



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA ANIMALE, PROFILASSI ED IGIENE DEGLI
ALIMENTI

CORSO DI SPECIALIZZAZIONE IN ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI
ORIGINE ANIMALE

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

**"INDAGINE ANATOMO ED ISTO-PATOLOGICA SULLO STATO
SANITARIO DI SPIGOLE (*Dicentrarchus labrax*) PESCATE NEL FIUME
ARNO"**

Relatore

Prof. Paolo Mani

Candidato

Dott. Ranieri Verin

Anno accademico 2011-2012

Indice

1. <u>Introduzione</u>	
1.1 <i>Dicentrarchus labrax</i>	Pag. 2-4
1.2 La pesca sportiva ed il valore gastronomico della spigola	Pag. 4-5
1.3 La pesca sportiva della spigola alla foce del fiume Arno e lungo il suo corso..	Pag. 5-6
1.4 L'istopatologia nei pesci come indicatore dell'esposizione cronica agli inquinanti ambientali e dello stato sanitario	Pag. 6-9
1.5 Note di anatomia funzionale branchiale e valenza esplorativa dello studio delle branchie e del fegato	Pag. 9-15
2. <u>Scopo della tesi</u>	Pag. 16
3. <u>Materiali e metodi</u>	Pag. 16-22
4. <u>Risultati</u>	Pag. 22-26
5. <u>Discussione e conclusioni</u>	Pag. 27-29
6. <u>Bibliografia citata</u>	Pag. 30-31

1 Introduzione

1.1 *Dicentrarchus labrax*

La spigola o branzino (Fig. 1), specie ubiquitaria, euriterma ed eurialina, appartiene all'ordine dei *Perciformes*, al sottordine Percoidei e alla famiglia dei Serranidi (*Moronidae*) che comprende molte specie di climi tropicali, subtropicali e temperati, spesso capaci di penetrare nelle acque salmastre e risalire i corsi fluviali. I Serranidi presentano tre spine anali, palato munito di denti e margine preopercolare quasi sempre dentellato.



Figura 1: la spigola (*Dicentrarchus labrax*)

La spigola è specie predatrice, carnivora, e vive in genere in branchi poco numerosi. La livrea varia secondo l'ambiente, in lagune e fiumi con acque velate appare verdastra, mentre nelle acque salate ed in quelle dolci trasparenti è grigio argentea. In ogni caso presenta sul margine dell'opercolo o una macchia nera o più macchiette concentrate sul margine anteriore. Nella fase giovanile il dorso e i fianchi sono cosparsi di piccole macchie scure. E' una specie gonocorica, i maschi sono sessualmente maturi attorno ai due anni con una lunghezza di 26-30 cm, mentre la femmine mature hanno circa 3 anni e lunghe dai 36-40 cm in poi. La spigola è una specie tipica del bacino del Mediterraneo ed è una delle specie

maggiormente studiate a causa della sua importanza commerciale. Questa specie in natura è molto diffusa in quanto, oltre a popolare le fasce costiere del mare mediterraneo, è presente nel Mar Nero, Marocco e Canarie, ma nell'Atlantico Orientale e nel Mar del Nord (Fig. 2). La diversità di ambienti in cui possiamo rinvenire questa specie ha portato con il proseguire dell'evoluzione alla distinzione di ceppi genetici diversi.

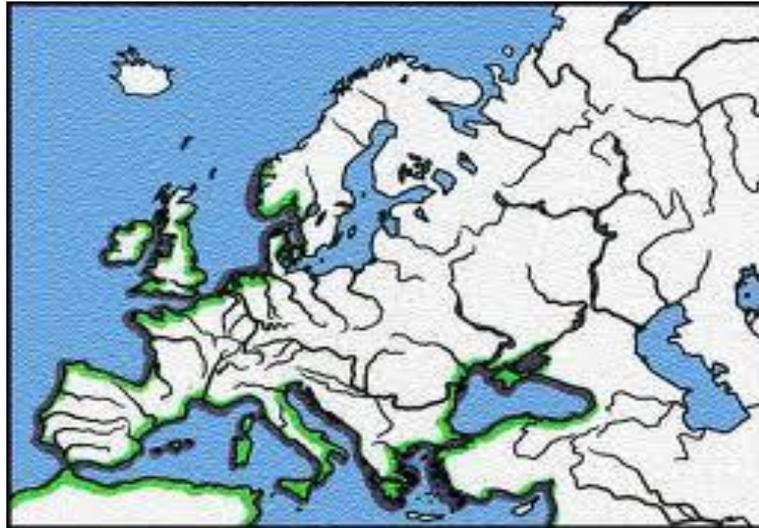


Figura 2: distribuzione geografica di *Dicentrarchus labrax*

La spigola in natura, frequenta soprattutto fondali rocciosi o misti sabbiosi-rocciosi, e non è raro osservarla su praterie di fanerogame marine. Di solito vive in acque costiere, sebbene possa arrivare fino a 100 metri di profondità; tuttavia, in genere, gli adulti si spostano in ambienti diversi in relazione alle necessità alimentari. La spigola fa il suo ingresso nelle foci dei fiumi e ne risale decisamente il corso nei mesi estivi, per poi tornare in mare aperto con l'approssimarsi delle basse temperature invernali. Allo stadio adulto questa specie è piuttosto solitaria ed ha abitudini demersali (ha rapporti frequenti con il fondale, in genere di natura trofica), mentre i soggetti giovani sono gregari per taglia. Questa specie è stata sempre di grande interesse, non solo per la pesca professionale e per le ottime qualità delle sue carni, ma anche per la pesca sportiva. Nel Mediterraneo vivono due specie appartenenti al genere *Dicentrarchus*: *D. labrax* (Linnaeus, 1758) e *D. punctatus* (Bloch, 1792). *D.*

labrax pur avendo un optimum termico compreso tra i 10°C e 25°C, sopporta temperature invernali estremamente rigide e temperature estive elevate; può vivere in acque dolci od a salinità molto bassa e temporaneamente in acque a salinità molto elevata, circa 90%. E' insieme all'orata (*Sparus aurata*, L.), la prima tra le specie pregiate eurialine che è stata riprodotta in condizioni controllate ed allevata in sistemi intensivi. Riveste, infatti, una notevole importanza economica data la sua adattabilità alle condizioni di allevamento, che ne fanno una specie in costante espansione nel settore dell'acquacoltura. In Italia gli impianti attivi sono aumentati da 6 a 40 tra il 1995 ed il 2000, mentre la produzione totale nei Paesi del mediterraneo è aumentata del 23% negli ultimi 10 anni, passando da 40.000 a 48.000 tonnellate dal 1999 al 2000.

1.2 La pesca sportiva ed il valore gastronomico della spigola

La spigola è un pesce di grande interesse per la pesca sportiva. Le tecniche più usate dai pescatori sportivi sono il "surf casting", la pesca a traina dalla barca, la pesca notturna con galleggiante luminoso ed in genere tutte le tecniche con esche artificiali che sfruttano l'istinto predatorio di questo pesce che è considerato a buon diritto "la regina" dai pescatori sportivi di acque salate e salmastre. E' una specie estremamente ambita anche dai pescatori subacquei, nei luoghi dove si può ancora esercitare questa disciplina. La sua cattura risulta meno difficoltosa di altre specie pregiate come l'orata od il sarago per la spiccata curiosità, caratteristica dei predatori, che spesso spinge la spigola a ridurre la distanza dal pescatore subacqueo. La spigola è annoverata tra i pesci più pregiati d'Europa da lunghissimo tempo. Testi dell'antichità e del rinascimento ne ricordano il sapore e la delicatezza delle carni. Attualmente il valore della specie è anche maggiore, visto che i branzini selvatici sono divenuti rari, a causa dell'eccessiva pressione di pesca svolta dai pescatori sia professionisti sia sportivi ed amatoriali. Le carni della spigola, bianche e gustose, considerate di elevato

interesse commerciale, sono vendute fresche o congelate. La spigola è oggetto di molte ricette tipiche, viene cucinata arrosto, “al sale”, bollita ed utilizzata per numerosi piatti particolari, come i tortelli ripieni o i filetti farciti. La forte domanda viene in gran parte soddisfatta dalla produzione in acquacoltura anche se è apprezzabile la differenza tra pesci allevati e selvatici, specialmente se consumati molto freschi.

1.3 La pesca sportiva della spigola alla foce del fiume Arno e lungo il suo corso

Come sopra accennato la spigola è un pesce eurialino, che si adatta notevolmente alla salinità delle acque. Tale caratteristica le permette di entrare nelle foci dei fiumi e di risalirne il corso anche per diversi chilometri. Solitamente le spigole entrano nei fiumi appena le temperature delle acque si fanno più miti e cioè nei mesi che vanno da Aprile fino alla fine dell'estate. Questo comportamento è solitamente una conseguenza dello spostamento delle abituali prede della spigola, i cefali, che a loro volta risalgono i fiumi per la riproduzione e la conseguente deposizione. Nel fiume Arno, in provincia di Pisa, le abitudini anadrome della spigola sono influenzate sia dalla risalita dei cefali sia dall'alta marea, dal mare mosso, e dalle condizioni in cui il fiume porta acqua delle piogge cadute a monte, acque leggermente torbide, che però permettono la visibilità alla spigola che le sfrutta per predare i piccoli pesci. In tali condizioni le spigole riescono ad risalire il fiume Arno fino al centro di Pisa e molto più a monte, fermandosi soltanto nei prossimità del ponte di Caprona (a circa 25 km dalla foce), dove trovano il primo vero ostacolo, costituito da una pescaia, difficoltosa da risalire per questa specie. La pesca sportiva del “ragno”, nome dialettale che nella Provincia di Pisa, viene dato alla spigola, è una realtà quasi storica proprio per l'abbondanza di questa specie che trova le condizioni ottimali per la crescita e per la riproduzione in questa zona. La

provincia di Pisa, ed in particolare il litorale del Parco di Migliarino, San Rossore e Massaciuccoli, compreso tra le foci di due fiumi di media portata (Arno e Serchio), offre infatti l'habitat ideale per la spigola. La pesca sportiva di questo pesce viene infatti praticata tanto in mare quanto all'interno dei due fiumi sopramenzionati ed indipendentemente dal luogo di cattura, gli esemplari spesso vengono trattenuti dai pescatori e consumati.

1.4 L'istopatologia nei pesci come indicatore dell'esposizione cronica agli inquinanti ambientali e dello stato sanitario

L'idea di misurare parametri biologici come indicatori dello stato di salute di un organismo risale alle origini della storia della medicina. Infatti già i medici dell'antica Cina erano in grado di definire la "salute" di un individuo esaminando le urine, le feci e le condizioni generali dell'organismo. Arrivando ai giorni nostri si può affermare che negli ultimi decenni, con il rapido evolversi delle tecnologie molecolari, biochimiche e biopatologiche, i "biomarkes" hanno trovato un'applicazione in tutte le branche della medicina, dalla medicina del lavoro all'oncologia ed ovviamente anche in medicina veterinaria con particolare riferimento all'ispezione degli alimenti di origine animale.

La tossicità di un contaminante su di un organismo, si esprime solitamente a livello biochimico e molecolare (modificazioni delle attività enzimatiche e danni al materiale genomico) e come conseguenza di questo a livelli cellulari e tissutali. Come risposta all'azione di un tossico, l'organismo sviluppa risposte adattative che tendono a riportare il sistema ad uno stato di equilibrio. Quando però il meccanismo omeostatico non è sufficiente a bilanciare l'azione del tossico, l'effetto negativo si manifesta a livello cellulare, di tessuto e di organo. Si può quindi affermare che le diverse risposte, omeostatiche e non, generate da

un organismo nei confronti di un tossico, rappresentano potenziali *markers* utilizzabili in indagini ecotossicologiche (McCarthy e Shugart, 1990; Depledge e Fossi, 1994).

I biomarkers sono modificazioni biochimiche, cellulari e tissutali che indicano la presenza o l'effetto di composti estranei (Henderson et al., 1989; Decaprio, 1997). Il WHO utilizza il termine biomarker per indicare diversi tipi di misure che riflettono l'interazione tra un sistema biologico e un potenziale pericolo chimico, fisico o biologico.

In accordo con il WHO, inoltre, i biomarkers possono essere suddivisi in tre principali categorie:

Biomarkers di esposizione. Servono per la determinazione e la stima di una sostanza esogena o dei suoi metaboliti o del prodotto dell'interazione tra un agente xenobiotico e cellule o molecole target, in un compartimento interno all'organismo. Questi tipi di biomarkers non forniscono, però, nessun'indicazione dei reali effetti tossici sull'organismo.

Biomarkers d'effetto. Comprendono alterazioni biochimiche, fisiologiche o di altro tipo nei tessuti o fluidi corporei di un organismo che possono essere associate ad una malattia o ad uno stato di malessere. Questi tipi di biomarkers sono segnali sia di esposizione sia degli effetti di un composto tossico.

Biomarkers di suscettibilità. Fanno parte di questa classe le capacità innate o acquisite di un organismo di rispondere a cambiamenti nell'esposizione ad uno specifico xenobiotico, includendo fattori genetici e cambiamenti recettoriali che alterano la suscettibilità di un organismo a quella esposizione.

Su questa base, i biomarkers d'esposizione possono essere usati per confermare o per valutare l'esposizione di individui o di popolazioni ad un particolare gruppo di sostanze, stabilendo un legame tra esposizione esterna e dose interna. Quelli di effetto possono essere usati per documentare alterazioni precliniche o effetti dannosi per la salute dovuti all'esposizione esterna o all'assorbimento di sostanze tossiche. Quelli di suscettibilità

aiutano a valutare variazioni nel grado di risposta all'esposizione di un tossico osservato tra differenti individui (Van der Oost et al., 2003).

I biomarkers si possono dividere anche in **specifici** e **generali**, secondo la loro specificità di risposta nei confronti di agenti inquinanti. Fanno parte dei biomarkers specifici quelle risposte molecolari e biochimiche che si realizzano in un organismo a seguito dell'esposizione ad una specifica classe di contaminanti. Si definiscono, invece, biomarkers generali le risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e tissutale che non possono essere direttamente ricondotte ad una sola classe di contaminanti, ma che rappresentano lo stato generale di stress dell'organismo: ad esempio, danni al DNA, disordini immunitari o alterazioni patologiche tissutali di tipo aspecifico (Fossi, 1998). A quest'ultima categoria di biomarkers appartengono proprio le alterazioni istopatologiche che sono state utilizzate in questo lavoro come indicatori o spie di condizioni anomale relative all'esposizione cronica ad inquinanti negli animali analizzati. Come stadio finale del loro effetto tossico, infatti, molti composti inquinanti provocano alterazioni istopatologiche in organi bersaglio, in particolare nel fegato e se prendiamo in considerazione le specie ittiche, nelle branchie. L'impiego di tecniche istopatologiche rappresenta quindi un ottimo strumento, sebbene aspecifico, per valutare la risposta ad effetti cronici indotti da inquinanti (Fossi, 1998).

Le indagini istopatologiche al contrario, così come le alterazioni macroscopiche evidenziabili in corsi di indagine necroscopica, sono un valido strumento per definire lo stato sanitario del soggetto analizzato. Tali alterazioni infatti, spesso risultano indicative di una precisa malattia o comunque di un'alterazione specifica di organo o tessuto riconducibile ad una causa. Con tali tecniche si perviene ad una diagnosi molto precisa della malattia per mezzo dell'analisi delle alterazioni microscopiche subite dal tessuto o grazie alla visione diretta di agenti infettivi o parassitari. I pesci sono spesso esposti ad acque pesantemente inquinate a causa degli scarichi industriali, agricoli ed urbani, specialmente in

aree dove la portata del corso d'acqua è relativamente modesta o comunque insufficiente ad assicurare la diluizione e la depurazione delle sostanze tossiche introdotte. Gli effetti nocivi sono particolarmente evidenti quando i contaminanti sono poco o affatto biodegradabili, hanno un elevato potere biologico, notevole potere di accumulo o si influenzano reciprocamente in un meccanismo sinergico.

1.5 Note di anatomia funzionale branchiale e valenza esplorativa dello studio delle branchie e del fegato

Le branchie rappresentano la più estesa interfaccia fra l'organismo ittico e l'ambiente acquatico circostante. A titolo di esempio, per la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) sono riportati, in letteratura (Manera e Borreca 2004), valori variabili da 1.42 cm² di superficie branchiale per grammo di peso vivo in condizioni fisiologiche (in trote di 2 kg di peso), fino a 3.05 cm²/g (in trote di 0.078 g). I pesci ossei possiedono quattro paia di archi branchiali, ognuno dei quali supporta un'olobranchia a sua volta costituita da due emibranchie (Fig. 3).



Figura 3: spigola, camera branchiale. L'opercolo è stato asportato per permettere la visione d'insieme degli archi branchiali.

Ogni emibranchia risulta formata da numerose lamelle primarie che si dipartono perpendicolarmente rispetto all'arco branchiale da cui originano. Ciascuna lamella primaria funge da base per le lamelle secondarie (sede dell'ematosi) (Fig. 4).

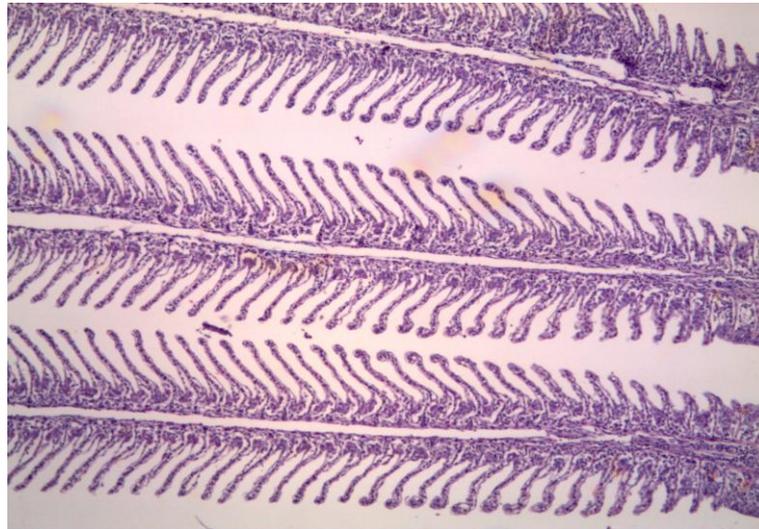


Figura 4: spigola, branchie normali. Si notano le lamelle primarie e le numerose e sottili lamelle secondarie che si dipartono da ambo le parti. Sezione istologica colorata con ematossilina-eosina.

L'epitelio respiratorio è costituito da cellule epiteliali pavimentose sovrastanti l'impalcatura vascolare costituita dalle "pillar cells", cellule endoteliali modificate dotate di spiccate proprietà contrattili. Alla base di ogni lamella secondaria, tra due lamelle contigue, si rinvengono cellule mucose e cellule a cloruri queste ultime deputate al mantenimento dell'equilibrio idro-elettrolitico. Ogni lamella primaria è servita da un'arteria afferente ed un'arteria efferente, con una rete capillare interposta. Esiste, inoltre, un sistema vascolare secondario che connette l'arteria efferente ad un seno venoso centrale e che bypassa il circolo sistemico. Il flusso ematico procede in senso inverso rispetto al flusso dell'acqua che ventila le branchie (meccanismo in controcorrente), ottimizzando la capacità di diffusione dell'ossigeno dall'acqua verso il sangue. Le branchie, oltre a svolgere l'importante funzione respiratoria, sono coinvolte nell'escrezione azotata e di composti di varia natura, nonché nel mantenimento dell'equilibrio idro-elettrolitico ed acidobase. In condizioni

fisiologiche si instaura una sorta di “compromesso” fra funzioni respiratorie ed osmotiche con il minor numero possibile di lamelle branchiali perfuse, al fine di ridurre al minimo il dispendio energetico ed il movimento di acqua e soluti dal sangue all’ambiente acquatico o viceversa. In condizioni parafisiologiche o nettamente patologiche, variando la perfusione lamellare e/o lo spessore dell’interfaccia acqua-sangue possono insorgere squilibri nelle sopraccitate funzioni con detrimento per l’omeostasi.

La plasticità adattativa branchiale

In virtù del ruolo critico svolto dalle branchie nel mantenimento dell’omeostasi corporea ittica, le stesse sono caratterizzate da una notevole plasticità adattativa di tipo morfo-funzionale, particolarmente pronunciata nelle specie euriecie (ad ampio spettro d’adattabilità rispetto al mutare delle condizioni ambientali), limitata nelle specie stenoecie (a ristretto spettro d’adattabilità rispetto al mutare delle condizioni ambientali). Tale prerogativa può essere proficuamente sfruttata nel biomonitoraggio degli ecosistemi acquatici, avendo come unico limite la tendenziale aspecificità mediamente manifestata dalle branchie nel rispondere alle varie noxae patogene ed al variare dei parametri ambientali. Si noti, ad ogni modo, che l’aspecificità, abbinata ad una buona sensibilità nella risposta, rappresenta un ottimo alleato nella messa in atto di un efficace sistema di allerta utile ad una rapida individuazione di situazioni ambientali a rischio. A tal proposito è interessante notare come parte delle modificazioni morfo-funzionali indotte dalle varie noxae patogene siano da ascrivere più che ad un’azione diretta di tali cause, dall’azione indiretta mediata dalla secrezione degli ormoni dello stress indotta dalle stesse noxae. Il rinvenimento di quadri compatibili con uno stress cronico in pesci selvatici induce a sospettare una più generale situazione di “stress ambientale”, degna d’approfondimento con metodiche proprie di altre discipline (ecologia, tossicologia, ecc.). Ciò non toglie che alcune noxae patogene (es.:

xenobiotici) possano indurre una patogenicità mirata, con il coinvolgimento di tipi cellulari particolari (Roberts 2012) .

Cellule a cloruri e monitoraggio ambientale

Probabilmente il tipo cellulare maggiormente coinvolto nella patogenicità “mirata” è rappresentato dalle cellule a cloruri, a causa delle peculiarità morfofunzionali di dette cellule. Le cellule a cloruri sono, infatti, caratterizzate da un numero elevato di mitocondri, da un sistema tubulare laterale (introflessioni della membrana cellulare) e da un’elevata attività ATP-asi, connessa con pompe protoniche (Na^+ e K^+). Tali caratteristiche di efficacia rendono queste cellule particolarmente suscettibili anche a lievi variazioni dei parametri ambientali, ben sopportate e sopportabili da parte di altri tipi cellulari e comportano, frequentemente, la comparsa di patologie “micro-focali” coinvolgenti, unicamente od in preferenza, questo tipo cellulare. Nello specifico, diversi metalli pesanti (ma anche xenobiotici di natura organica), in relazione al pH, sono in grado di interferire sulla attività ATP-asi e sul bilancio ionico. A titolo di esempio, il rame, l’alluminio ed il cromo sono in grado di interferire con il bilancio del sodio e del cloro; cadmio, zinco e manganese del calcio. In riferimento all’interferenza esercitata da tali metalli sul bilancio ionico è da prendere in considerazione, oltre all’interferenza sull’attività ATP-asi associata alle pompe protoniche (inibizione recupero ionico), anche la distruzione o la perdita della “impermeabilizzazione” delle zonule occludenti (aumento perdite ioniche per diffusione). Per quanto riguarda l’influenza del pH e prendendo ad esempio l’alluminio, a pH prossimi alla neutralità prevale un danno legato alla precipitazione di idrossido di alluminio insolubile sulla delicata lamella branchiale (similmente a quanto accade nella tossicità da ferro e da manganese); a pH acidi prevalgono, altresì, i disturbi della regolazione ionica. La precipitazione di metallo sulla delicata interfaccia sangue-acqua interferisce, inevitabilmente, sugli scambi gassosi, innescando una sintomatologia connessa con l’ipossia

ed acidosi conseguenti. Nello studio dei quadri reattivi branchiali è da tenere in gran considerazione il grado di acuità dell'esposizione a xenobiotici e, quindi, del danno indotto. Infatti, nell'immediato prevalgono danni di tipo degenerativo e cumulativo (ad esempio: degenerazione idropico-vacuolare a carico dei vari tipi cellulari, "acute cell swelling", edema lamellare, distacco dell'epitelio respiratorio, ipersecrezione mucosa branchiale, infiltrazione leucocitaria), col prosieguo del tempo, e con alterazioni dei parametri ambientali compatibili con la sopravvivenza dell'organismo ittico, tendono ad innescarsi risposte di tipo morfofunzionale che possono risultare più o meno adattative (ad esempio: iperplasia epitelio interlamellare e conseguente fusione lamelle secondarie; iperplasia cellule mucose, rodlet cell, cellule a cloruri e loro comparsa anche lungo le lamelle secondarie; incremento dell'attività ATPasica branchiale globale) (Figg. 5 e 6).

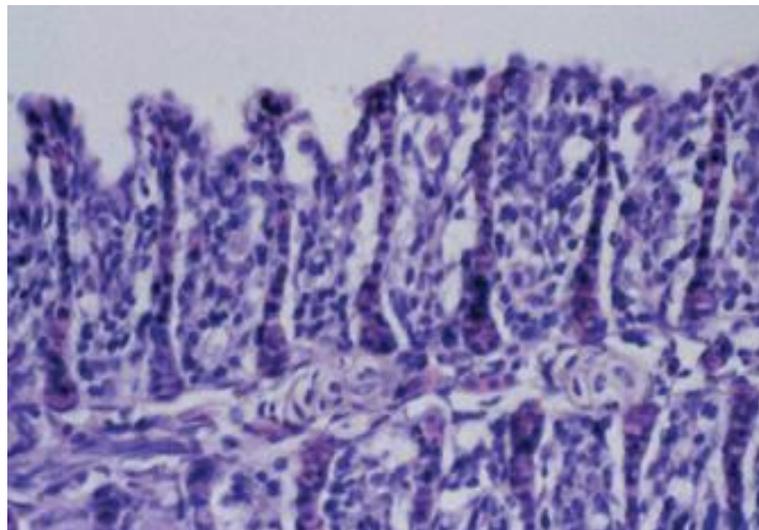


Figura 5: pesce rosso esposto ad acqua acida ed alluminio. Particolare di lamella primaria. Si nota l'imponente proliferazione dell'epitelio interlamellare che ha portato ad una fusione, di fatto, delle lamelle secondarie. Sezione istologica colorata con ematossilina-eosina.

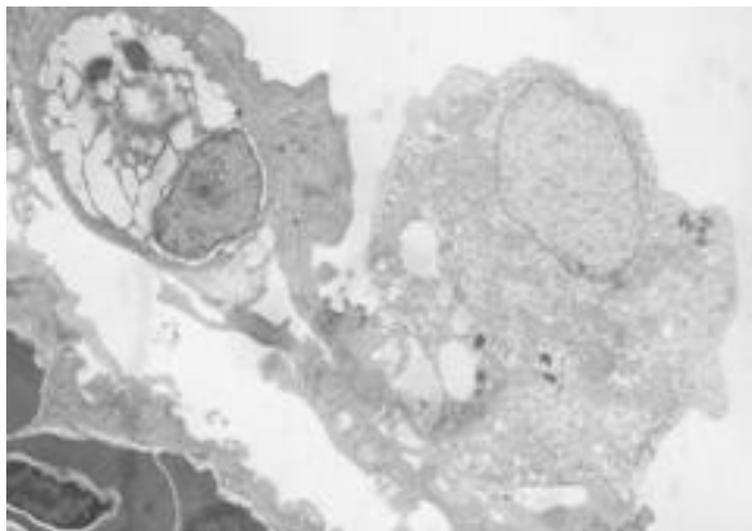


Figura 6: cavedano esposto ad un erbicida. Particolare di lamella secondaria. Si nota l'edema lamellare che porta al sollevamento e distacco dell'epitelio respiratorio dall'impalcatura endoteliale sottostante (epithelial lifting), una rodlet cell (a sinistra, in alto) ed una cellula a cloruri in degenerazione ed in procinto di distaccarsi dall'epitelio lamellare (a destra). Immagine al microscopio elettronico a trasmissione.
Dipartimento di Biologia – Università degli Studi di Ferrara.

Si noti, altresì, che i pesci adattati a dosi crescenti di determinate sostanze xenobiotiche sono in grado di sopravvivere all'esposizione di dosi altrimenti mortali. Quest'aspetto è da tenersi in debita considerazione per non incorrere in erronee e superficiali valutazioni. Sicuramente lo studio delle branchie rappresenta un tassello all'interno di una più generale valutazione, che implica l'integrazione di dati e studi di pertinenza di diverse discipline. L'utilizzazione di un qualsivoglia biomarcatore deve, quindi, essere inserito in un contesto di dati (matrice di dati) da valutarsi cumulativamente. In funzione del fatto che i dati, comunque reperiti, possiedono valore relativo, di confronto, e che, per quanto riguarda le branchie, sono affetti da una certa aspecificità, è necessario reperire quadri di controllo adeguatamente selezionati e compatibili con quelli oggetto di indagine ambientale. A questo punto è fondamentale sottolineare la valenza "esplorativa" di un monitoraggio ambientale condotto tramite lo studio delle branchie, utile a meglio indirizzare ulteriori approfondimenti con tecniche più specifiche ma spesso, checché se ne possa pensare, meno sensibili e sicuramente più costose ed indaginose. Concludendo, si può affermare che le branchie, a

motivo del ruolo di primaria importanza nell'interfacciare il sistema organico ittico con l'ambiente acquatico circostante (finalizzato al mantenimento dell'omeostasi entro i parametri tipici di ogni specie), della reattività e sensibilità manifestate, si candidano al ruolo di versatili biomarcatori nel biomonitoraggio degli ecosistemi acquatici. Inoltre, trattandosi di strutture anatomiche di vertebrati, meglio si prestano ad uno studio da parte della categoria veterinaria, purtroppo ancora "latitante" nel campo della protezione ambientale, non intesa fine a se stessa, bensì finalizzata alla tutela dell'essere umano quale fruitore, diretto ed indiretto, delle risorse che gli ecosistemi naturali sono in grado di offrire, quindi in un contesto proprio della sanità pubblica e dell'ispezione degli alimenti.

Fegato

Anche il fegato, proprio per le sue funzioni di depurazione, per il ruolo primario che gioca nel metabolismo e nell'escrezione di composti xenobiotici e per alcune alterazioni morfologiche che subisce in condizioni di intossicazione cronica, può essere considerato un buon biomarker di esposizione nei pesci (Rocha e Monteiro 1999). Ad esempio l'esposizione cronica a metalli pesanti può aumentare o diminuire l'attività enzimatica epatica e portare ad alterazioni istopatologiche che dipendono dal tipo di metallo pesante, dalla sua concentrazione, dalla specie di pesce, dalla lunghezza dell'esposizione e da altri fattori (Paris-Palacios et al. 2000). Lo studio del fegato e delle sue alterazioni istopatologiche è pertanto un modo accurato e sensibile per dimostrare gli effetti di composti xenobiotici sia in studi sperimentali, sia in campo (Roberts 2012).

2 Scopo della tesi

Non esistendo dati relativi allo stato sanitario di spigole (*Dicentrarchus labrax*) pescate nel fiume Arno, ed essendo la pesca ed il consumo di tali pesci, una realtà ampiamente praticata localmente, nella Provincia di Pisa, lo scopo di questo lavoro è stato quello di indagare lo stato sanitario di una popolazione di spigola selvatica, pescata nel fiume Arno tramite indagini parassitologiche, citologiche ed istopatologiche. Parallelamente all'indagine sanitaria, ci siamo proposti, tramite indagini istopatologiche, su tessuti branchiali ed epatici, la ricerca di alterazioni suggestive di esposizione cronica ad agenti xenobiotici ed utilizzare i dati raccolti in via preliminare per indagare gli ipotetici rischi sanitari per la tutela della salute del consumatore.

3 Materiali e metodi

Nel periodo compreso tra il mese di Marzo 2011 ed il mese di Giugno 2012, utilizzando la tecnica dello spinning e della mosca artificiale ho pescato, nel fiume Arno, 20 esemplari di spigola (Fig. 6) in tre diverse località. La prima località, contrassegnata con la **lettera a** nelle figure 7 e 8, e da cui sono stati prelevati la maggior parte dei soggetti, è la pescaia di Caprona (a circa 25 km dalla foce del fiume). La seconda località, il ponte della Fortezza (contrassegnata con la **lettera b** nelle figure 7 e 8) si trova proprio nel centro di Pisa, a poche centinaia di metri dalla Facoltà di medicina veterinaria, a circa 12 km di distanza dalla foce dell'Arno. La terza località da cui sono stati prelevati i soggetti è "Bocca d'Arno", la foce del fiume (contrassegnata con la **lettera c** nella figure 7 e 8).



Figura 6: due esemplari di spigola (*Dicentrarchus labrax*) pescati ed inseriti nello studio: soggetti 1 (a destra nella foto) e 3 (a sinistra nella foto).

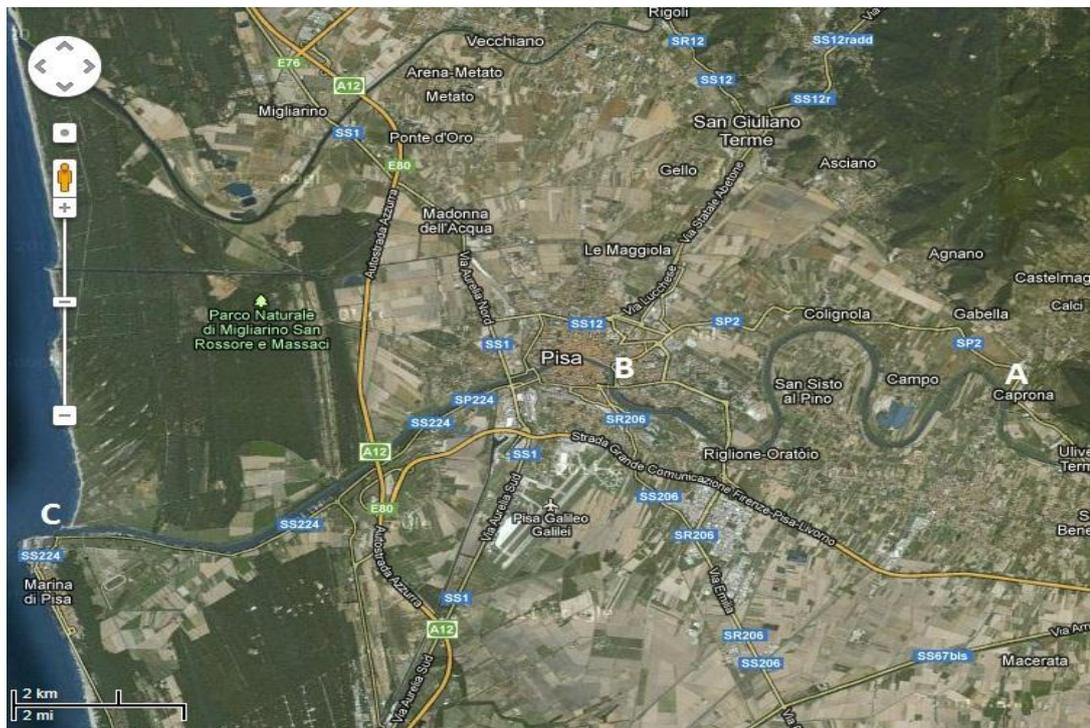


Figura 7: posizione sulla mappa satellitare delle tre località di prelievo. **A**: pescaia di Caprona; **B**: ponte della fortezza, centro di Pisa, **C**: Bocca d'Arno, foce del fiume.

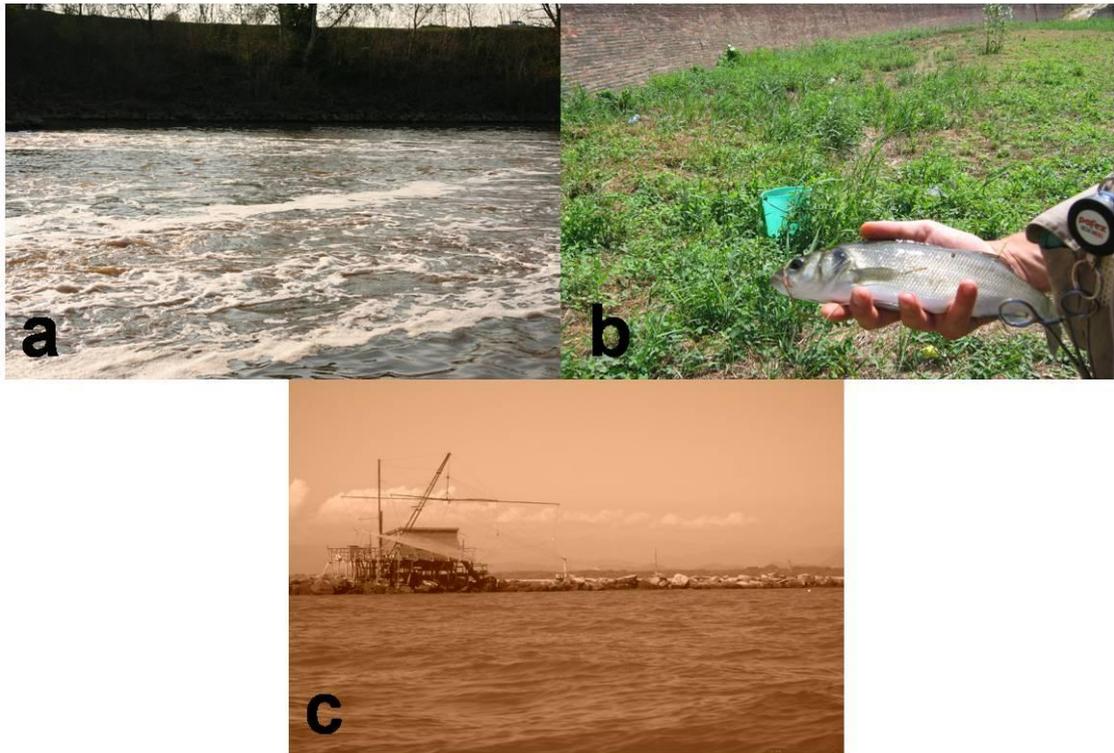


Figura 8: foto delle tre località in cui è sono stati prelevate le spigole inserite nello studio.

I soggetti, appena pescati sono stati sacrificati e sottoposti a misurazione della lunghezza totale, misurata dalla parte più craniale della mandibola alla fine della coda. Sono stati poi pesati e sottoposti prontamente ad esame necroscopico in cui è stato effettuato anche il sessaggio, quando possibile, tramite la caratterizzazione macroscopica e microscopica, con preparati citologici per impronta, delle gonadi, in cui è stato possibile evidenziare clusters di uova a diverso grado di maturazione nei soggetti di sesso femminile (Fig. 9).

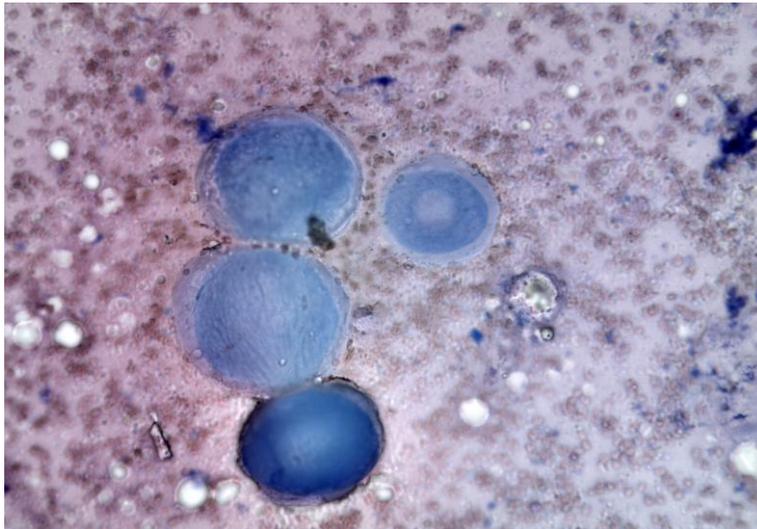


Figura 9: preparato citologico per impronta di gonade femminile di spigola in cui è possibile evidenziare clusters di uova a diversi stadi di maturazione. Colorazione citologica Diff-Quick, ob. 20x.

I dati biometrici insieme alle informazioni sul luogo di pesca dei soggetti introdotti nello studio sono riportati nella tabella 1.

Soggetto N°	Località di pesca	Peso(grammi)	Misura (centimetri)	Sesso
1	Caprona	610	33	F
2	Caprona	1570	54	M
3	Caprona	2220	62	F
4	Pisa	330	27	?
5	Pisa	380	28	?
6	Caprona	420	30	F
7	Pisa	1330	51	M
8	Pisa	1110	48	F
9	Bocca d'Arno	670	40	F
10	Bocca d'Arno	380	26	?
11	Pisa	350	26	?
12	Bocca d'Arno	420	28	M
13	Caprona	860	41	F
14	Pisa	350	26	?
15	Bocca d'Arno	410	28	F
16	Caprona	700	35	F
17	Caprona	780	36	M
18	Caprona	520	32	M
19	Bocca d'Arno	420	29	F
20	Caprona	980	47	F

Tabella1: dati biometrici e località di cattura relativi ai 20 soggetti di spigola (*Dicentrarchus labrax*) analizzati.

Nella prima fase dell'esame necroscopico, ogni esemplare è stato sottoposto ad un'attenta analisi delle superfici esterne e della cavità branchiale per la ricerca di ectoparassiti e mesoparassiti eventualmente presenti. Le branchie, recise nel punto di attacco delle arcate, sono state poste in piastre sterili, contenenti acqua distillata, ed esaminate per mezzo di stereoscopio, per la ricerca di trematodi monogenei e crostacei ectoparassiti. Ogni branchia è stata raschiata tramite una lama di bisturi e lavata (Fig. 10), per rimuoverne eventuali parassiti ed il risultato del lavaggio è stato poi diluito con una soluzione salina fisiologica (0.9% NaCl) ed osservato nuovamente sotto uno stereoscopio.



Figura 10: procedura di raschiamento e lavaggio branchiale per la ricerca di parassiti.

Una porzione delle branchie, non è stata sottoposta a ricerca di parassiti ma direttamente fissata in formalina tamponata al 10% (pH 7,4) per le successive indagini istopatologiche. A questa procedura è seguito un esame necroscopico completo con il prelievo dei principali organi (Fig. 11), porzioni dei quali, sono state prontamente fissati in formalina tamponata al 10% (pH 7,4). I campioni, una volta fissati sono stati ridotti, processati ed inclusi in paraffina. Per ogni organo prelevato sono state tagliate sezioni seriali dello spessore di 4 μ m, successivamente colorate con ematossilina-eosina per le visioni generali e con colorazione PAS per la ricerca di glicoproteine e glucidi tra cui il glicogeno che spesso è presente in abbondanza nel fegato della spigola. La colorazione PAS infatti ha avuto lo scopo principale di permettere la distinzione del glicogeno epatico da accumuli patologici in corso di degenerazioni. L'attenzione si è successivamente focalizzata su uno screening diagnostico istopatologico con lo scopo di monitorare la presenza di malattie infettive e parassitarie e quindi valutare la presenza di eventuali danni istologici suggestivi di esposizione a xenobiotici a livello branchiale ed epatico. Le lesioni di organo evidenziate sono state

espresse con un punteggio da 1(assenza di lesioni) a 3; ad un punteggio maggiore corrispondeva una maggior gravità ovvero una maggior estensione della lesione. Le lesioni prese in considerazione come suggestive di esposizione ad inquinanti sono state la degenerazione vacuolare (DVE)/steatosi epatica (SE) ed alterazioni branchiali quali ipertrofia (I), fusione delle lamelle secondarie (F), degenerazione vacuolare (DV), telangettasia (T), emorragia (E), necrosi (N), iperplasia delle cellule mucipare (IM) ed infiltrazione di cellule infiammatorie (INF) (Paolini et al. 2005)



Figura 11: isolamento e prelievo dei principali organi dopo l'estrazione del pacchetto viscerale.

4 Risultati

I soggetti inseriti nello studio avevano un peso compreso tra i 330 grammi ed i 2200 grammi ($m + \sigma = 740,5\text{gr} \pm 495\text{gr}$) ed una lunghezza compresa tra i 26cm ed i 62cm ($m + \sigma = 36,3\text{cm} \pm 10,8\text{cm}$). Nei soggetti di piccole dimensioni (soggetto 4,5,10,11 e 14), data la completa immaturità delle gonadi, non è stato possibile il sessaggio neppure avvalendosi della citologia per impronta. Le indagini parassitologiche effettuate tramite raschiato e lavaggio

branchiale hanno permesso l'isolamento in 4 soggetti (4, 9, 15 e 19) di un trematode monogeneo identificato come *Diplectanum aequans* (Fig. 12 e 13).



Figura 12: preparato ottenuto per raschiamento branchiale ed osservato allo stereoscopio in cui sono evidenti 2 trematodi monogenei identificati come *Diplectanum aequans* ed adesi ad un filamento branchiale di spigola (foto gentilmente concessa dal Prof. Carlo Pretti, Facoltà di medicina veterinaria, Pisa)



Figura 13: preparato ottenuto tramite lavaggio branchiale ed osservato allo stereoscopio in cui è evidente un adulto di *Diplectanum aequans* (foto gentilmente concessa dal Prof. Carlo Pretti, Facoltà di medicina veterinaria, Pisa)

L'osservazione dei vari organi in corso di esame necroscopico non ha evidenziato alterazioni macroscopiche evidenti tranne in 3 soggetti (1, 6 e 16) in cui era evidente una epatomegalia associata ad una decolorazione dell'organo, suggestiva di degenerazione epatica. Le indagini istopatologiche effettuate sugli organi (esclusi il fegato e le branchie) non hanno mai evidenziato alterazioni, né è stata rilevata la presenza di agenti infettivi o parassitari. L'osservazione delle fegato e delle branchie ha permesso di rilevare una gamma di lesioni di lieve natura con punteggi (score in tabella 2) che non sono mai andati oltre i 2 punti sia nel fegato che nelle branchie. In tabella 2 sono riportati i dati inerenti le lesioni branchiali ed epatiche rilevate nei soggetti analizzati. In particolare, a carico del fegato, è stato possibile confermare una degenerazione vacuolare epatica (DVE), precedentemente diagnosticata macroscopicamente in 3 soggetti, anche tramite l'istopatologia, con uno score di lesioni di 2 punti ciascuno. Non sono state rilevate alterazioni epatiche negli altri soggetti esaminati. Per quanto riguarda le lesioni branchiali, invece, il quadro è risultato più eterogeneo con lesioni di natura diversa ma di lieve entità, spesso coesistenti in un unico soggetto. In particolare sono state rilevate aree di degenerazione vacuolare dell'epitelio branchiale (DV) in 7 soggetti su 20 (35%), fusione delle lamelle branchiali (F) in 8 soggetti su 20 (40%), aree di teleangectasia (T) in 2 soggetti su 20 (10%), iperplasia delle cellule mucipare (IM) in 9 pesci su 20 (45%), infiltrazione di cellule infiammatorie (INF) ovvero necrosi (N) in 3 soggetti su 20 (15%). Cinque soggetti su 20 (25%) presentavano assenza completa di lesioni (AL). I dati relativi ai parassiti isolati ed alle lesioni epatiche e branchiali riscontrate nei soggetti inseriti nello studio sono riportate in tabella 2. Le principali lesioni istopatologiche rilevate sono riportate nella figura 14.

Soggetto N°	Sesso	Peso(grammi)	Località di pesca	Parassiti isolati	Lesioni branchie (score)	Lesioni fegato (score)
1	F	610	Caprona	NI	DV(1,5), F(2), IM (2), INF (2)	DVE (2)
2	M	1570	Caprona	NI	T (2), IM (1,5)	1
3	F	2220	Caprona	NI	T (1,5)	1
4	?	330	Pisa	<i>Diplectanum aequans</i>	F (2), N (1,5)	1
5	?	380	Pisa	NI	DV (1,5), IM (1,5)	1
6	F	420	Caprona	NI	DV (1,5), F(1,5), IM (1,5)	DVE (2)
7	M	1330	Pisa	NI	DV (1,5), IM (1,5)	1
8	F	1110	Pisa	NI	DV (1,5), IM (1,5)	1
9	F	670	Bocca d'Arno	<i>Diplectanum aequans</i>	F (2), N (2)	1
10	?	380	Bocca d'Arno	NI	AL	1
11	?	350	Pisa	NI	AL	1
12	M	420	Bocca d'Arno	NI	AL	1
13	F	860	Caprona	NI	DV (1,5), F(2), INF(2)	1
14	?	350	Pisa	NI	AL	1
15	F	410	Bocca d'Arno	<i>Diplectanum aequans</i>	, F (2), N (1,5)	1
16	F	700	Caprona	NI	DV (1,5), F (1,5), INF(1,5)	DVE(2)
17	M	780	Caprona	NI	AL	1
18	M	520	Caprona	NI	IM (2)	1
19	F	420	Bocca d'Arno	<i>Diplectanum aequans</i>	F (2), IM (2)	1
20	F	980	Caprona	NI	IM (2)	1

Tabella 2: riassunto dei principali isolamenti parassitari effettuati dalle branchie e score delle principali lesioni istopatologiche epatiche e branchiali individuate nei 20 soggetti di spigola (*Dicetrarchus labrax*) inserite nello studio. NI: nessun isolamento; AL: assenza di lesioni; DVE: degenerazione vacuolare epatica; I: ipertrofia, DV: degenerazione vacuolare, F: fusione delle lamelle secondarie, T: telangettasia, IM: iperplasia delle cellule mucipare, INF: infiltrazione di cellule infiammatorie, N: necrosi.

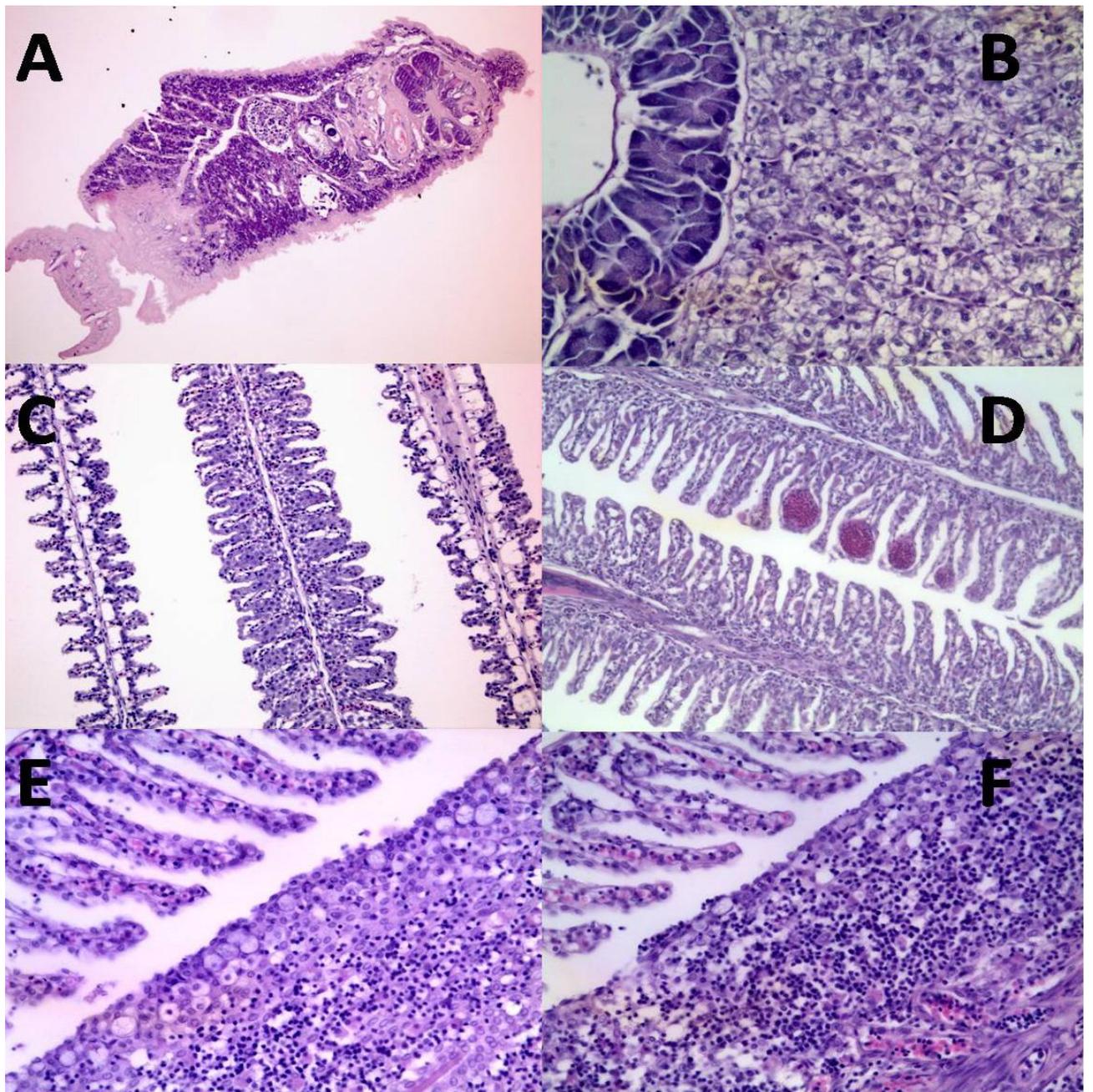


Figura 14: lesioni istologiche rilevate nei soggetti di spigola (*Dicentrarchus labrax*) inseriti nello studio.

A: adulto di *Diplectanum aequans*, colorazione E-E, ob.20x; B: spigola, fegato, degenerazione vacuolare epatica (DVE), colorazione PAS, ob. 40x; C: spigola, lamella branchiale, area focale di fusione delle lamelle secondarie (F), colorazione E-E, ob. 10x; D: spigola, lamella branchiale, teleangiectasia (T) focale dei vasi branchiali, colorazione E-E, ob.20x; E: spigola, lamella branchiale, iperplasia focale delle cellule mucipare (IM), colorazione E-E, ob.40x; F: spigola, lamella branchiale con diffusa infiltrazione di cellule infiammatorie (INF) costituite principalmente da linfociti, colorazione E-E, ob.40x.

5 Discussione e conclusioni

Delle 20 spigole prese in esame 4 (20%) erano positive alla ricerca di parassiti branchiali. L'unica specie isolata è stata *Diplectanum aequans*, trematode monogeneo che spesso viene isolato in corso di parassitosi acute sia in spigole selvatiche che nell'allevamento intensivo di branzini (Coz-Rakovac 2002, Sterund 2002). L'isolamento di questo parassita deve essere inteso come un reperto accidentale, sia per lo scarso numero di trematodi isolati sia per l'assenza di lesioni macroscopiche branchiali a questi riferibili. Questo può essere spiegato con una possibile "autosterilizzazione" delle spigole, che entrando in acque a salinità minore rispetto a quella marina, provocano automaticamente il distacco del parassita che possiede un ciclo biologico adattato ad acque marine. Questa ipotesi è corroborata dal fatto che i 4 isolamenti parassitari sono stati effettuati principalmente su soggetti pescati alla foce del fiume (3/4), dove ancora la salinità risulta alta e solo un soggetto parassitato è stato pescato in acqua dolce, nel centro di Pisa, probabilmente da poco transitato in acque a minor salinità. Nessun soggetto presentava lesioni organiche sia macroscopiche che microscopiche (ad eccezione di quelle branchiali ed epatiche) a testimonianza del buono stato sanitario generale. Riguardo alle, lesioni istopatologiche branchiali ed epatiche, nonostante sempre di lieve entità, queste meritano una discussione a parte. In particolare a livello epatico è stata diagnosticata una degenerazione vacuolare epatica (DVE) in 3 soggetti. La colorazione PAS, effettuata sul fegato, ha permesso di confermare tale diagnosi escludendo la presenza di accumuli intraepatocitari di glicogeno. Occorre infatti sottolineare il fatto che, contrariamente a quanto avviene nei mammiferi, nei pesci in condizioni di digiuno, vengono utilizzate prima di tutto le riserve lipidiche del fegato, mentre le riserve di glicogeno vengono attaccate solo più tardi. Questo tipo di metabolismo porta ad un accumulo frequente di glicogeno nel fegato che morfologicamente è sovrapponibile, nell'osservazione al microscopio con la colorazione

ematossilina-eosina, alle degenerazioni con accumulo di proteine o acqua. Tali lesioni degenerative epatiche possono avere molteplici cause tra cui anche l'esposizione cronica a xenobiotici (Roberts 2012). Tale ipotesi non può essere scartata ed anzi potrebbe essere corroborata dal fatto che i 3 soggetti che presentavano la lesione sono stati tutti pescati nella zona A (Caprona), a testimonianza di una maggior permanenza di questi all'interno del fiume e di un potenziale maggior tempo di esposizione a contaminanti. Aree focali di necrosi sono state rilevate esclusivamente nei 3 soggetti in cui sono stati isolati i parassiti branchiali e con tutta probabilità tali lesioni sono da riferirsi all'azione meccanica dei parassiti che normalmente aderiscono tramite un organo armato di uncini (haptor) proprio alle lamelle branchiali e svolgono la loro azione sottrattiva. Aspetti di degenerazione vacuolare dell'epitelio branchiale (DV), teleangectasia (T) ed iperplasia delle cellule mucipare branchiali (IM) sono stati identificati in 7, 2 e 9 soggetti rispettivamente. Tali alterazioni, di lieve entità in ogni soggetto, non hanno mostrato una correlazione ovvia né con i diversi parametri biometrici dei pesci né con la località di cattura anche se un'accurata analisi statistica multivariata non è stata effettuata in questo studio. In particolare le lesioni teleangectasiche (T) potrebbero essere correlate a fenomeni agonici dovuti alla non perfetta modalità in cui i due soggetti sono stati sacrificati, piuttosto che all'azione di xenobiotici (Roberts 2012). Tale affermazione non si può effettuare riguardo alle degenerazioni vacuolari dell'epitelio branchiale (DV) ed all'iperplasia delle cellule mucipare (IM) che invece potrebbero essere legate a condizioni di irritazione branchiale di natura esogena (Paolini 2005). L'infiltrazione (INF) di cellule infiammatorie a livello delle branchie (rilevata esclusivamente in 3 soggetti pescati a Caprona) e la fusione (F) delle lamelle secondarie (rilevata in 8 soggetti), sono invece altamente suggestive di un reale danno branchiale ma purtroppo non specifiche riguardo alla noxa. Sono numerose le ipotesi eziopatologiche che vanno dalle parassitosi pregresse, alle lesioni protozoarie a quelle virali o batteriche (Roberts

2012) ma che, in assenza di specifici agenti infettivi o parassitari, risultano meno probabili rispetto ad un'azione lesiva da parte di composti xenobiotici.

In conclusione, il presente studio, sebbene basato su tecniche qualitative e con i limiti che queste possono avere, risulta il primo ad indagare localmente una realtà di interesse per il consumatore proprio per il frequente consumo che viene fatto di spigole pescate nel fiume Arno. La tecnica istologica è risultata utile nell'evidenziazione delle lesioni branchiali ed epatiche sebbene aspecifica riguardo alle noxae patogene e quindi di estrema utilità per uno screening iniziale sulla qualità del pescato e per la possibilità di utilizzo dei tessuti branchiali ed epatico quali biomarkers per la qualità sia del pesce sia delle acque.

Senza dubbio le presenti indagini dovranno essere confermate tramite tecniche quantitative (analisi tossicologiche, microbiologiche e chimiche sull'acqua) per la ricerca di eventuali xenobiotici presenti in questa specie pescata nel fiume Arno o nell'ambiente. La spigola infatti, in quanto specie predatrice e quindi biomagnificatore, si presta per monitorare la situazione ambientale nel tempo e parallelamente ad altre specie stanziali nel fiume, che però difficilmente vengono consumate, può fungere da bioindicatore in future ricerche.

Senza dubbio lo stato sanitario degli animali inseriti in questo studio è risultato ottimo, come confermato dall'assenza di lesioni macroscopiche e microscopiche. Proprio per questo motivo, considerata l'assenza di lesioni riferibili a malattie infettive e la modesta presenza di parassiti a livello esclusivamente branchiale, negli esemplari prelevati, è probabile che le lesioni degenerative ed infiammatorie rilevate, sebbene di lieve entità, siano con buona probabilità causate da un moderato stress ambientale che merita un approfondimento mirato per la salute del consumatore.

6 Bibliografia

- Coz-Rakovac R. , Strunjak-Perovic I. , Topic Popovic N. , Hacmanjek, M. , Teskeredzic E.2002.** Health status of wild and cultured sea bass in the northern Adriatic Sea. *Vet. Med. Czech*, 47, : 222–226
- Decaprio A.P. 1997.** Biomarkers: coming of age for environmental health and risk assessment. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1837-1848.
- Depledge M. e Fossi M.C. 1994.** The role of biomarker in environmental assessment: invertebrates. *Ecotoxicology* 3, 173-179.
- Fossi M.C. 1998.** Biomarker: strumenti diagnostici e prognostici di salute ambientale. In: *Ecotossicologia*. Vighi M., Bacci E. (Eds.), *UTET*, Torino, Italia
- Henderson R.F., Bechtold W.E., Bond J.A., Sun J.D. 1989.** The use of biological markers in toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.* 20, 65-82.
- Manera M. E Borreca C.2004.** Lo studio delle branchie nel biomonitoraggio ambientale. *Il progresso veterinario*, 7:253-255.
- McCarthy F. e Shugart L.R. 1990.** Biomarkers of environmental contamination. McCarthy J.F., Shugart L.R. (Eds.), *Lewis Publishers*, Boca Raton, FL, USA
- Rocha E. e Monteiro R.A.F. 1999.** Histology and cytology of fish liver: A review. In: Saksena D.N. (ed.) *Ichthyology: Recent research advances. Science Publishers*, Enfield, New Hampshire.
- Paolini A. , Berti M. , D'Angelo A. , Giansante C. 2005.** Uso degli indicatori istopatologici in cavedano (*Leuciscus cephalus*) e trota (*Salmo trutta fario*) nel monitoraggio di un ecosistema fluviale. *Veterinaria Italiana*, 41, 3 : 177- 187.
- Paris-Palacios S., Biagianti-Risbourg S. , Vernet G. 2000.** Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbation of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulphate. *Aquat. Toxicol.* 50:109-124.

Roberts R. J. 2012. Fish pathology (fourth edition). *Wiley-Blackwell*, West Sussex, UK.

Sterund E. 2009. Parasites of wild sea bass *Dicentrarchus labrax* from Norway. *Dis. Aquat. Org.* 48:209-212

Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharm.* 13, 57-149.