



BENESSERE E PREVENZIONE PRIMARIA

# Le anomalie dell'apparato riproduttivo dei pesci monitorano lo stato delle acque superficiali

RICCARDO CAPRIOLI, CARLA GIANANTE, NICOLA FERRI

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"*

Il concetto di benessere animale e la relativa legislazione si riferiscono agli animali da allevamento o utilizzati a fini di sperimentazione scientifica, agli animali da compagnia e a quelli mantenuti nei giardini zoologici o nei circhi. Anche il benessere degli animali selvatici può tuttavia essere influenzato negativamente dall'impatto delle attività umane sul loro ambiente di vita. In particolare, lo stato di benessere delle popolazioni ittiche naturali può essere compromesso dal degrado degli ambienti acquatici, dovuto all'inquinamento provocato dalle emissioni industriali e civili. Poiché è possibile osservare una relazione diretta tra l'entità degli effetti negativi sul benessere dei pesci e il livello di degrado dell'ambiente in cui vivono, questi animali sono stati utilizzati in maniera crescente quali organismi sentinella per il monitoraggio dello stato di salute dei corpi idrici. Questo articolo ha lo scopo di illustrare come la valutazione dello stato di benessere delle popolazioni ittiche naturali, in particolare mediante la ricerca di anomalie nei loro tessuti gonadici, possa essere utilizzato come bioindicatore dello stato di salute degli ecosistemi acquatici.

## Inquinamento delle acque superficiali e controllo della qualità ambientale

Le attività antropiche che possono provocare alterazioni nelle comunità biotiche, inclusi i pesci, dei bacini fluviali e delle acque marine costiere includono l'inquinamento prodotto da scarichi industriali e domestici e dalle attività agricole, la riduzione degli habitat dovuta alla costruzione di dighe e alla canalizzazione dei corpi fluviali, l'introduzione di specie alloctone [23]. Nell'ultimo secolo, centinaia di inquinanti organici, come il bisfenolo, i pesticidi organici e gli idrocarburi aromatici policiclici, e migliaia di sostanze chimiche sono stati prodotti e rilasciati nell'ambiente. A partire dagli anni '60 l'umanità ha cominciato a prendere coscienza degli effetti

negativi che tali sostanze possono avere sugli ecosistemi acquatici e terrestri, interferendo con le funzioni vitali degli organismi viventi e con la loro capacità di vivere in armonia con l'ambiente [1] e rappresentando una minaccia anche per la salute dell'uomo [24].

L'impatto delle attività antropiche sulla qualità ambientale dei sistemi idrici può essere valutato con diversi metodi di studio, utilizzando sia descrittori "abiotici" (fisici, chimici e sedimentologici) che "biotici" (microbiologici, eco-tossicologici o basati su altri descrittori biologici).

Negli ultimi anni, l'utilizzo di sistemi di monitoraggio basati sull'uso di indicatori biologici ha affiancato in misura crescente la classica rilevazione dei dati chimico-fisici. Lo studio delle comunità biotiche, infatti, può consentire una valutazione più diretta degli effetti delle attività umane sugli ecosistemi acquatici.

Gli indicatori biologici (tabella 1), possono essere identificati a diversi livelli di organizzazione biologica: biochimico, fisiologico, immunologico, bioenergetico, di popolazione o di comunità. A ogni livello può corrispondere un differente grado di rilevanza ecologica e un diverso tempo di "risposta" agli stress ambientali. In tutti i casi, un indicatore biologico deve presentare reazioni facilmente misurabili alle alterazioni ambientali. In genere, gli indicatori al più basso livello dell'organizzazione biologica (biomarcatori) possono costituire un "sistema di allarme precoce", in quanto i fattori di stress possono venir rilevati in una fase iniziale, prima che possano esercitare i loro effetti ai livelli superiori dell'organizzazione biologica (organismo e comunità).

Il principale vantaggio dell'uso di indicatori biologici nel monitoraggio ambientale si identifica con la possibilità di:

- osservare l'effetto integrato dell'esposizione a miscele complesse di contaminanti con le variazioni di altri parametri ambientali, come temperatura, ossigeno disciolto, disponibilità alimentare [14];

**Tabella 1. Indicatori Biologici: definizioni e caratteristiche principali**

	<b>Biomarcatori</b>	<b>Bioindicatori</b>	<b>Indice biotico</b>
<b>Definizione</b>	Qualsiasi risposta biologica funzionale misurabile a livello di individuo o sub-organismo a seguito di una esposizione ad una alterazione ambientale [1].	Risposte biologiche ai livelli organizzativi superiori; popolazione, comunità ed ecosistema	Elaborazione aggregata integrando le risposte di più biomarcatori/bioindicatori e dei dati dei parametri fisici e chimici
<b>Attività e caratteristiche misurabili</b>	Molecolari Biochimiche Fisiologiche Istologiche Morfologiche Comportamentali	Presenza/assenza di specie Numero di individui presenti Struttura demografica Morfologiche Comportamentali Raggruppamenti funzionali	Indici di diversità Indici di abbondanza Indici morfometrici e biotici
<b>Complessità della strumentazione e delle analisi da svolgere</b>	Medio/Elevata	Medio/bassa	Medio/bassa
<b>Grado di rilevanza rispetto agli stress ambientali</b>	Bassa	Alta	Alta
<b>Tempi di risposta agli stress ambientali</b>	Risposta a breve termine	Risposta a lungo termine	Risposta a lungo termine

- valutare l'esposizione a sostanze tossiche (es. idrocarburi aromatici policiclici [25]), che essendo rapidamente metabolizzate ed eliminate, non possono essere dosate negli organismi acquatici;

- valutare le relazioni causa-effetto tra esposizione ambientale a sostanze tossiche e gli effetti da queste causate.

In molti casi, però, gli indicatori biologici evidenziano la presenza di alterazioni in un sistema ambientale senza poter identificare le cause che le hanno generate. Il loro utilizzo andrebbe perciò affiancato da analisi di descrittori del comparto abiotico (es. analisi chimiche e/o microbiologiche), per consentire associazioni tra cause ed effetti.

### **I pesci come organismi sentinella**

I pesci sono il gruppo dei Vertebrati più rappresentativo negli ecosistemi acquatici e sono particolarmente sensibili alla presenza d'inquinanti nelle acque, con le quali vengono in diretto contatto attraverso le branchie e la superficie corporea. Per questi motivi hanno assunto un ruolo prioritario nelle valutazioni di rischio ambientale dell'inquinamento dei corpi idrici [23, 20].

I pesci possono reagire agli stress ambientali a diversi livelli di organizzazione biologica: dal livello di sub-organismo (alterazioni ormonali) a quello individuale (alterazioni dei tessuti gonadici), fino ai livelli di popolazione (alterazione della capacità riproduttiva, della struttura demografica e della dinamica di popolazione) o di comunità (scomparsa di specie intolleranti) [20, 23, 16, 27]. Ad esempio, effetti

primari al livello del sistema neuro-endocrino possono indurre alterazioni al livello biochimico e fisiologico, a loro volta, responsabili di effetti negativi sul singolo individuo o anche sull'intera popolazione. I disturbi e le modifiche possono compromettere lo sviluppo embrionale e larvale, la crescita individuale, lo sviluppo sessuale e, infine, la riproduzione [20, 18].

La scelta degli organi bersaglio da utilizzare per il monitoraggio è molto importante, perché i primi effetti tossici dell'inquinamento sono osservabili a livello cellulare o tissutale, prima di manifestarsi con cambiamenti significativi nell'organismo o nella popolazione [10]. La tabella 2 riassume le principali tipologie della risposta dei pesci agli stress ambientali ai diversi livelli dell'organizzazione biologica.

### **Le anomalie della biologia riproduttiva dei pesci quali biomarcatori di stress ambientale**

L'analisi dei tessuti gonadici e dello sviluppo sessuale nei pesci ha assunto un ruolo crescente nella valutazione degli effetti dell'inquinamento sugli ecosistemi acquatici e sulla salute umana. Lo sviluppo sessuale dei pesci mostra una grande varietà e plasticità e gli ormoni sessuali steroidei, estrogeni e androgeni, giocano un ruolo importante nella differenziazione sessuale [21]. Questi ormoni vengono secreti dalle gonadi in via di sviluppo e sono necessari per la manifestazione delle caratteristiche sessuali, primarie e secondarie.

**Tabella 2. Principali risposte dei pesci agli stress ambientali a diversi livelli di organizzazione biologica (adattato da [25]).**

<b>Livello organizzazione biologica</b>	<b>Caratteristiche in una fauna ittica "indisturbata"</b>	<b>Caratteristiche in una fauna ittica "disturbata"</b>
Molecolare/ Cellulare	Normali livelli ormonali (corticosteroidi e catecolamine). Normale funzionamento neurotrasmettitori. Normale metabolismo cellulare, lisosomi stabili, integrità genetica.	Incremento degli indicatori di "stress" (corticosteroidi e catecolamine). Danni genetici con effetti sull'assetto cromosomico (aumentata frequenza di micronuclei). Incremento dell'attività di detossificazione.
Individuale	Assenza di anomalie morfologiche: deformità, pinne danneggiate, lesioni cutanee, tumori. Comportamento nella norma. Accrescimento nella norma.	Incremento della frequenza di: anomalie riproduttive, anomalie scheletriche, lesioni cutanee, tumori. Alterazioni del comportamento e dell'accrescimento
Di popolazione	Popolazioni "autosostenute". Adeguate reclutamento larvale. Normale struttura demografica. Distribuzione spaziale prevedibile.	Alterazione del reclutamento larvale. Struttura demografica alterata, con basso numero di giovanili e sub-adulti. Distribuzione spaziale alterata
Di comunità	Elevata diversità, con molti raggruppamenti funzionali presenti (trofici, riproduttivi, tolleranza, ecc.). Interazioni biotiche complesse. Cicli stagionali attesi.	Bassa diversità, con assenza o variazione dei rapporti tra gruppi (es. diminuzione specie invertivore ed intolleranti). Riduzione delle interazioni biotiche. Alterazione dei cicli stagionali

Una categoria molto complessa ed eterogenea di contaminanti ambientali può agire sul sistema endocrino dei pesci, modulando o addirittura mimando l'azione degli ormoni steroidei [15], pregiudicando il corretto sviluppo delle gonadi e causando una varietà di disturbi allo sviluppo, al comportamento, alle caratteristiche sessuali secondarie e alla capacità riproduttiva. Queste sostanze, di origine prevalentemente antropica, sono state definite *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs). L'esposizione sperimentale dei pesci agli EDCs può provocare diminuzione della gametogenesi e delle dimensioni delle gonadi, una minore produzione di uova, una diminuzione del numero di spermatozoi e un aumento dei fenomeni di ermafroditismo. Nelle popolazioni ittiche naturali esposte agli EDCs in ambienti naturali inquinati è stato osservato un ridotto sviluppo delle gonadi, con degenerazione tissutale, una riduzione della fecondità nelle femmine e un aumento di casi di intersesto nei maschi [21].

### Gli EDCs nelle acque superficiali

I composti che alterano il sistema endocrino includono sia sostanze chimiche sintetiche sia composti naturali e possono essere classificati in base ai loro meccanismi d'azione, che possono essere così riassunti:

- induzione di effetti simili a quelli degli ormoni steroidei endogeni;
- azione antagonista rispetto agli ormoni endogeni;
- alterazione della sintesi e del metabolismo degli ormoni endogeni;

- induzione di modifiche nei recettori ormonali;
- interferenza con le *binding proteins* responsabili del trasporto degli ormoni endogeni.

La tabella 3 riassume le caratteristiche dei principali EDCs riscontrabili negli ambienti acquatici soggetti a inquinamento ambientale e i loro effetti sui pesci.

### Biomarcatori basati sull'analisi dell'apparato riproduttivo dei pesci

I biomarcatori basati sull'analisi dell'apparato riproduttivo dei pesci che possono essere utilizzati nei monitoraggi ambientali sono elencati di seguito in una scala crescente di complessità.

#### Indice gonadosomatico (IGS)

L'indice gonadosomatico è il rapporto tra il peso della gonade e il peso totale di un pesce e riflette lo stato di sviluppo e l'attività delle sue gonadi. Le popolazioni ittiche che vivono in ambienti contaminati presentano spesso valori di IGS più bassi rispetto a quelle che vivono in ambienti non contaminati. L'IGS è un parametro semplice ed economico da rilevare, anche se più grezzo rispetto alle informazioni ottenibili con l'esame istologico delle gonadi.

#### Alterazioni morfologiche delle gonadi

Gonadi con morfologia alterata sono state descritte in popolazioni ittiche esposte a inquinamento ambientale. Le alterazioni riscontrabili possono includere asimmetria, aplasia e atrofia e hanno generalmente conseguenze negative sulla funzionalità delle gonadi (foto 1).

<b>Tabella 3. Caratteristiche dei principali EDCs riscontrabili in ambienti acquatici contaminati</b>	
<b>Composto: Natura e Origine</b>	<b>Principale azione sui pesci</b>
<b>Alchilfenoli etossilati (APEs):</b> sostanze tensioattive non-ioniche usate nei detersivi, nelle vernici, nei pesticidi e negli additivi della plastica. Rilasciate nell'ambiente acquatico con gli scarichi degli impianti di depurazione, delle industrie tessili e dalle cartiere.	Fisiologicamente molto attivi, persistono nell'ambiente e sono bioaccumulabili e tossici per gli organismi acquatici. Nei pesci di sesso maschile stimolano la sintesi di vitellogenina.
<b>Bisfenolo A (BPA):</b> usato prevalentemente per la produzione di plastiche e derivati in cui siano necessarie caratteristiche di durezza e resistenza.	Mima l'azione degli estrogeni alterando l'attività dell'apparato endocrino.
<b>Idrocarburi policiclici aromatici (IPA):</b> si trovano prevalentemente nei combustibili fossili, come petrolio e carbone. Sono liberati nell'ambiente attraverso la combustione incompleta, la nautica da diporto, gli scarichi dei rifiuti urbani e le deposizioni atmosferiche.	Altamente lipofili e bioaccumulabili, hanno attività cancerogena. Anche nei pesci sono associati a danni cellulari, mutagenesi, teratogenesi e incremento della permeabilità cellulare. A livello riproduttivo causano riduzione nella gametogenesi, ridotto IGS e diminuita produzione di uova [25].
<b>Diossine:</b> formate e rilasciate nell'ambiente attraverso le attività industriali e le emissioni degli inceneritori.	Sostanze con livelli di tossicità tra i più elevati. Hanno effetti cancerogeni e interferiscono con il normale sviluppo fisico. Tendono ad accumularsi nei grassi.
<b>Bisfenoli policlorurati (PCBs):</b> prodotti di sintesi utilizzati come lubrificanti e liquidi refrigeranti nei trasformatori, nei condensatori ed in altre attrezzature elettriche.	Inducono risposte anti-estrogeniche e probabilmente anti-androgeniche.
<b>Esteri ftalati:</b> prodotti di sintesi utilizzati per migliorare la flessibilità e la modellabilità delle materie plastiche	Hanno effetti analoghi a quelli degli ormoni estrogeni: negli individui di sesso maschile causano femminizzazione e disturbi nello sviluppo dei testicoli.
<b>Pesticidi:</b> classe eterogenea di sostanze tossiche.	Alcuni principi attivi agiscono sul sistema endocrino, interferendo con lo sviluppo sessuale.
<b>Composti organo-tannici (OTC):</b> usati come biocidi nei prodotti per la conservazione del legno e nelle vernici antivegetative per l'industria navale.	Lipofili e bioaccumulabili, interferiscono con la biosintesi degli ormoni steroidei, causando fenomeni di mascolinizzazione nei pesci di sesso femminile.



Foto 1. Gonadi di forma irregolare prelevate da pesci catturati in zone soggette a scarichi civili e industriali.

### Intersessualità

Con il termine “intersesso” si definisce la contemporanea presenza di tessuto testicolare e ovarico nella stessa gonade. [13, 3].

La forma di intersesso più comune si riscontra negli individui di sesso maschile ed è costituita dalla presenza di oociti a vari livelli di sviluppo nel tessuto testicolare (foto 2).

Riscontrato per la prima volta in Ciprinidi esposti a scarichi urbani [15], la presenza di un'elevata prevalenza di intersesso è oggi considerata un indicatore dell'esposizione di una popolazione ittica a EDCs.

La valutazione di questo parametro richiede un esame istologico delle gonadi; sono stati descritti metodi per standardizzare la valutazione dell'intensità del fenomeno [4].

L'IGS e gli esami istologici forniscono informazioni strutturali sullo stato delle gonadi e il loro utilizzo è in grado di identificare gli effetti dell'esposizione a sostanze contaminanti sia a breve sia a lungo termine.

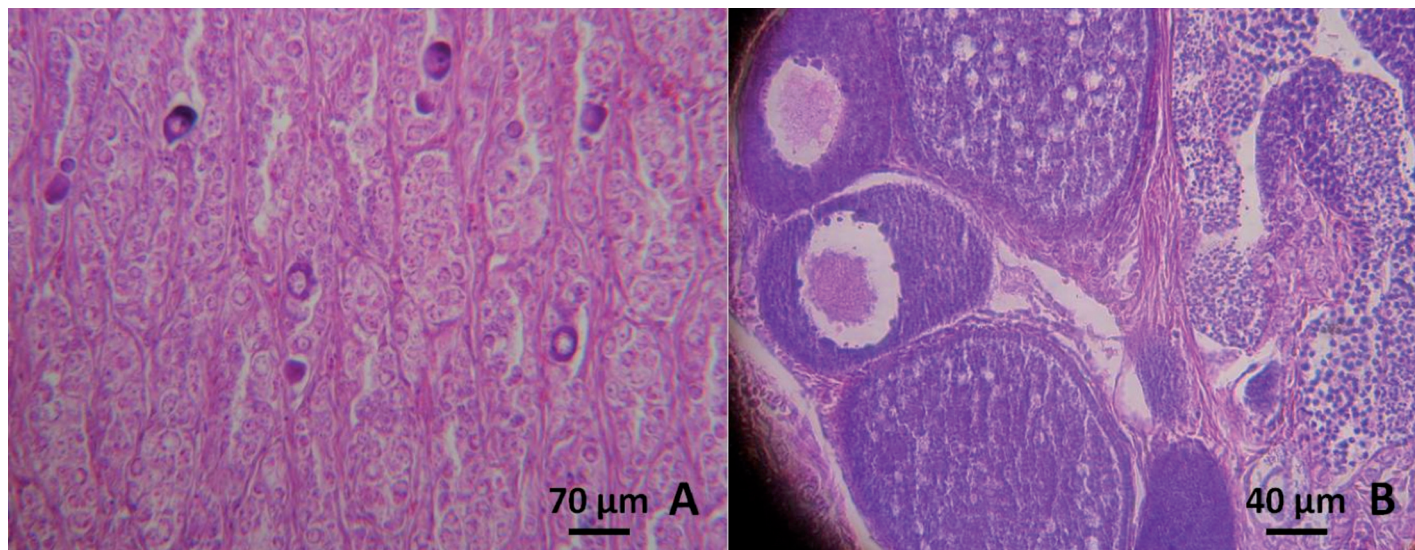


Foto 2. Preparati istologici di gonadi intersessuali. (A) gonade prevalentemente maschile con tubuli seminiferi immaturi e con la presenza di pochi e dispersi oociti a uno stadio di sviluppo primario. (B) gonade con cellule germinali sia maschili sia femminili in avanzato stadio di maturazione.

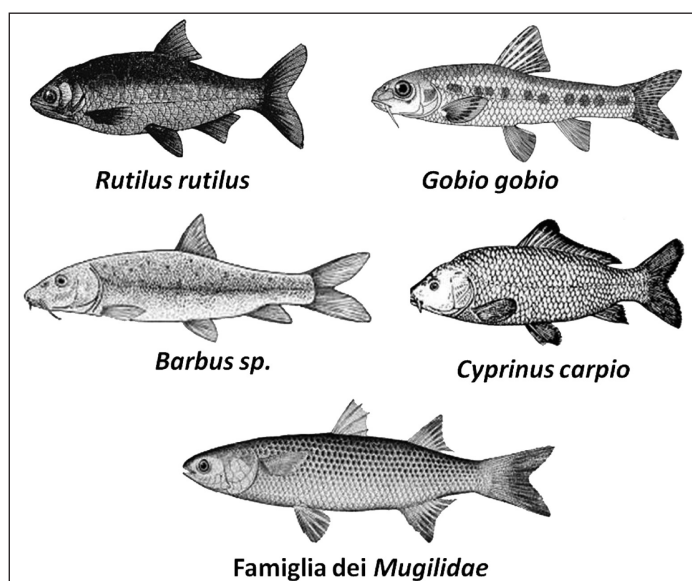


Foto 3. Specie ittiche utilizzate nei monitoraggi ambientali in cui sono state trovate gonadi intersessuali correlate alla presenza di scarichi inquinanti di diversa natura.

## Le specie ittiche sentinella

Alterazioni delle gonadi sono state osservate in diverse specie di pesci di acqua dolce, sia in ambienti lentici che lotici (foto 3). Casi di intersesso sono stati descritti in individui maschi di Ciprinidi (*Rutilus rutilus*) e Gobidi (*Gobio gobio*) nei fiumi della Gran Bretagna, e sono stati attribuiti all'esposizione a scarichi di acque reflue provenienti da depuratori [15, 26]. Intersessi e atrofia testicolare sono stati riscontrati in esemplari di barbo (*Barbus plebejus*) e carpa

(*Cyprinus carpio*) provenienti da ambienti esposti a scarichi industriali e domestici [28, 22].

Alterazioni gonadiche sono state anche osservate in pesci marini eurialini, come i muggini [2, 12]. Questi pesci (famiglia *Mugilidae*) risultano particolarmente adatti all'utilizzo come specie sentinella nei monitoraggi ambientali. Sono infatti specie gonocoriche, e le popolazioni che vivono in ambienti non inquinati non presentano generalmente casi di ermafroditismo o altre anomalie gonadiche [17]. I muggini sono largamente distribuiti in tutti i mari del mondo e, oltre che nelle acque costiere, possono vivere negli estuari e nel basso corso dei fiumi. Tollerano ambienti inquinati e, essendo pesci gregari, possono essere catturati in modo relativamente facile.

Elevate frequenze di intersesso sono state riportate in muggini appartenenti alle specie *Mugil cephalus* [2, 12] e *Chelon labrosus* [19, 5]. I pesci provenivano da ambienti estuarili e costieri caratterizzati da diverse fonti di contaminazione e le alterazioni sono state attribuite alla presenza di ECDs nell'ambiente. Alterazioni gonadiche sono state riportate anche in *Liza ramada*, un mugilide capace di tollerare valori di salinità particolarmente bassi e quindi di colonizzare il basso corso dei fiumi [11]. Questa famiglia di pesci, quindi, si presta bene ad essere utilizzata come indicatore sia per monitoraggi in ambienti costieri sia in zone estuarine o di acqua dolce.

## L'attività dell'IZSAM "G. Caporale"

L'IZSAM, con il suo reparto di Biologia delle Acque Interne, è da tempo impegnato in progetti di salvaguardia delle acque superficiali che prevedono attività di monitoraggio biologico ambientale. Tra questi vanno annoverati:

- studi di campo per il calcolo del Deflusso Minimo Vitale (DMV) dei principali fiumi abruzzesi. Questi studi sono condotti mediante metodi sperimentali chiamati anche incrementali, perché basati sull'accertamento puntuale delle condizioni ambientali ottimali per una specie di riferimento, per la quale siano noti i valori di idoneità ambientale (habitat). Questi valori sono generalmente espressi spesso in termini di profondità, velocità, temperatura dell'acqua e caratteristiche del substrato;
- redazione di carte ittiche e studi del popolamento macrofitico e macrobentonico mediante l'utilizzo dell'Indice Biotico Esteso e dei nuovi metodi multi-habitat proporzionali, praticabili anche in tratti di fiumi non guadabili utilizzando substrati artificiali e di pacchi fogliari;
- utilizzo di Bivalvi e Cladoceri (daphnie) come specie sentinella per il monitoraggio in continuo delle acque di mare e potabili;
- piani di monitoraggio delle popolazioni autoctone di gambero di fiume, sorveglianza sulla peste del gambero [6, 7, 9] e allevamento in un incubatoio sperimentale ai fini del rinforzo delle popolazioni naturali [8].

A partire dal 2012, IZSAM ha iniziato su queste tematiche una cooperazione scientifica con il laboratorio di Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura (LESA) dell'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", che svolge a sua volta attività di ricerca sia su aspetti di implementazione delle conoscenze di base sull'ecologia e la biodiversità del patrimonio faunistico degli ambienti acquatici, sia su studi applicativi di supporto alla gestione delle risorse acquatiche.

Nell'ambito di tale cooperazione sono stati condotti monitoraggi ambientali che utilizzavano i pesci come bioindicatori e le anomalie del loro apparato riproduttore come principale biomarcatore. In particolare, uno studio condotto nel basso corso del fiume Tevere, a valle di un grande depuratore della città di Roma, su muggini della specie *L. ramada*, ha permesso di riscontrare frequenti casi di atresia (fenomeni di degenerazione e riduzione della gonade) e di intersesso, elementi che risultavano invece assenti in esemplari della stessa specie raccolti in un'area esente da inquinamento [11].

Lo stesso approccio, utilizzando Ciprinidi reofili come il barbo e il cavedano come specie sentinella, è previsto nell'ambito delle attività di monitoraggio ambientale elaborato per il controllo del fiume Pescara, nel tratto a monte e a valle di un Sito di Interesse Nazionale (SIN) a valle di Bussi sul Tirino.

## Conclusioni

L'inquinamento delle acque superficiali e, in particolare, la presenza di EDCs, costituiscono un importante motivo di preoccupazione sia per l'integrità degli ecosistemi che per i riflessi sulla salute umana. Questi temi sono stati affrontati anche a livello europeo attraverso la Direttiva quadro sulle acque 2000/60/CE e ripresi e rafforzati con la Di-

rettiva quadro 2008/56/CE sulla strategia per l'ambiente marino (*Marine Strategy*). L'Unione europea pone come obiettivi il raggiungimento di un "buono stato ambientale" (GES, *Good Environmental Status*) dei corpi idrici e delle acque marine entro il 2020. Tra gli strumenti utilizzabili nella valutazione del GES l'utilizzo dei pesci come indicatori viene fortemente raccomandato. L'utilizzo di parametri di benessere delle popolazioni ittiche naturali, e in particolare la valutazione dell'esistenza di anomalie nella loro biologia riproduttiva, può rappresentare un'utile componente nei piani di monitoraggio della salute ambientale degli ecosistemi acquatici.

La varietà e la plasticità della determinazione e della differenziazione sessuale dei pesci determinano infatti un'elevata sensibilità dell'apparato riproduttore di molte specie ittiche all'effetto perturbante dei contaminanti ambientali, in particolare degli EDCs. L'intersessualità in specie altrimenti gonocoriche, in particolare, è oggi considerata come l'indicatore più robusto della presenza di EDCs in un ambiente acquatico.

La valutazione dello stato di benessere delle popolazioni ittiche selvatiche trova applicazioni in campi apparentemente lontani dal suo contesto originale, ma si rivela un utile strumento per diagnosticare una situazione ambientale alterata e a lungo termine potenzialmente molto dannosa per la salute animale e umana. Del resto, oggi la vera sfida non è più solo la cura degli stadi morbosi, ma soprattutto la salvaguardia della salute degli organismi viventi attraverso azioni efficaci di prevenzione primaria quale una maggiore tutela dei loro ambienti di vita, anche al fine di non incorrere in sanzioni comunitarie per non aver raggiunto nei tempi stabiliti gli obiettivi di qualità prefissati.

## Bibliografia

1. Adams SM, Greeley Jr MS, Ryon MG. Evaluating effects of contaminants of fish health at multiple levels of biological organization. Extrapolating from lower to higher levels. *Human and Ecological Risk Assessment*. 2000;6(1):15-27.
2. Aoki J, Nagae M, Takao Y, Hara A, Lee YD, Yeo IK, Lim BS, Park CB, Soyano K. Survey of contamination of estrogenic chemicals in Japanese and Korean coastal waters using the wild grey mullet (*Mugil cephalus*). *Science of the Total Environment*. 2010;408:660-665.
3. Bahamonde PA, Munkittrick KR, Martyniuk CJ. Intersex in teleost fish: are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? *General and Comparative Endocrinology*. 2013;192:25-35.
4. Bateman KS, Stentiford GD, Feist SW. A ranking system for the evaluation of intersex condition in European flounder (*Platichthys flesus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2004;23:2831-2836.

5. Bizarro C, Ros O, Vallejo A, Prieto A, Etxebarria N, Cajaraville MP, Ortiz-Zarragoitia M. Intersex condition and molecular markers of endocrine disruption in relation with burdens of emerging pollutants in thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) from Basque estuaries (South-East Bay of Biscay). *Marine Environmental Research*. 2014;96:19-28.
6. Cammà C, Ferri N, Zezza D, Marcacci M, Paolini A, Ricchiuti L, Lelli R. Confirmation of crayfish plague in Italy: detection of *Aphanomyces astaci* in white clawed crayfish. *Disease of Aquatic Organism*. 2010;89:265-268.
7. Caprioli R, Cargini D, Marcacci M, Cammà C, Giansante C, Ferri N. Self-limiting outbreak of crayfish plague in an *Austropotamobius pallipes* population of a river basin in the Abruzzi region (central Italy). *Diseases of Aquatic Organisms*. 2013;103:149-156.
8. Caprioli R, Garozzo P, Giansante C, Ferri N. Reproductive performance in captivity of *Austropotamobius pallipes* in Abruzzi Region (central Italy). *Invertebrate Reproduction & Development*. 2013;DOI:10.1080/07924259.2013.827136.
9. Caprioli R, Giansante C, Ferri N. La peste del gambero: una minaccia per la biodiversità dei nostri ecosistemi fluviali. *Argomenti*. 2013;4:69-74.
10. Carlson E, Zelikoff J. The Immune System of Fish: A target organ of toxicity. In: R. Di Guillo, & D. Hinton, *The toxicology of fishes*, CRC Press. 2008:489-530.
11. Dawood Al-Khafaji AH. Ph.D. Thesis: The use of fish reproductive disorder as bioindicator of pollution in riverine ecosystems: the study case of thinlip grey mullet *Liza ramada* (Risso, 1826) in low reach of Tiber river. University of Rom "Tor Vergata". 2011:1-118.
12. Ferreira M, Antunes P, Gil O, Vale C, Reis-Henriques MA. Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as bioindicator species for environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*. 2004;69:347-357.
13. Hecker M, Murphy MB, Coady KK, Villeneuve DL, Jones PD, Carr JA, Solomon KR, Smith EE, Van Der Kraak G, Gross T, Du Preez L, Kendall RJ, Giesy JP. Terminology of Gonadal Anomalies in Fish and Amphibians Resulting from Chemical Exposures. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2006;187:103-131.
14. Jamil K. *Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment*. Science Publisher, University of Michigan. 2001:204.
15. Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science Technology*. 1998;32: 2498-2506.
16. Lawrence AJ, Hemingway KL. *Effects Of Pollution On Fish: Molecular Effects and Population Responses*. Oxford: Blackwell Science Ltd. 2003:179-220.
17. McDonough CJ, Roumillat WA, Wenner CA. Sexual differentiation and gonad development in striped mullet (*Mugil cephalus* L.) from South Carolina estuaries. *Fishery Bulletin*. 2005;103:601-19.
18. Müller R, Lloyd R. (eds.). *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. FAO and Fishing News Books, Oxford, UK. 1994:371.
19. Puy-Azurmendi E, Ortiz-Zarragoitia M, Villagrana M, Kuster M, Aragón P, Atienza J, Puchades R, Maquieira A, Domínguez C, López de Alda M, Fernandes D, Porte C, Bayona JM, Barceló D, Cajaraville MP. Endocrine disruption in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay, South-western Europe). *Science of the Total Environment*. 2013;443:233-44.
20. Scardi M, Tancioni L, Cataudella S. Monitoring methods based on fish. In: G. Ziglio, M. Siligardi, G. Flaim (eds.), *Biological Monitoring Of Rivers: Applications and Perspectives*. Wiley, London: 2006;134-153.
21. Scholz S., Klüver, N. Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish. *Sexual Development*. 2009; 3: 136-151.
22. Snyder EM, Snyder SA, Kelly KJ, Gross TS, Villeneuve DL, Fitzgerald SD, Villalobos SA, Geisy JP. Reproductive responses of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed in cages to influent of the Las Vegas wash in Lake Mead, Nevada from late winter to early spring. *Environmental Science Technology*. 2004;38:6385-6395.
23. Tancioni L, Scardi M, Caudatella S. Riverine fish assemblages in temperate rivers. In: Ziglio G, Siligardi M, Flaim G (eds), *Biological Monitoring of River: Applications and Perspectives*. Wiley, London: 2006;47-69.
24. Tsutsumi O. Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2005;93(2-5):325-330.
25. Tuvikene A. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Annales Zoologici Fennici*. 1995;32:295-309.
26. Van Aerle R, Nolan M, Jobling S, Christiansen LB, Sumpter JP, Tyler CR. Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001; 20:2841-2847.
27. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. Fish bioaccumulation and biomarkers in environment risk assessment: a review. *Environmental. Toxicology. Pharmacology*. 2003;13: 57-149.
28. Viganò L, Arillo A, Bottero S, Massari A, Mandich A. First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). *Science of the Total Environment*. 2001;269:189-194.