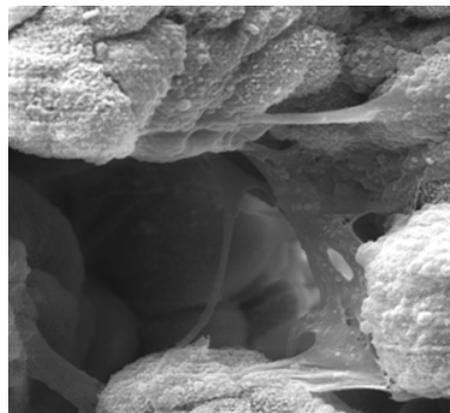
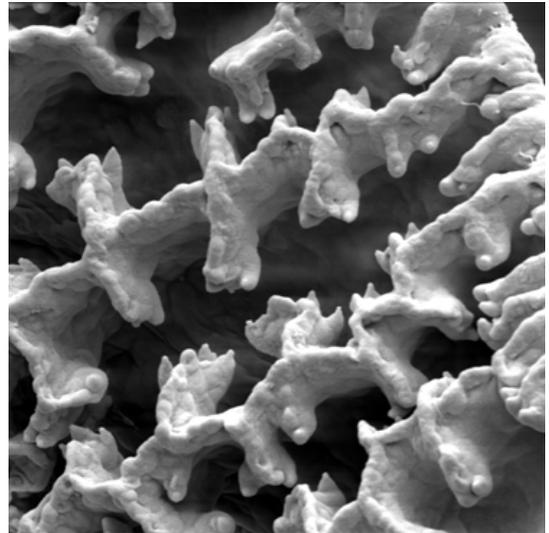


Fig. 6.18. Immagine a ingrandimento al SEM. Particolare del muco sui ciuffi branchiali. 2219x

6.10.2. Media (0.05 mg/l) ed alta concentrazione (0.1 mg/l)

Le medesime alterazioni si osservano nelle branchie degli individui esposti alle concentrazioni più alte da noi testate. Le alterazioni morfologiche diventano molto più evidenti e marcate con l'aumentare dei tempi di esposizione (Figg. 6.19, 6.21) arrivando a modificare totalmente la struttura della branchia rispetto agli esemplari di controllo (Fig. 6.20).

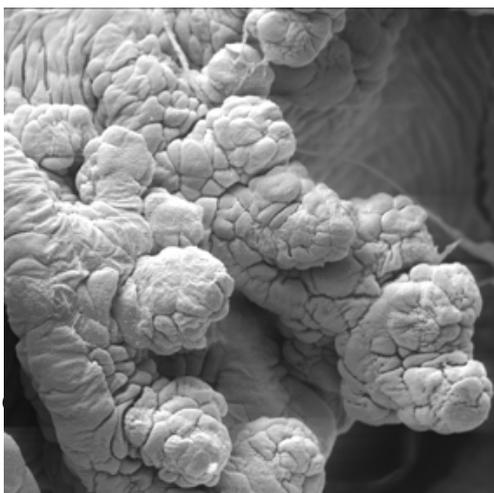


Fig. 6.19 Ciuffi branchiali dopo 20 gg di esposizione a 0.05 mg/l di endosulfan. Si nota la forte disidratazione dell'intera struttura. 464x

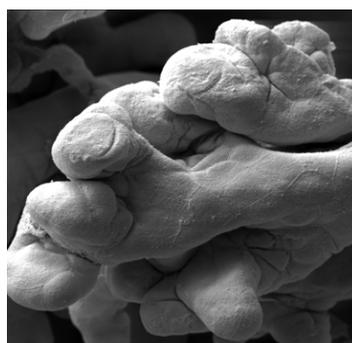


Fig. 6.20 Controllo 20 gg.

Fig. 6.21 Branchia di girino esposto a 0.1 mg/l di endosulfan dopo 20gg. Evidente la riduzione dei filtri sulla sinistra e dei ciuffi sulla destra. 360x



6.11. Osservazioni al TEM sull'apparato branchiale dopo esposizione cronica

L'analisi ultrastrutturale ha permesso di evidenziare numerose alterazioni in tutte e tre le concentrazioni di endosulfan testate. Le modificazioni epiteliali e cellulari, in filtri e ciuffi branchiali, sono uguali a quelle osservate durante l'esposizione acuta a 0.2 mg/l e riassunte in Tab. 6.2. Le prime alterazioni si osservano già a 4 giorni di esposizione; in maniera graduale, con l'aumento del tempo di esposizione e della concentrazione, le modificazioni si amplificano e comportano, a 20 giorni, notevoli stravolgimenti nel normale assetto cellulare ed epiteliale (Figg. 6.21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28).

Tab. 6.2 Tipologia di alterazioni osservate nei vari gruppi sperimentali

Alterazioni osservate	Ctrl	Bassa (0.01 mg/l)	Media (0.05 mg/l)	Alta (0.1 mg/l)
Formazione di ampi spazi intercellulari		*	*	*
Profilo endoteliale irregolare		*	*	*
Numerosi granuli di secrezione subapicali		*	*	*
Grandi vescicole secretrici intracitoplasmatiche		*	*	*
Numerosi lamellar bodies in PVCs e MRCs		*	*	*
Aumento volume delle cellule endoteliali		*	*	*
Degenerazione nucleare		*	*	*
Numerosa presenza di macrofagi e corpi residui		*	*	*
Comparsa nei filtri di cellule vescicolo-tubulari		*	*	*

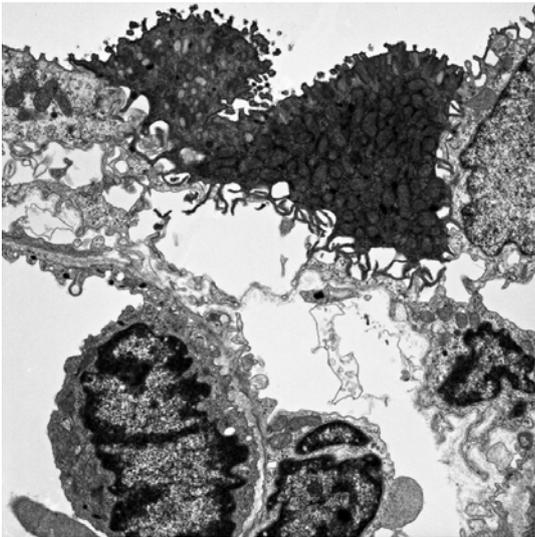


Fig. 6.22 Ciuffi branchiali dopo 20 gg di trattamento. Si nota l'aumento in volume delle cellule endoteliali, la formazione di ampi spazi intercellulari e la presenza di MRCs ancora funzionali. 4400x

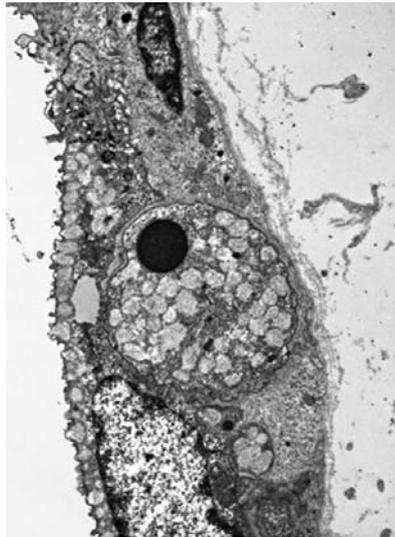


Fig. 6.23 Filtri branchiali dopo 20 gg di esposizione a 0.01 mg/l di endosulfan. Sono visibili segni di alterazioni cellulari. 4400x

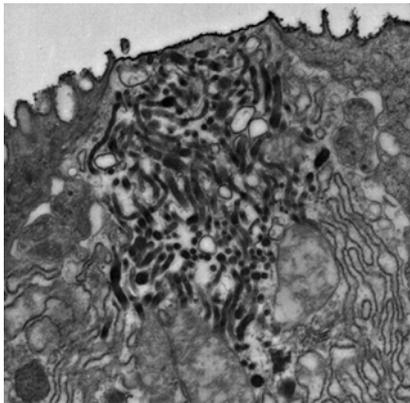


Fig.6.24 Vescicole tubulari e RER in cellula vescicolo-tubulare. 12000x

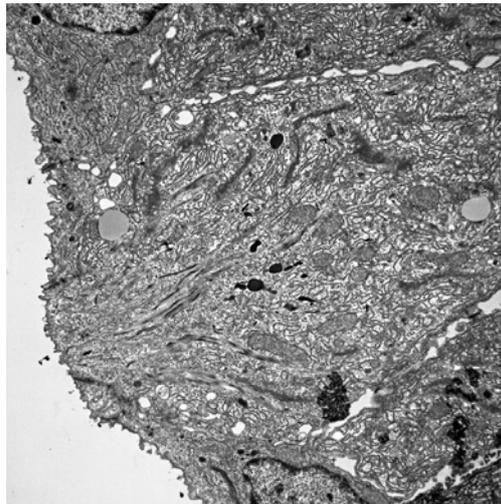


Fig. 6.25 Cellula vescicolo-tubulare in filtro branchiale dopo esposizione a 0.05 mg/l di endosulfan. 3000x

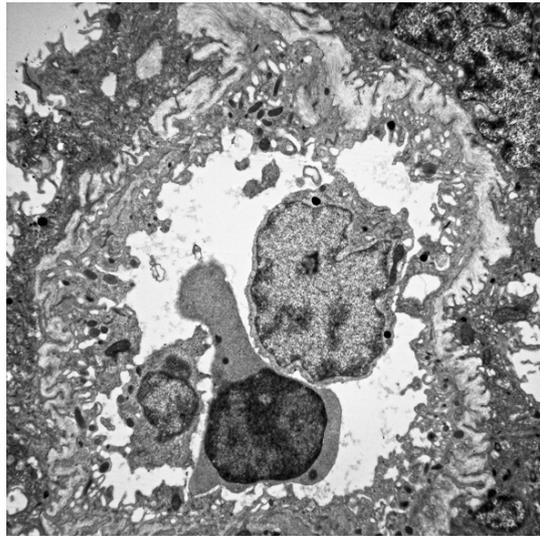


Fig. 6.26 Ciuffi branchiali dopo 20 gg di trattamento a 0.1 mg/l. Si nota il profilo endoteliale irregolare e la disorganizzazione epiteliale. 3000x

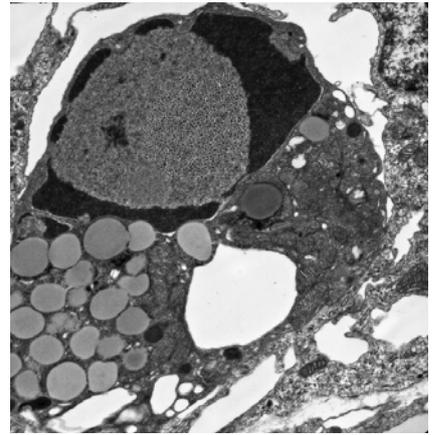
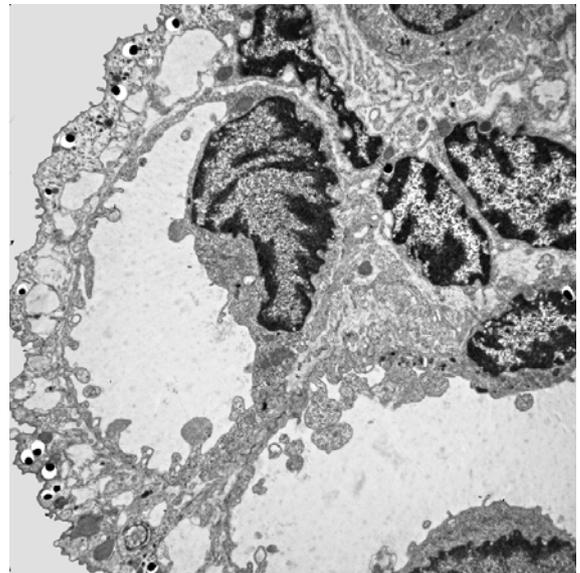


Fig. 6.27 Particolare ad alto ingrandimento in cui è possibile osservare l'evidente degenerazione nucleare e cellulare, la presenza di numerose vescicole secretrici e di lacune intercellulari. 7000x

Fig. 6.28 Ciuffo branchiali dopo esposizione a 0.1 mg/l di endosulfan. Dopo 20 gg sono visibili segni di alterazioni cellulari e nucleare. 3000x



CAPITOLO VII

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

L'endosulfan è attualmente soggetto a numerose regolazioni e piani di azione per i significativi effetti negativi sulla salute umana e sull'ambiente.

Nel luglio del 2007, la Commissione Europea ha proposto di anettere tale pesticida nella Convenzione di Stoccolma sui Persistent Organic Pollutants (POPs). Il dossier, prodotto dalla Commissione a tale scopo, riporta che l'endosulfan risponde pienamente ai criteri di annessione per: la persistenza, la capacità di causare effetti negativi, il possibile bioaccumulo e il trasporto ambientale ad ampie distanze (German Federal Environment Agency 2007).

In un'altra relazione, inoltre, l'EPA afferma che: "endosulfan is likely to result in acute and chronic risk to both terrestrial and aquatic organisms. This assessment is supported by monitoring data showing widespread contamination of surface water and incident data showing that endosulfan's current use represents a serious risk of non target mortality for aquatic species" (EPA 2001).

Le nostre osservazioni confermano che l'endosulfan può essere pienamente considerato un fattore di rischio, anche e soprattutto, per gli Anfibi sebbene in dossier come quelli precedentemente citati, rispetto agli altri Vertebrati, manca del tutto un sufficiente background d'informazioni.

7.1. LC₅₀

In tabella 7.1 sono riassunti i dati esistenti in letteratura riguardanti la tolleranza all'endosulfan di alcune specie di anuri. La concentrazione di endosulfan alla quale avviene la morte del 50% degli individui per i girini di *Bufo bufo* è risultata 0.43 mg/l a 96 h. Confrontando tale valore di LC₅₀ con quelli presenti in Tab. 7.1, si nota che i dati per tale composto sono molto differenti e che esiste una grande variazione specie specifica nella sensibilità; si conferma dunque quanto suggerito da diversi autori sul fatto che esistano significative variazioni fra le specie di anfibi rispetto ai livelli di tolleranza ad un pesticida (Berrill *et al.* 1998; Bridges & Semlitsch 2000).

I girini di *Rana tigrina* non sopravvivono a concentrazioni superiori a 0.0018 mg/l (Gopal *et al.* 1981), mentre valori di LC₅₀ superiori a 2.35 mg/l sono riportati per individui in metamorfosi di *Rana pipiens* (Harris *et al.* 2000) o più maggiori di 4.7 mg/l per i girini di *Rana clamitans* (Harris *et al.* 1998).

Inoltre, è necessario precisare che nei diversi lavori variano l'experimental setup (stadio scelto, percentuale di ingrediente attivo etc.) e le metodologie di test, non essendo state usate in tutti, ad esempio, quelle dettate dall'ASTM.

Risulta quindi difficile fare dei confronti statistici significativi ma possiamo dire che il valore riscontrato per le larve di *Bufo bufo* rientra nel range dei valori di tossicità riportati e, comunque, nel complesso quest'analisi preliminare ha avuto un ruolo importante nello stabilire la sensibilità delle larve del rospo comune ad un'esposizione acuta ad endosulfan.

Tab. 7.1 Valori di LC₅₀ a 96 h per l'endosulfan

Specie	LC ₅₀	Tempi	Stadio	Autori
<i>Rana tigrina</i>	0.0018 mg/l	96 h	larve	Gopal <i>et al.</i> 1981
<i>Bufo melanostictus</i>	0.123 mg/l	96 h	larve	Vardia <i>et al.</i> 1984
<i>Rana clamitans</i>	4.7 mg/l	96 h	larve	Harris <i>et al.</i> 1998
<i>Rana pipiens</i>	2.35 mg/l	96 h	larve	Harris <i>et al.</i> 2000
<i>Rana selvatica</i> <i>Rana clamitans</i> <i>Bufo americanus</i>	0.03-0.4 mg/l	96 h	larve	Berrill <i>et al.</i> 1998

7.2. Morfologia ed ultrastruttura dell'apparato branchiale di *Bufo bufo* dopo esposizione a breve termine a 0.2 mg/l di endosulfan

Le osservazioni condotte su girini di *Bufo bufo* hanno evidenziato che un'esposizione acuta alla concentrazione subletale di 0.2 mg/l di endosulfan induce considerevoli cambiamenti nell'organizzazione macroscopica dell'apparato branchiale, nonché nella sua struttura ed ultrastruttura.

In generale, sono disponibili dati limitati in comparazione con i nostri risultati per indagare le possibili conseguenze dei pesticidi sull'apparato respiratorio degli Anfibi; in particolare, il nostro è il primo studio sugli effetti dell'endosulfan. Un solo lavoro riguardante una specie del genere ilide ha fornito a livello microscopico ed ultrastrutturale una documentazione sulle alterazioni branchiali conseguenti all'intossicazione dall'erbicida paraquat (Lajamanovich *et al.* 1998).

Le alterazioni morfologiche sono evidenti già dopo 24 h ore di trattamento diventando più pronunciate dopo 48 e 96 h.

Le osservazioni al SEM ed al TEM hanno confermato i danni maggiori a carico dei ciuffi branchiali, la parte propriamente respiratoria della

branchia a cui è affidato il ruolo della regolazione osmotica ed acido-base (Hourdry 1974; Uchiyama & Yoshizawa 1992); ciò suggerisce effetti negativi non solo negli scambi gassosi ma anche nella osmoregolazione. Nel nostro studio abbiamo osservato innanzitutto una maggiore secrezione mucosa che diventa sempre più pronunciata con l'aumento dei tempi di esposizione fino a ricoprire l'intera superficie, soprattutto ventrale, delle branchie. In condizioni normali, tale secrezione viene rilasciata dai vacuoli delle cellule pavimentose (Kato & Kurihara 1988) ed ha la funzione probabilmente di creare un rivestimento mucoso che facilita lo scambio dei gas. La maggiore attività di secrezione può essere considerata quindi come un tentativo di difesa mirato a contenere l'ulteriore ingresso di contaminante; tale risposta è stata già osservata, per quanto riguarda i Pesci, nelle branchie di *Cirrhinus mrigala* esposto a malathion (Roy & Munshi 1991), e nell'epidermide di *Heteropneustes fossilis* (Bloch) esposto ad endosulfan (Zaccone *et al.* 1989).

Un'elevata secrezione di muco è stata osservata in *Bufo bufo* anche dopo esposizione a diverse diluizioni di acqua di mare (Bonacci *et al.* 2003) facendo supporre che la maggiore attività di secrezione sia una risposta di tipo aspecifico allo stress.

In ogni caso, l'eccesso di muco rende estremamente difficoltosi gli scambi respiratori provocando, in ultima istanza, un'aggravarsi delle condizioni di ipossia, come riportato in numerosi teleostei (Franklin 1990).

Dopo 48 h di esposizione in tutti gli esemplari trattati, le osservazioni condotte hanno evidenziato nell'epitelio branchiale l'aumento di spazi intercellulari e di vescicole secrete insieme con la comparsa di corpi lamellari.

Warburg e Rosenberg (1997) riportano la presenza, nelle branchie di *Triturus vittatus*, di vescicole secrete nelle così dette "granule-

containing cells”; in *Bufo bufo* non abbiamo mai osservato tali strutture in esemplari di controllo e non possiamo descrivere delle “granule-containing cells” perché le vescicole secrete appaiono insieme ai corpi lamellari nelle cellule pavimentose e dopo 96 h di esposizione anche nelle MRCs.

I corpi lamellari invece sono organelli secretori osservati in varie tipologie cellulari in condizioni normali e patologiche. È interessante notare che la presenza di tali strutture non è stata mai dimostrata nelle branchie di Anfibi; al contrario i corpi lamellari sono ben conosciuti nei Mammiferi dove sono prodotti negli alveoli polmonari da cellule pneumocita per fornire il sistema surfactante (Schmitz & Muller 1991).

Per quanto riguarda la porzione dorsale della branchia, i filtri, la maggiore alterazione è rappresentata dalla comparsa delle cellule vescicolo-tubulari dopo 96 h di esposizione. Questo tipo cellulare, mai osservato in esemplari di controllo, presenta tutte le caratteristiche di cellula deputata alla secrezione: una forma allungata con una stretta apertura sulla superficie esterna, una notevole estensione di apparato del Golgi e di reticolo endoplasmatico rugoso.

È possibile dunque ipotizzare che lo sviluppo di tali cellule, così come la comparsa di corpi lamellari e vescicole secrete, siano fenomeni coinvolti nell’aumentata secrezione di muco come una parte della risposta difensiva dell’epitelio branchiale all’esposizione ad endosulfan. Ulteriori analisi sono comunque necessarie per chiarire meglio il ruolo funzionale di tali strutture.

In accordo con Lajamanovich e collaboratori (1998) l’aumento degli spazi intercellulari può riflettere l’affluenza di liquidi plasmatici come risultato di una risposta infiammatoria all’endosulfan.

Tale considerazione insieme con i fenomeni di degenerazione epiteliale, l’evidenza di ipossia e l’osservazione nei girini trattati di un notevole

incremento nel numero di macrofagi, ci ha portato ad indagare possibili alterazioni funzionali mediante l'espressione dell'iNOS (l'isoforma maggiormente coinvolta nei processi patofisiologici (Nathan & Xie 1994). Alcuni autori hanno suggerito infatti che il pattern d'espressione dell'iNOS possa riflettere il grado di infiammazione in un tessuto e fornire un mezzo per indagare la risposta infiammatoria a varie sostanze chimiche, dato, inoltre, che proprio i pesticidi organoclorurati sono capaci di indurre la produzione di NO attraverso l' iNOS nei macrofagi (Kim *et al.* 2004; 2005).

L'analisi funzionale mostra una marcata differenza nell'intensità e nella localizzazione dell'iNOS nei differenti tempi di esposizione e nessuna o un debole "labelling" nei campioni di controllo. L'aumentato pattern di immunomarcatura notato dopo 24 e 48 h di esposizione può riflettere il grado di ipossia ed infiammazione nell'epitelio branchiale; la brusca diminuzione, invece, dell'espressione dell'iNOS dopo 96 h di trattamento indica che la struttura è ormai talmente compromessa (come mostrano le analisi morfologiche) che non riesce a mantenere la propria funzionalità fallendo, inoltre, nel tentativo di riparazione del tessuto danneggiato.

È possibile quindi ipotizzare, sulla base dei nostri risultati, un effetto a breve termine dell'ossido nitrico nel regolare il flusso sanguigno attraverso le branchie (Ebbesson *et al.* 2005) e nel contribuire alla modulazione della risposta infiammatoria.

Nei Mammiferi è stato dimostrato che il trattamento di macrofagi di ratto con endosulfan induce l'espressione dell'iNOS e citochine proinfiammatorie ed è stato suggerito, inoltre, per l'endosulfan una capacità infiammatoria (Han *et al.* 2007). Il coinvolgimento dell'NO nel tentativo di vasodilatazione può essere indicativo della capacità delle branchie di contrastare inizialmente gli effetti dell'inquinante,

bilanciando la presenza dell'eccesso di muco da un lato e, dall'altro, stimolando la proliferazione cellulare per sostituire gli elementi compromessi e rimossi, attraverso i fenomeni di sfaldamento e la formazione di lacune, a seguito dello stato infiammatorio. Ulteriori studi sono necessari per chiarificare i meccanismi coinvolti; è importante sottolineare che gli studi precedenti sul ruolo e l'attività dell'NO in risposta a pesticidi negli Anfibi hanno interessato esclusivamente l'epidermide (Fenoglio *et al.* 2006).

7.3. Morfologia ed ultrastruttura dell'apparato branchiale di *Bufo bufo* dopo esposizione cronica a diverse concentrazioni subletali di endosulfan

L'evidenza di uno stress respiratorio durante gli esperimenti di esposizione cronica ci ha suggerito di investigare potenziali alterazioni nelle branchie a livello morfologico ed ultrastrutturale come già realizzato per la tossicità acuta. Tali analisi hanno permesso di validare l'approccio morfologico e sono state affiancate dagli studi statistici su crescita, sviluppo, attività di nuoto e caratteristiche metamorfiche che discuteremo in seguito.

Le osservazioni condotte su girini di *Bufo bufo* hanno evidenziato che un'esposizione cronica a concentrazioni subletali (0.01, 0.05 e 0.1 mg/l) di endosulfan induce gravi alterazioni nella struttura ed ultrastruttura dell'apparato branchiale. Le modificazioni strutturali ed ultrastrutturali interessano sia i ciuffi che i filtri branchiali già dopo 4 giorni dall'inizio del trattamento e si osservano anche nella concentrazione più bassa da noi testata, rivelatasi statisticamente non deleteria per gli altri parametri di tolleranza considerati.

Le alterazioni osservate, inoltre, non si diversificano da quelle riportate durante esposizione acuta ma si presentano con la stessa negativa

incisività a livello tissutale e cellulare dopo tempi di esposizione più lunghi e con gravità proporzionale alla concentrazione.

Anche in questo tipo di esposizione i ciuffi branchiali sono caratterizzati da una generale perdita di turgore con collasso della porzione terminale, mentre nei filtri si osserva dopo 20 giorni di esposizione, in tutte e tre le concentrazioni, un appiattimento del rachide ed una diminuzione delle lamelle secondarie.

L'analisi ha confermato, inoltre, l'elevata attività di secrezione come risposta difensiva dell'epitelio respiratorio.

Le alterazioni ultrastrutturali sono le stesse già osservate dopo 96 h di esposizione a 0.2 mg/l, come, ad esempio, l'ampliamento degli spazi intercellulari e la formazione di lacune, la presenza di vescicole secretrici e lamellar bodies, la degenerazione nucleare o la comparsa di cellule vescicolo-tubulari nei filtri. Le modificazioni si diversificano, tra le tre concentrazioni studiate, soltanto per l'intensità dei fenomeni di degenerazione cellulare e tissutale (maggiori nelle concentrazioni più alte) e per il tempo di esposizione in cui tali fenomeni si manifestano (prima nelle concentrazioni più alte).

Le nostre osservazioni confermano il dato secondo cui sebbene l'esposizione a concentrazioni subletali di contaminante non provochi la morte immediata degli animali, essa può provocare comunque effetti a lungo termine potenzialmente dannosi; come mostrano i nostri risultati, si osservano alterazioni morfo-funzionali a carico dell'apparato branchiale la cui entità aumenta proporzionalmente al tempo di esposizione.

7.4. Tolleranza all'endosulfan

In studi precedenti è stato dimostrato che l'esposizione a breve termine (96 h) con concentrazioni di endosulfan comprese tra 0.00047 e 4.7 mg/l,

in girini di diverse specie e a diversi stadi di sviluppo, può causare una ridotta sopravvivenza ed un basso tasso di crescita, inappetenza ed alterazioni comportamentali, ritardo nella metamorfosi e deformità degli arti (Berrill *et al.* 1998; Harris *et al.* 2000). Inoltre, basse concentrazioni di insetticida (0.03-1.3 µg/l) in associazione con temperatura variabile e presenza di predatori producono una significativa diminuzione della sopravvivenza, dell'attività di alimentazione, della crescita e della risposta antipredatoria in larve di alcune specie di anuri australiani (Broomhall 2002, 2004).

Secondo le nostre attuali conoscenze, nessun altro studio ha considerato invece gli effetti di un'esposizione cronica ad endosulfan durante tutto lo sviluppo larvale, sebbene negli ultimi anni sia cresciuto l'interesse verso studi di tossicità cronica negli Anfibi. È infatti evidente la necessità di indagare gli effetti indiretti e subletali, spesso non macroscopicamente evidenti, che possono avere conseguenze a lungo termine e incidere sulle diverse funzioni della life-history degli individui esposti.

Mimare un'esposizione cronica acquista un'importante implicazione ecologica dal momento che la vita media in acqua dell'endosulfan è compresa tra 35 e 150 giorni (EPA 2001) e che è molto probabile che l'insetticida raggiunga i corpi d'acqua durante la primavera-estate (periodo di utilizzo), cioè quando molte specie di anfibi si riproducono e i loro embrioni e larve si sviluppano. Inoltre, gli effetti di un pesticida possono variare considerevolmente a seconda del periodo del ciclo vitale in cui gli anfibi sono esposti (Greulich & Pflugmacher 2003).

Gli effetti cronici di un pesticida possono gravemente colpire le dinamiche di popolazione negli Anfibi influenzando, più che l'immediata sopravvivenza, variabili quali la crescita e lo sviluppo, l'abilità di nuoto, le caratteristiche metamorfiche, il successo nel

foraggiamento, la sensibilità alla predazione o alla competizione ed il successo riproduttivo (Marian *et al.* 1983; Larson *et al.* 1998; Rosenshield *et al.* 1999; Fordham *et al.* 2001; Relyea & Mills 2001; Relyea 2004, Relyea *et al.* 2005).

Nel presente studio abbiamo mostrato che un'esposizione cronica a concentrazioni di endosulfan potenzialmente rilevabili in natura incide negativamente sulla sopravvivenza, sulla crescita e lo sviluppo larvale, compromette la metamorfosi e l'attività di nuoto e, inoltre, come discusso precedentemente, causa severi danni ed alterazioni nella morfologia dell'apparato branchiale nel girino di rospo comune.

Possiamo definire le concentrazioni da noi usate "rilevabili in natura" dal momento che livelli compresi tra 1.7 mg/l e 0.04 mg/l sono stati ritrovati in corpi d'acqua nelle vicinanze dei coltivi e fino a 200 m di distanza da dove era stato applicato l'endosulfan; per di più in una colonna d'acqua, dopo eventi di scorrimento superficiale, si possono rilevare fino a 0.5 mg/l di insetticida (Ernst *et al.* 1991, EPA 2001). Le concentrazioni più alte da noi testate (0.1 e 0.05 mg/l) quindi possono rappresentare i livelli di endosulfan dopo scorrimento superficiale dai vicini siti di applicazione o un eventuale aumento della concentrazione di tale composto durante il disseccamento di un corpo d'acqua qualsiasi. Alla luce delle nostre osservazioni e dall'analisi dei dati, possiamo affermare che concentrazioni che si erano rivelate subletali durante esposizione acuta, 0.1 e 0.05 mg/l, sono divenute letali durante quella cronica. Concordiamo pienamente con Bridges (2000) riguardo a quanto detto su un altro insetticida ampiamente studiato, il carbaryl: "long-term exposure to low levels is more detrimental to tadpoles than short-term exposure to high levels".

Non raggruppando i risultati provenienti dai due anni di esperimenti abbiamo voluto confermare la robustezza nei nostri dati indicando che i

girini rispondono in maniera uniforme al trattamento a prescindere dall'anno di sperimentazione e dal peso iniziale.

Tra gli effetti subletali da noi indagati, l'attività di nuoto (e quindi con essa l'abilità dei girini di orientarsi correttamente nel proprio ambiente) si è rivelata un elemento significativo indicante lo stress fisiologico sottostante oltre che un importante parametro dal punto di vista ecologico (Semlitsch *et al.* 1995). L'analisi statistica ha messo in evidenza due gruppi con comportamenti nettamente diversi: da un lato il gruppo formato dal controllo e dai girini esposti a bassa concentrazione che nuotano in maniera regolare per tutto il periodo di trattamento; dall'altro il gruppo formato dai girini della alta e media concentrazione che esibiscono invece un'alterata attività di nuoto. Abbiamo osservato infatti iperattività, convulsioni e "body twisting", principalmente nel primo periodo di esposizione (1-17 gg), seguiti da lunghi periodi di paralisi (resting). Nella descrizione e distinzione delle tipologie di movimento ci siamo basati sugli studi compiuti da Cooke, tra i primi a studiare gli effetti di DDT ed altri composti organoclorurati sugli Anfibi. Cooke (1972), ha descritto in larve di *Bufo bufo*, esposte a DDT e dieldrin, tre fasi, in successione o in contemporanea, caratterizzate da diverse tipologie di alterazioni nella performance di nuoto: "frantic" contrassegnata da "body twisting", nuoto rapido ed a scatti; "resigned" in cui i girini nuotano lentamente o compiono girandole su se stessi; e la fase finale caratterizzata da "shuddering" della coda che nel caso del dieldrin viene sostituita con una fase detta "moribund".

Per quanto riguarda il composto in esame, iperattività e paralisi sono stati riscontrati anche da Berrill e collaboratori (1998) in *R. sylvatica*, *R. clamitans*, e *B. americanus* durante le 96 h di esposizione a 0.053 mg/l o nel successivo periodo di recupero.

Nei Pesci, lo studio compiuto da Dutta e Arends (2003) ha mostrato che l'endosulfan gioca un ruolo significativo nella riduzione del AChE nel cervello, anche dopo esposizione di breve durata a basse concentrazioni. L'endosulfan infatti è stato ritrovato nei tessuti di rane con una depressa attività colinesterasica (Sparling *et al.* 2001). L'inibizione dell'attività del AChE genera un accumulo di ACh causando quindi un declino nel controllo neuronale e muscolare.

È necessario alla luce dei nostri risultati specificare che i disordini motori possono esser causati anche dalle deformità corporee, malformazioni scheletriche e alterazioni nella forma della coda, che si presentano ovviamente durante l'esposizione nel periodo delicato dello sviluppo larvale. Alterazioni motorie e deformità (tra le altre anche quelle della bocca) possono aver ridotto l'attività di alimentazione e causato l'inappetenza osservata nei girini esposti a 0.1 e 0.05 mg/l, ciò può a sua volta aver comportato la minore massa larvale e quindi la crescita e, in ultima istanza, la ridotta sopravvivenza.

Alterazioni morfologiche, causate dai pesticidi, sono stati ben documentati e differiscono con le specie di anfibi e il tipo di inquinante (Marian *et al.* 1983; Harris *et al.* 1998; Bridges 2000; Boone *et al.* 2001; Fordham *et al.* 2001; Greulich & Pflugmacher 2003).

Curvature e deviazione della coda, malformazioni della colonna sul piano orizzontale, edemi e rigonfiamenti nella zona della camera branchiale e della testa, il cambiamento di colorazione della pelle così come le anomalie della bocca e la presenza di tessuti intorno al disco orale sono stati già osservati in *Bufo bufo* esposto a DDT e dieldrin (Cooke 1972). Per quanto riguarda l'endosulfan l'elevata incidenza di deformità è stata riportata in altre specie di anuri ma a più alte concentrazioni rispetto a quelle da noi utilizzate (Harris *et al.* 1998, 2000).

Effetti subletali, quali alterazioni motorie e morfologiche, possono essere molto problematiche in natura ed avere diverse implicazioni ecologiche. Ad esempio, i girini che nuotano lentamente, a scatti o con una ridotta attività sono maggiormente sensibili alla predazione (Feder 1982; Jung & Jagoe 1995) assumendo che i predatori non siano stati soggetti allo stesso tipo di esposizione. Inoltre, è noto che la quantità di tempo speso a nuotare è correlato con il tempo speso a nutrirsi (Horat & Semlitsch 1994) che a sua volta è direttamente collegato con la quantità di cibo assunto (Rist 1994); la conseguenza di quanto detto è un effetto negativo sul tasso di crescita e di sviluppo delle larve di Anfibi (Semlitsch 1993). Negli Anfibi è stato ben documentato che un basso tasso di crescita e di sviluppo durante gli stadi larvali può negativamente influenzare caratteristiche degli adulti legate alla fitness: come dimensione alla maturità, sopravvivenza alla prima riproduzione, fecondità e successo di accoppiamento (Berven & Gill 1983; Smith 1987; Semlitsch *et al.* 1988). Gli individui trattati con 0.1 e 0.05 mg/l di endosulfan, oltre a mostrare severe deformità ed un'attività di nuoto fortemente alterata, presentano: un'elevata mortalità, dal 53% fino al 96.7%, un ritardo se non addirittura un blocco nella crescita e nello sviluppo e soprattutto nessun individuo raggiunge la metamorfosi in entrambi gli anni di trattamento.

La mancata metamorfosi potrebbe essere causata da un malfunzionamento del sistema tiroideo. Fort e collaboratori (2000) hanno infatti dimostrato che l'endosulfan inibisce il riassorbimento della coda in *Xenopus laevis*, dopo 14 giorni di esposizione a 0.05 mg/l, e che negli individui esposti sono presenti bassi livelli di triiodotironina (T3). Ciò fa supporre che l'endosulfan possa agire sull'asse tiroideo alterando la sintesi degli ormoni, il loro trasporto o i recettori; risulta evidente che l'inibizione della metamorfosi, causata da un effetto antitiroideo, può essere estremamente dannosa in popolazioni naturali.

La concentrazione più bassa da noi testata (0.01 mg/l) non causa alcun effetto statisticamente significativo sebbene abbiamo osservato una tendenza ad avere un peso corporeo minore, rispetto ai controlli, durante tutto lo sviluppo ed alla metamorfosi. Anche se non si può dire con certezza alla luce dei nostri risultati, un tasso di crescita larvale lievemente ridotto nell'ambiente naturale (influenzando la dimensione alla metamorfosi od il tempo impiegato a raggiungerla) potrebbe avere implicazioni negative sulla fitness futura (Altwegg & Reyer 2003).

Dall'analisi dei nostri dati si osserva che il tasso di mortalità non differisce tra il gruppo di controllo e quello di bassa ma, entrambi gli anni, in quest'ultimo gruppo abbiamo osservato un incremento maggiore nel numero di individui morti all'inizio della metamorfosi. Potrebbe valere per l'endosulfan quanto suggerito da diversi autori riguardo i composti ad alta affinità per i lipidi, quali gli organoclorurati, che accumulati nei tessuti corporei potrebbero d'improvviso essere mobilizzati durante il riassorbimento della coda e causare quindi un aumento della mortalità (Fioramonti *et al.* 1997; Bridges 2000). Inoltre, è stato dimostrato che gli ormoni tiroidei possono amplificare la tossicità di alcuni composti clorurati come ad esempio la diossina TCDD (Rozman 1984). Gli ormoni tiroidei raggiungono alti livelli nei girini proprio durante la fase di climax metamorfico (Mondou & Kaltenbach 1979; Weil 1986) e potrebbero incrementare dunque il rischio di effetti tossici da contaminanti clorurati per gli individui in tale momento cruciale (McKinney *et al.* 1985; Kloas 2002).

Un discorso analogo potrebbe essere fatto per i tre individui che, il secondo anno, hanno subito un forte rallentamento poco prima e durante la metamorfosi e che soprattutto presentavano delle deformità.

Può essere dunque confermato quanto detto da Cooke (1981) per il DDT: “tadpoles that were slow to metamorphose were more likely to be deformed”.

Nei girini esposti alla bassa concentrazione per mezzo dell’analisi morfologica, in contrasto con quella statistica, sono state rivelate nelle branchie gravi alterazioni strutturali ed ultrastrutturali, causa dello stress respiratorio osservato. Non si può dunque escludere che l’endosulfan possa aver avuto effetti negativi anche su altri organi o apparati; questi effetti “invisibili” a livello macroscopico e ad un’analisi esclusivamente statistica dei dati possono divenire pericolosi a lungo termine, soprattutto in natura, senza essere direttamente letali o diminuendo l’immediato successo alla metamorfosi. Tali evidenze suggeriscono l’importanza e l’efficacia dell’approccio morfologico negli studi ecotossicologici, anche in assenza di un risultato statisticamente significativo, dal momento che i contaminanti possono recare danno agli Anfibi a diversi livelli.

In realtà, il rischio di effetti dannosi è più grande in natura dove l’endosulfan può agire in sinergia con altri fattori di stress ambientale, come altri pesticidi o un pH acido o i raggi UV, incrementando la sensibilità alla predazione, competizione, e compromettendo le componenti future implicate nella fitness.

In conclusione, lo studio ha messo in luce l’importanza degli studi ecotossicologici compiuti sulle larve durante tutto il periodo acquatico larvale; tali studi si focalizzano sulle risposte subletali e sono quindi rilevanti per comprendere l’impatto a lungo termine dei pesticidi sugli Anfibi, specialmente alla luce dell’attuale sforzo conservazionistico per preservare gli ambienti umidi naturali, limitare la perdita di biodiversità e spiegare i meccanismi responsabili del declino delle popolazioni.

BIBLIOGRAFIA

Ahmad N, Edge V, Rohas P, 1995. Aerial Transport of Endosulfan Proc. Annual Program Workshop, Minimising the Impact of Pesticides on the Riverine Environment, Sydney, 22-23 August 1995. Land and Water Resources Research and Development Corporation. Quoted in <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41>

Altwegg R, Reyer HU, 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* 57:872-882

Anderson HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermansen IM, Bonefeld, Jorgensen EC, 2000. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity and aromatase activity invitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179:1-12

Annual EU-wide Pesticide Residues Monitoring Reports

http://europa.eu.int/comm/food/fs/inspections/fnaoi/reports/annual_eu/summ39701_en.pdf

ASTM, 1997. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. E 729-790. In American Society for Testing and Materials Standards, Philadelphia

Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia, 2006. *Societas Herpetologia Italica*. Edizioni Polistampa, Firenze

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) 2000. Toxicological profile for endosulfan. Atlanta GA. USA

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) 2001. Endosulfan Fact sheet (ToxFAQs), US Dept of Health and Human Services, Public Health Services, Division of Toxicology, Atlanta Georgia

Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocombe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes H, 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proceedings National Academy of Science USA*, 95: 9031-9036

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

Berven KA, Gill DE, 1983. Interpreting geographic variation in life-history traits. *Am. Zool.* 23:85-97

Blaustein AR, 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Bull Ecol. Soc. Am.* 71:127-128

Blaustein AR, Wake DB, 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Sci. Amer.* 272:52-5

Blaustein AR, Edmond B, Kiesecker JM, Beatty JJ, Hokit DG, 1995. Ambient ultraviolet radiation causes mortality in salamander eggs. *Ecological Applications* 5:740-743

Blaustein AR, Kiesecker JM, Chivers DP, Hokit DG, MarcoA, Belden LK, Hatch AC, 1998. Effects of ultraviolet radiation on amphibians: field experiments. *American Zoologist* 38:799-812

Blaustein AR, Romansic JM, Kiesecker JM, Hatch AC, 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distribution* 9:123-140

Bonacci A, Brunelli E, Rossi F, Tripepi S, 2004. Effetti della salinità sulla morfologia e l'ultrastruttura dell'apparato respiratorio larvale di *Bufo bufo* (*Anura, Bufonidae*). Riassunti 65° Congresso Nazionale dell'Unione Zoologica Italiana, Taormina-Giardini Naxos, 21-25 Settembre 2004

Boone MD, Bridges CM, Rothermel BB, 2001. Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of an insecticide. *Oecologia* 129:518-524.

Boone MD, Semlitsch RD, 2002. Interactions of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. *Ecological applications* 12:307-316

Boone MD, Bridges CM, 2003. Effects of pesticides on amphibian populations. Pages 152-167 in R. D. Semlitsch, editor. *Amphibian Conservation*. Smithsonian Institution, Washington

Bradford DF, Swanson C, Gordon MS, 1992. Effects of low pH and aluminium on two declining species of amphibians in the Sierra Nevada, California. *Journal of Herpetology* 26:323-327

Bridges CM, 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology & Chemistry* 16:1935-1939

Bridges CM, 1999a. Effects of a pesticide on tadpole activity and predator avoidance behavior. *Journal of Herpetology* 33:303-306

Bridges CM, 1999b. Predator-prey interactions between two amphibian species: Effects of insecticide exposure. *Aquatic Ecology* 33:205-211

Bridges CM, 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenocephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39:91-96

Bridges CM, Semlitsch RD, 2000. Variation in Pesticide Tolerance of Tadpoles among and within Species of Ranidae and Patterns of Amphibian Decline. *Conservation Biology* 14:1490-1499

Broomhall S, 2002. The effects of endosulfan and variable water temperature on survivorship and subsequent vulnerability to predation in *Litoria citropa* tadpoles. *Aquat. Tox.* 61:243-250

Broomhall S, 2004. Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog. *J. App. Ecol.* 41:105-113

Brunelli E, Perrotta E, Tripepi S, 2004. Ultrastructure and development of the gills in *Rana dalmatina* (Amphibia, Anura). *Zoomorphology Evolutionary, Comparative and Functional Morphology*, 123: 203-211

Carey C, Bryant CJ, 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and declines of amphibian populations. *Environmental Health Perspectives*, 103:13-17

Carey C, Cohen N, Rollins-Smith C, 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology*, 23:459-472

Carey C, 2000. Infectious disease and worldwide declines of amphibian populations, with comments on emerging diseases in coral reef organisms and in humans. *Environmental Health Perspectives*, 108:143-150

Castellano S, Giacoma C, 1990. Selezione sessuale in maschi di *Bufo bufo*. Atti VI Conv. naz. Ass. "A. Chigi", Torino (1989), Mus. reg. Sci. Nat. Torino 161-164

Cerejiera MJ, Viana P, Batista S, Pereira T, Silva E, Valerio MJ, Silva A, Ferreira M, Silva Fernandes AM, 2003. Pesticide in Portuguese surface and ground water . *Water res.* 37:1055-63

Cerrillo I, Granada A, Lopez-Espinosa MJ, Olmos B, Jimenez M, Cano A, Olea N, Fatima Olea-Serrano M. 2005. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environ. Res.* 98:233-239

Chaudhuri K, Selvaraj S, Pal AK, 1999. Studies on the genotoxicology of endosulfan in bacterial system. *Mutat. Res.* 439:63-67

Christin MS, Gendron D, Andree P, Brousseau L, Menard J, Marcogliese David, Cyr D, Ruby S, Fournier M, 2003. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environmental Toxicology & Chemistry* 22:1127-1133

Cooke AS, 1972. The effects of DDT, dieldrin and 2,4-D on amphibian spawn and tadpoles. *Environmental Pollution* 3:51-68

Cooke AS, 1981. Tadpoles as indicator of harmful levels of pollution in the field. *Environ. Pollut.* 25:123-133

Coons AH, Leduc EH, Connolly JM, 1955. 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

Cunningham AA, Langton TES, Bennett PM, Lewin JF, Drury SEN, Gough RE, Macgregor SK, 1996. Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 351:1539-1557

Dalsenti PR, Dallegrove E, Mello JR, Langloh A, Oliveira TR, Faqi AS, 1999. Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation; *Hum. Exp. Toxicol.* 18:583-589

Dalvie MA, Cairncross E, Solomon A, London L, 2003. Contamination of rural surface and ground water by endosulfan in farming areas of the Western Cape, South Africa. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 2:1-15, Publisher: BioMed Central

Davidson C, Bradley Shaffer H, Jennings MR, 2002. Spatial Tests of the Pesticide Drift, Habitat Destruction, UV-B, and Climate-Change Hypotheses for California Amphibian Declines. *Conservation Biology*, 16:1588-1601

Davidson C, 2004. Declining downwind: Amphibian population declines in California and historic pesticide use. *Ecol. Appl.* 14:1892-1902

De la Cruz AA, Yarbrough JD, 1982. The role of aquatic weeds in maintaining surface water quality. Proj.No. A-134-MS, U.S.D.I, Water Resour. Res. Inst., Mississippi State Univ. (1982), quoted from AQUIRE Database of U.S. EPA

Diamond JM, 1996. Conservation biology. A-Bombs against amphibians. *Nature*, 383:386-387

Duellmann WE, Trueb L, 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Book Company, New York

Dutta HM, Arends DA, 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ Res* 92:329-341

Dutta HM, Misquitta D, Khan S, 2006. The Effects of Endosulfan on the Testes of Bluegill Fish, *Lepomis macrochirus*: A Histopathological Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51:149-156

Ebbesson LE, Tipsmark CK, Holmqvist B, Nilsen T, Andersson E, Stefansson SO, Madsen SS, 2005. Nitric oxide synthase in the gill of Atlantic salmon: colocalization with and inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase
The Journal of Experimental Biology 208:1011-1017

European Commission 2004. Monitoring of Pesticide Residues in Products of Plant Origin in the European Union, Norway, Iceland and Lichtenstein 2004

EFSA (European Food Safety Authority) 2005. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to endosulfan as undesirable substance in animal feed. In EFSA Journal 234:1-29

EJF Environmental Justice Foundation 2002. End of the Road for Endosulfan: A Call for Action Against a Dangerous Pesticide. London, UK.

Ernst WR, Doe JK, Julien G, Hennigar P, 1991. Toxicity to aquatic organisms of off-target deposition of endosulfan applied by aircraft. Environ Toxicol Chem 10:103-14

EXTOXNET 1996. Extension Toxicology Network. Internet Site. A Pesticide Information of Cooperative Extension Offices of Cornell University, Michigan State University, Oregon State University and University of California at Davis. [http:// pmep.cce.cornell.edu/profil-lor-glyphosphate/endosulfan-ext.html](http://pmep.cce.cornell.edu/profil-lor-glyphosphate/endosulfan-ext.html)

Fatoki OS, Awofolus OR, 2004. Levels of organochlorine pesticide residues in marine, surface, ground and drinking water from eastern Cape Province in South Africa. J. Environ. Sci. Health 39:101-114

Feder ME, 1982. Effects of developmental stage and body size on oxygen consumption of anuran larvae: A reappraisal. *J Exp Zool* 220:33-43

Fenoglio C, Grosso A, Boncompagni E, Milanese G, Gandini C, Barni S, 2006. Morphofunctional evidence of changes in principal and Mitochondria-Rich Cells in the epidermis of the frog *Rana kl. esculenta* living in a polluted habitat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51:690-702

Fernandez MF, Olmos B, Granada A, López-Espinosa MJ, Molina-Molina MJ, Fernandez JM, Cruz M, Olea-Serrano F, Olea N, 2007. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ. Health Perspect.* *In press*

Ferri V, 2000. Una strategia regionale di conservazione degli Anfibi: il "Progetto Rospi Lombardia" (pp. 767-772)- in Giacomina C. (ed.), *Atti I Congresso Nazionale Societas Herpetologia Italica*, Torino (1996), Mus. reg. Sci. Nat. Torino, 821 pp

Finney DJ, 1971. *Probit analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, New York, p 668

Fioramonti E, Semlitsch RD, Reyer HU, Fent K, 1997. Effects of triphenyltin and pH on the growth and development of *Rana lessonae* and *Rana esculenta* tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:1940-1947

Fischer R, 1984. The effect of Hoe02671 OI EC33 B305 (Endosulfan, Emulsifiable Concentrate 352 g/L) to *Lepomis macrochirus* (Bluegill Sunfish) in a Static Test. AgrEvo Doc. No. A29508, unpublished results

Fisher GM, Schaffer HB, 1996. The decline of amphibians in California's Great Central Valley. *Conservation Biology*, 10:1387-1397

Fordham CL, Tessari JD, Ramsdell HS, Keefe TJ, 2001. Effects of malathion on survival, growth, development, and equilibrium posture on bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:179-184

Fort DJ, Rogers RL, Morgan LA, Miller MF, Clark PA, White JA, Paul RR, Stover EL, 2000. Preliminary validation of a short-term morphological assay to evaluate adverse effects on amphibian metamorphosis and thyroid function using *Xenopus laevis*. *J. Appl. Toxicol.* 20:419-425

Franklin GE, 1990. Surface ultrastructure changes in the gills of sockeye salmon (Teleostei: *Oncorhynchus nerka*) during seawater transfer: comparison of successful and unsuccessful seawater adaptation. *J. Morphol.* 206:13-23

Gabrielsen GW, Knudsen LB, Verrault J, Push K, Muir DDC, Letcher RJ, 2004. Halogenated organic contaminants and metabolites in blood and adipose tissues of polar bears (*Ursus maritimus*) from Svalbard SPFO Report 915/2004 , October 2004

Gendron AD, Marcogliese DJ, Barbeau S, Christin MS, Brousseau P, Ruby S, Cyr D, Fournier M, 2003. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia* 135:469-476

German Federal Environment Agency -Umweltbundesamt, Dessau February 2007. Endosulfan - Draft Dossier prepared in support of a proposal of endosulfan to be considered as a candidate for inclusion in the Annexes to the Stockholm Convention

Giusi G, Facciolo RM, Alò R, Carelli A, Madeo M, Brandmayr P, Canonaco M, 2005. Some environmental contaminants influence motor and feeding behaviors in the Ornate wrasse (*Thalassoma pavo*) via distinct cerebral histamine receptor subtypes. Environ. Health Perspect. 113:1522-1529

Glennemeier KA, Denver RJ, 2001. Sublethal effects of chronic exposure to an organochlorine compound on northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. Environmental Toxicology, 16: 287-297

Gonzalez-Farias F, Gisneros Estrada X, Fuentes Rui ZC, Diaz Gonzalez G, Botello AV, 2002. Pesticides distribution in sediments of tropical coastal lagoon adjacent to an irrigation district in northwest Mexico. Environ. Technol. 23:1247-56

Gopal K, Anand M, Khanna RN, Misra D, 1980. Endosulfan induced changes in blood glucose of catfish, *Clarias batrachus*. J Adv Zool 1:68-71

Gopal K, Khanna RN, Anand M, Gupta GSD, 1981. The acute toxicity of endosulfan to freshwater organism. Toxicol. Lett. 7:453-456

Gormley KL, Teather KL, 2003. Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54:330-338©

Gosner KL, 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16:183-190

Gradwell N, 1970. The function of the ventral velum during gill irrigation in *Rana catesbeiana*. *Can. J. Zool.* 48:1179-1186

Gradwell N, 1972. Gill irrigation in *Rana catesbeiana*. Part I. On the anatomical basis. *Can. J. Zool.* 50:481-499

Gregor DJ, Gummer WD, 1989. Evidence of atmospheric transport and deposition of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Canadian Arctic snow. *Environ Sci Technol* 23:561-65

Greulich K, Pflugmacher S, 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology* 65:329-336

Grumfeld HT, Bonfeld-Jorgensen EC, 2004. Effects of invitro estrogenic pesticides on human oestrogen receptor alpha and beta mRNA levels. *Toxicol. Lett.* 1,151:467-80

Haider S, Imbaray RM, 1986. Relative Toxicity of Technical Material and Commercial Formulation of Malathion and Endosulfan to a Fresh Water Fish, *Channa punctata*. *Ecotoxic. Environ. Safety* 11:347-351

Han EH, Hwang YP, Kim HG, Jeong HG, 2007. Inflammatory effect of endosulfan via NF- κ B activation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355:860-865

Harner T, Pozo K, Gouin T, Macdonald AM, Hung H, Caine J, Peters A, 2006. Global pilot study for persistent organic pollutants (POPs) using PUF disk passive air samples. *Environ. Poll.* 144:445-452

Harris ML, Bishop CA, Struger J, Ripley B, Bogart JP, 1998. The functional integrity of northern leopard frog (*Rana pipiens*) and green frog (*Rana clamitans*) populations in orchard wetlands. II. Effects of pesticides and eutrophic conditions on early life stage development. *Environ. Tox. Chem.* 17:1351-1363

Harris ML, Chora L, Bishop CA, Bogart JP, 2000. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens* and *Bufo americanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64:263-270

Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A, 2002b. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:5476-5480

Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A, 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American Leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives* 111:568-575.

Hermann M, 2003. Endosulfan Preliminary Dossier; www.unece.org/env/popsxg/docs/2000-2003/dossier-endosulfan-may03

Hoechst. 1975. Beta-endosulfan pure (analysis GOE 1495): Acute oral toxicity in female SPF-Wistar rats. Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt, Germany. Doc #A05270. unpublished study

Hoechst. 1987. Endosulfan - active ingredient technical (code HOE 02671 OI ZD97 0003): 30-Day feeding study in adult male Wistar rats. Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt, Germany. Project no. 87.0129. unpublished study

Hoechst. 1990. Summary and evaluation of the toxicity data for endosulfan - substance technical. (code: HOE 002671) Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt, Germany. Report no. 90.0848. unpublished study

Horat P, Semlitsch RD, 1994. Effects of predation risk and hunger on the behaviour of two species of tadpoles. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 34:393-401

Houlahan JE, Findlay CS, Schmidt BR, Meyer AH, Kuzmin SL, 2000. Quantitative evidence for global amphibian population decline. *Nature* 404:752-755

Hourdry J, 1974. Étude des branchies "internes" puis de leur régression au moment de la métamorphose, chez la larve de *Discoglossus pictus* (Otth), Amphibien, Anoure. *J. Microscopie*, 20:165-182

Howe GE, Gillis R, Mowbray RC, 1998. Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:519-525

Hudson RH, Tucker RK, Haegele, 1984. Handbook of acute toxicity of pesticides to wildlife, Resource Publication 153. U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC, pp 6-54

IPEN Pesticide Working Group Project 2004 Usha S. and Harikrishnan V. R. Endosulfan - Fact sheet and Answers to Common Questions.

Jauhar I, Kulshrestha SK, 1985. Histopathological effects induced by sublethal doses of Sevin and Thiodan on the gills of *Channa striatus* Bl. Acta hydrochim. hydrobiol. 13:395-400

Jonsson CM, Toledo MCF, 1993. Acute Toxicity of Endosulfan to the Fish *Hyphessobrycon bifasciatus* and *Brachydanio rerio*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 24:151-155

Jonsson CM, Toledo MCF, 1993. Bioaccumulation and elimination of endosulfan in the fish Yellow Tetra (*Hyphessobrycon bifasciatus*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50:572-577

Jung RE, Jagoe CH, 1995. Effects of low pH and aluminum on body size, swimming performance, and susceptibility to predation of green frog (*Hyla cinerea*) tadpoles. Can J Zool 73:2171-2183

Karim AA, Haridi AA, el Rayah EA, 1985. The environmental impacts of four insecticides on non target organisms in the Gezira Irrigation Scheme canals of Sudan. J. Trop. Medic. Hyg: Vol 88, ISS 2, P 161-8

Kato S, Kurihara K, 1988. Electron microscopic studies of the external gill epithelium of the salamander, *Hynobius dunni* Tago, followed throughout larval life. *Okajimas Folia Anat. Japan.* 65:177-202

Kim JY, Choi CY, Lee KJ, Shin DW, Jung KS, Chung YC, Lee SS, Shin JG, Jeong HG, 2004. Induction of inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokines expression by o,p-DDT in macrophages. *Toxicol. Lett.* 147:261-269

Kim JY, Oh KN, Han EH, Kim DH, Jeong TC, Lee ES, Jeong HG, 2005. Methoxychlor-induced inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokines expression in macrophages via NF- κ B, ERK, and p38 mitogen-activated protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333:1234-1240

Klemens JA, Wieland ML, Flanagan VJ, Frick JA, Harper RG, 2003. A cross taxa survey of organochlorine pesticide contamination in a Costa Rica Wet land. *Environmental pollution* 122:245-51

Kloas W, 2002. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *Int Rev Cytol* 216:1-57

Knapp RA, Matthews KR, Sarnelle O, 2001. Resistance and resilience of alpine lake fauna to fish introductions. *Ecological Monographs* 71:401-421

Kutluhan S, Akhan G, Gulterkin F, Kurdoglu E, 2003. Three cases of recurrent epileptic seizures caused by endosulfan. *Neurol.India.* 51:102-3

Lajmanovich RC, Izaguirre MF, Casco VH, 1998. Paraquat tolerance and alteration of internal gill structure of *Scinax nasica* tadpoles (Anura: Hylidae). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34:364-369

Lajmanovich RC, Cabagna M, Peltzer PM, Stringhini GA, Attademo AM, 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (*Amphibia: Hylidae*) exposed to insecticide endosulfan. Mutation Research 587:67-72

Larson DL, McDonald S, Fivizzani AJ, Newton WE, Hamilton SJ, 1998. Effects of the herbicide atrazine on *Ambystoma tigrinum* metamorphosis: duration, larval growth, and hormonal response. Physiol Zool 71:671-679

Laurent P, Perry SF, 1991. Environmental effects on fish gill morphology. Physiol. Zool. 53:4-25

Legambiente Dossier - Pesticidi nel Piatto 2007. A cura di: Milena Dominici, Rina Guadagnini, Daniela Sciarra, Francesca Battistelli

Leonard AW, Hyna RV, Leigh KA, Le J, Beckett R, 2001. Fate and toxicity of endosulfan in Naomi River water and bottom sediments. J.Environ.Qual. 30:750-9

Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström Å, Pettersen J, Bergman R, 1998. Experimental design and optimization. Chemometr Intell Lab Syst 42:3-40

Mallatt J, 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42:630-648

Marian MP, Arul V, Pandian TJ, 1983. Acute and chronic effects of carbaryl on survival, growth, and metamorphosis in the bullfrog (*Rana tigrina*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 12:271-275

Materna EJ, Rabeni CF, Lapoint TW, 1995. Effects of the synthetic pyrethroid insecticide, esfenvalerate, on larval leopard frogs (*Rana spp*). Environ. Toxicol. Chem. 14:613-622

Matthiessen P, Roberts RJ, 1982. Histopathological changes in the liver and brain of fish exposed to endosulfan insecticide during tsetse fly control operations in Botswana. J Fish Dis 5:153-159

McCallum ML, 2007. Amphibian Decline or Extinction? Current Declines Dwarf Background Extinction Rate. Journal of Herpetology 41:483-491

McIndoe R, Smith DG, 1984. Functional anatomy of the internal gills of the tadpole of *Litoria ewingii* (Anura, Hylidae). Zoomorphology 104:280-291

McKinney JD, Chae K, Oatley JS, Blake CCF, 1985. Molecular interactions of toxic chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans with thyroxine binding prealbumin. J. Med. Chem. 28:375-381

Miglioranza KS, Aizpun de Moreno JE, Moreno VJ, 2004. Land based sources of marine pollution: organochlorine pesticide in stream system. Environ Sci Pollut Res Int 11:227-32.

Miles JRW, Moy P, 1979. Degradation of endosulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23:13-19

Mondou PM, Kaltenbach JC, 1979. Thyroxine concentrations in blood serum and pericardial fluid of metamorphosing tadpoles and of adult frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 39:343-349

Murty AS, 1986. Pesticides in the environment. In: *Toxicity of Pesticides to Fish*, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-36

Naqvi SM, Vaishnavi C, 1993. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide in non-target animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 105:347-361

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

Nebeker AV, McCrady JK, Mshar R, McAuliffe CK, 1983. Relative sensitivity for *Daphnia magna*, rainbow trout and fathead minnows to Endosulfan. *Environ. Toxicol. Chem.* 2 :69-72

Ntow J, 2001. Organochlorine Pesticides in water, sediments, crops and human fluids in a farming community in Ghana. *Arc. Env. Contam. Toxicol.* 40:557-563

Oktay C, Gokten E, Bozdmir N, Soyuncus, 2003. Unintentional toxicity due to endosulfan: a case report of two patients and characteristics of endosulfan toxicity. *Vet. Hum. Toxicol.* 45:318-20

Ovaska K, Davis TM, Flamarique IN, 1997. Hatching success and larval survival of the frogs *Hyla regilla* and *Rana aurora* under ambient and artificially enhanced solar ultraviolet radiation. *Can. J. Zool.*, 75:1081-1088

Pandey N, Gundevia F, Prem AS, Ray PK, 1990. Studies on the genotoxicity of endosulfan, an organochlorine insecticide, in mammalian germ cells. *Mutat. Res.* 242:1-7

Pandey S, Ahmad I, Pervez S, Bin-Hafeez B, Hague R, Riasuddin S, 2001. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper pretreatment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41:345-352

Park D, Hempleman SC, Propper CR, 2001. Endosulfan exposure disrupts pheromonal systems in the Red-Spotted Newt: A mechanism for subtle effects of environmental chemicals. *Environ. Health Perspectives* 109, 669-673

Park D, Propper CR, 2002. Endosulfan Affects Pheromonal Detection and Glands in the Male Red-Spotted Newt, *Notophthalmus viridescens*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69:609-616

Paul V, Balasubramaniam E, 1997. Effects of single and repeated administration of endosulfan on behaviour and its interaction with centrally acting drugs in experimental animals: A mini review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3:151-157

Pavignano I, Giacomà C, 1990. Una valutazione ecologica dello stato di conservazione delle zone umide minori della pianura Piemontese. Atti VI Conv. naz. Ass. "A. Chigi", Torino (1989), Mus. reg. Sci. Nat. Torino 91-104

Pechmann JHK, Scott DF, Semlitsch RD, Caldwell JP, Vitt LJ, Gibbons W, 1991. Declining Amphibian Populations: the problem of separating human impacts from natural fluctuations. *Science* 245:892-895

Perry SF, Laurent P, 1993. Environmental effects on fish gill structure and function, p.231-264. In: Rankin J.C. & Jensen F.B. (ed.), *Fish Ecophysiology*. Chapman and Hall, London

Pounds JA, Crump ML, 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology*, 8:72-85

Pounds JA, Fogden PC, Campbell JH, 1999. Biological responses to climate change on a tropical mountain. *Nature*, 398:611-615

Pounds JA, 2001. Climate and amphibian declines. *Nature* 410:639-640

Pozo K, Harner T, Wania F, Muir D, Jones K, Barrie L, 2006. Toward a global Network for Persistent Organic Pollutants in Air: Results from the GAPS Study. *Environ. Sci. Technol.* 40:4867-4873

Rajendran N, Venugopalan VK, 1991. Bioconcentration of Endosulfan in different body tissues of estuarine organisms under sublethal exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46:151-158

Relyea RA, Mills N, 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:2491-2496

Relyea RA, 2004. Synergistic impacts of malathion and predatory stress on six species of North American tadpoles. Environmental Toxicology and Chemistry 23:1080-1084

Relyea RA, Schoeppner NM, Hoverman JT, 2005. pesticides and amphibians: the importance of community context. Ecological Applications 15:1125-1134

Rist L, 1994. Feeding time, food consumption, and growth efficiency of *Rana lessonae* and *Rana esculenta* tadpoles. M. Sc. thesis, University of Zurich, Zurich

Rohr JR, Elskus AA, Shepherd BS, Crowley PH, McCarthy TM, Niedzwiecki JH, Sager T, Sih A, Palmer BD, 2003a. Lethal and sublethal effects of atrazine, carbaryl, endosulfan, and octylphenol on the streamside salamander, *Ambystoma barbouri*. Environ Toxicol Chem 22:2385-2392

Romeo F, Quijano MD, 2000. Risk assessment in a third-world reality: an endosulfan case history, Int. J. Occup. Environ. Health 6:312-317

Rosenshield ML, Jofre' MB, Karasov WH, 1999. Effects of polychlorinated biphenyl 126 on green frog (*Rana clamitans*) and leopard frog (*Rana pipiens*) hatching success, development, and metamorphosis. Environmental Toxicology and Chemistry 18:2478-2486

Roy PK, Munshi JSD, 1991. Malathion induced structural and morphometric changes of gills of a fresh water major carp, *Cirrhinus mrigala*. J. Environ. Biol. 12:79-87

Rozman K, Rozman T, Greim H, 1984. Effects of thyroidectomy and thyroxine on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 72: 372-376

Russell RW, Hecnar SJ, Haffner GD, 1995. Organochlorine pesticide residues in Southern Ontario spring peepers. Environmental Toxicology and Chemistry, 14: 815-817

Saiyed H, Dewan A, Bhatnagar V, Shenoy U, Shenoy R, Rajmohan H, Patel K, Kashyap R, Kulkarni P, Rajan B, Lakkad B, 2003. Effect of Endosulfan on Male Reproductive Development. Environ. Health Perspect. 111:1958-1962

Sang S, Petrovic S, 1999. Endosulfan- A Review of its Toxicity and its Effects on the Endocrine System WWF (World Wild Life Fund – Canada)

Saiyed H, Dewan A, Bhatnagar V, Shenoy U, Shenoy R, Rajmohan H, Patel K, Kashyap R, Kulkarni P, Rajan B, Lakkad B, 2003. Effect of endosulfan on male reproductive development. Environ Health Perspect 111:1958-1962

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

Schimmel SC, Patrick JM, Wilson AJ, 1977. Acute toxicity to and bioconcentration of endosulfan by estuarine animals. In: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, edited by F L Mayer and J L Hamelink. ASTM Special Technical Publication, STP 634, 241-252

Schmitz G, Muller G, 1991. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. J. Lipid Res. 32:1539-1570

Scillitani G, Rizzi V, Gioisa M, 1996. Atlante degli Anfibi e dei Rettili della provincia di Foggia. Monografie del Museo Provinciale di Storia Naturale. V. 1 Gitto Editore. pp.120

Scoccianti C, 2001. Amphibia: aspetti di ecologia della conservazione. Editore Guido Persichino Grafica, Firenze

Semlitsch RD, Scott DE, Pechmann JHK, 1988. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. Ecology 69:184-192

Semlitsch RD, 1993. Adaptive genetic variation in growth and development of tadpoles of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. Evolution 47:1805-1818

Semlitsch RD, Foglia M, Mueller A, 1995. Short-term exposure to triphenyltin affects the swimming and feeding behaviour of tadpoles. Environ Toxicol Chem 14:1419-1423

Simonich SL, Hites RA, 1995. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science* 269:1851-54

Simonich SL, Hites RA, 1997. Relationship between socio-economic indicators and concentrations of Organochlorine Pesticides in Tree Bark. *Environ. Sci. Technol.* 31:999-1003

Singh NN, Srivastava AK, 1981. Effects of endosulfan on fish carbohydrate metabolism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 5:412-417

Sinha N, Lal B, Singh TP, 1991. Effect of endosulfan on thyroid physiology in the freshwater catfish *Clarias batrachus*. *Toxicology* 67:187-197

Sinha N, Narayan R, Saxena DK, 1997. Effect of endosulfan on the testis of growing rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 58:79-86

Smith DC, 1987. Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date of metamorphosis. *Ecology* 68:344-50

Smith AG, 1991. Chlorinated Hydrocarbon Insecticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*. Hayes, W. J., Jr. and Laws, E. R., Jr., Eds. Academic Press Inc., New York, NY, 6-3

Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C, 1994. The Pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ. Health Perspectives* 102:380-383

Sparling DW, Linder G, Bishop CA, 2000. Ecotoxicology of amphibians and reptiles. Pensacola, Florida, SETAC Technical Publications Series

Sparling DW, Fellers FM, McDonnell L, 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, Usa. *Environ. Toxic. Chem.* 7:1591-1595

Stallard RF, 2001. Possible environmental factors underlying amphibian decline in Easter Puerto Rico: analysis of U.S. government data archives. *Conservation Biology*, 15: 943-953

Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues AS, Fischman DL, Waller RW, 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306:1783-1786

Sunderam RIM, Cheng DMH, Thompson GB, 1992. Toxicity of endosulfan to native and introduced fish in Australia. *Environ. Toxicol. Chem.* 11:1469-1476

Swartz CP, Donnelly KC, IslamZadeh A, Rowe GT, Rogers WJ, Paletnikov GM, Mekhtiev AA, Kasimov R, McDonald TJ, Wickcliffe JK, Presley BJ, Bickham JW, 2003. Chemical Contaminants and their Effects in fish and wildlife from the industrial zone of Sumgayit, Republic of Azerbaijan, *Ecotoxicology* 12:509-21

Toledo MCF, Jonsson CM, 1992. Bioaccumulation and elimination of endosulfan in zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Pest. Sci.* 36:207-211

Tripepi S, Perrotta E, Brunelli E, 1999. Aspetti morfologici ed ultrstrutturali dell'apparato respiratorio branchiale degli Anfibi. Riv. Idrobiol. 38:9-17

Tripepi S, Serroni P, Brunelli E, 1999. Guida atlante degli Anfibi della provincia di Cosenza. Pellegrini Editore, Cosenza pp119

Uchiyama M, Yoshizawa H, 1992. Salinity tolerance and structure of external and internal gills in tadpoles of the crab-eating frog, *Rana cancrivora*. Cell Tissue Res. 267:35-44

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regional Based Assessment of Persistent Toxic Substances-Mediterranean-Regional Report – Chemicals- Global Environment Facility

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regional Based Assessment of Persistent Toxic Substances- North America-Regional Report – Chemicals- Global Environment Facility

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regional Based Assessment of Persistent Toxic Substances- Central America and the Caribbean-Regional Report –Chemicals- Global Environment Facility

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regional Based Assessment of Persistent Toxic Substances- Europe- Regional Report –Chemicals-Global Environment Facility

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regional Based Assessment of Persistent Toxic Substances–Indian Ocean Regional Report – Chemicals– Global Environment Facility (UNEP – GEF)

UNEP (United Nations Environmental Programme) 2002. Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances Arctic Regional Report Chemicals. Regional report, December 2002 <http://www.chem.unep.ch/pts/regreports/North%20America%20full%20report.pdf>

US Environmental Protection Agency (EPA), 1999. LC₅₀ Software Program, Version 1.00. Center for Exposure Assessment Modeling (CEAM) Distribution Center

US Environmental Protection Agency (EPA) 2001. Overview of endosulfan: Risk assessment, July 26, 2001. United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances

US Environmental Protection Agency (EPA) 2002. Reregistration Eligibility Decision for Endosulfan. Case No. 0014. office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC

Usha Rani MV, Reddy OS, Reddy PP, 1980. Mutagenicity studies involving aldrin, endosulfan, dimethoate, phosphamidon, carbaryl and ceresin. Bull. Environ. Cotam. Toxicol. 25:277-282

Usha Rani MV, Reddy PP, 1986. Cytogenetic effects of endosulfan in mice. IRCS J. Med. Sci. 14:1125-1126

van de Plassche EJ, 1994. Towards integrated environmental quality objectives for several compounds with a potential for secondary poisoning. – National Institute of Public Health and environmental Protection. (RIVM), Bilthoven, The Netherlands. Report No. 679101 012

Vardia HK, Rao PS, Durve VS, 1984. Sensitivity of toad larvae to 2,4-D and endosulfan pesticides. *Arch Hydrobiol.* 100:395-400

Velazquez A, Creus A, Xamena N, Marcos R, 1984. Mutagenicity of the insecticide endosulfan in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 136:115-118

Vengateshwarlu K, Suryarao K, Srinivas V, Sivaprakash K, Jagannadharao N R, Mythilai A, 2000. Endosulfan Poisoning: A Clinical Profile. *J. Assoc. Physicians India* 48:323-325

Venturino A, Rosenbaum E, Caballero de Castro A, 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8:167-186

Wake DB, 1991. Declining amphibian populations. *Science* 253:60

Warburg MK, Rosenberg M, 1997. Structure of gill epithelium in *Triturus vittatus* larvae. *Ann. Anat.* 179:57-64

Wassersug RJ, Rosenberg K, 1979. Surface anatomy of branchial food traps of tadpoles: a comparative study. *J. Morphol.* 159:393-426

Weil MR, 1986. Changes in plasma thyroxine levels during and after spontaneous metamorphosis in a natural population of the green frog, *Rana clamitans*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62:8-12

WHO (World Health Organisation) 1984. Endosulfan. Environmental Health Criteria 40. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, Switzerland

Wold S, Albano C, Dunn III WJ, Edlund U, Esbensen K, Geladi P, Hellberg S, Johansson E, Lindberg W, Sjöström M, 1984. Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry. In Kowalski, B. R. (ed.), Reidel Publishing, Dordrecht, pp. 4-96

Wold S, Esbensen K, Geladi P, 1987. Principal component analysis. Chemometr. Intell. Lab. Syst. 2:37-52

Yadav AS, Vashishat RK, Kakar SN, 1982. Testing of endosulfan and fenitrothion for genotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res. 105:403-407

Zaccone G, Fasulo S, Lo Cascio P, Ainis L, Ricca MB, Licata A, 1989. Effects of chronic exposure to endosulfan on complex carbohydrates and enzyme activities in gill and epidermal tissue of the freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Arch. Biol. (Bruxelles) 100:171-185

Zhang ZL, Zhang ZuLin, Huang Jun, Huang J, Yu Gang YG, Hong HS, Hong HuaSheng, 2004. Occurrence of PAHs, PCBs, and organochlorine pesticides in the Tonghui River of Beijing, China. Environ. Pollut. 130:249-61

Grazie...

a tutti e nessun in particolare

a chi mi ha sempre sorriso

a te che mi hai insegnato a dare il meglio.

E ... grazie anche a chi cercando di farmi cadere
mi ha invece dato la forza di rimanere in equilibrio