



Università degli Studi di Padova
Facoltà di Scienze MM. FF. NN.

Corso di Laurea in Biologia
Curriculum Biologia Marina

Elaborato di laurea

Tributilstagno e imposex in gasteropodi marini

Tutor: Dott.ssa Maria Gabriella Marin
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Silvia Rova

Anno Accademico 2008/2009

Indice

INTRODUZIONE.....	pag. 1
1. TRIBUTILSTAGNO: UTILIZZI, DESTINO IN AMBIENTE ACQUATICO E LEGISLAZIONI.....	pag. 1
<i>Organostannici e TBT</i>	pag. 1
<i>Utilizzi</i>	pag. 1
<i>TBT nell'ambiente acquatico</i>	pag. 2
<i>Legislazioni</i>	pag. 3
2. IMPOSEX NEI GASTEROPODI MARINI.....	pag. 4
<i>La scoperta dell'imposex e la correlazione col TBT</i>	pag. 4
<i>Indici del grado di sviluppo dell'imposex</i>	pag. 5
<i>Imposex in funzione della concentrazione di TBT</i>	pag. 7
<i>Alterazione della gametogenesi</i>	pag. 8
3. MECCANISMO D'AZIONE DEL TBT.....	pag. 9
<i>Ipotesi dell'aumento del testosterone</i>	pag. 10
<i>Ipotesi dell'azione neurotossica</i>	pag. 13
<i>Ipotesi dell'azione agonista sul recettore RXR</i>	pag. 13
CONCLUSIONE.....	pag. 15
LETTERATURA CITATA.....	pag. 16

INTRODUZIONE

La presenza del tributilstagno (TBT) nell'ambiente marino è la conseguenza dell'utilizzo di questa sostanza soprattutto come biocida nelle vernici antivegetative. Numerosi studi hanno dimostrato la correlazione tra la presenza di TBT nelle acque e l'insorgenza in molte specie di gasteropodi marini del fenomeno dell' "imposex", che consiste nell'imposizione dei caratteri sessuali secondari maschili (pene, vaso deferente e ghiandola prostatica) nelle femmine.

Lo scopo di questo lavoro è fornire una panoramica sull'utilizzo del TBT e sui processi cui va incontro una volta rilasciato nell'ambiente acquatico, nonché analizzare il fenomeno dell'imposex nei gasteropodi marini, nelle sue manifestazioni morfologiche, istologiche ed endocrine, per poi illustrare le diverse ipotesi che sono state formulate per spiegare il meccanismo d'azione con cui il TBT provoca questo fenomeno.

1. TRIBUTILSTAGNO: UTILIZZI, DESTINO IN AMBIENTE ACQUATICO E LEGISLAZIONI

Organostannici e TBT

Gli organostannici sono per la maggior parte composti di origine antropogenica, la cui scoperta risale alla metà dell'Ottocento; sono costituiti da un atomo di stagno legato covalentemente a sostituenti organici, in numero da uno a quattro. Il tributilstagno (TBT) è un organostannico trisostituito, in cui tre gruppi butilici sono legati ad un atomo di stagno. La formula è $(C_4H_9)_3Sn^+$ e, data la carica positiva, lo si trova generalmente associato ad un anione, ad esempio acetato, carbonato, idrossido o cloruro (Hoch, 2001; U.S. EPA, 2003).

La tossicità degli organostannici varia in funzione del numero e del tipo dei gruppi organici legati allo stagno: risulta essere massima per i trisostituiti e diminuisce progressivamente nei di- e monosostituiti (Alzieu, 2000). Il TBT è il composto maggiormente tossico nei confronti degli organismi acquatici, ciò spiega il suo largo impiego come biocida nelle vernici antivegetative.

Utilizzi

Gli utilizzi degli organostannici sono vari: il 70% della produzione annuale (che nel 1992 risale a 50.000 tonnellate) viene impiegato nell'industria plastica come stabilizzatore del polivinil-cloruro (PVC), suscettibile a degradazione in seguito all'esposizione a luce e calore. Meno estensivo ma comunque significativo è l'uso degli organostannici come pesticidi in agricoltura e come agenti di conservazione del legname (Hoch, 2001).

Di grande importanza è l'impiego del TBT nelle vernici antivegetative, ed è questo l'utilizzo a cui si farà in particolare riferimento nel corso di questo lavoro. A partire dagli anni '60, il TBT venne usato come biocida di supporto nelle vernici a

base di rame, mentre nel decennio successivo, vista la maggiore efficacia rispetto al rame, le vernici a base di TBT andarono incontro ad un'enorme diffusione, dalle piccole imbarcazioni alle grandi navi (Santillo et al., 2002). L'accumulo di organismi incrostanti sulla chiglia delle imbarcazioni, fenomeno noto come "fouling", rappresenta un problema di grande entità per il trasporto navale poiché aumenta notevolmente l'attrito tra lo scafo e l'acqua, comportando un maggior consumo di carburante. L'applicazione della vernice antivegetativa crea un film di materiale contenente la sostanza biocida, la quale viene rilasciata a poco a poco formando attorno allo scafo uno strato d'acqua ad elevata concentrazione di TBT, che impedisce l'insediamento degli organismi. Le vernici antivegetative possono essere di diverso tipo: "free-association paint", in cui il biocida è mescolato alla matrice della vernice e diffonde nell'acqua circostante, ad una velocità che decade esponenzialmente dal momento dell'applicazione, e "self-polishing paint", contenenti biocida legato a polimeri che ne controllano il rilascio, il quale avviene mediante la graduale erosione dello strato esterno di vernice. La velocità di rilascio del TBT è $1.6 \mu\text{g Sn per cm}^2$ al giorno, ma raggiunge i 6 mg Sn per cm^2 al giorno nel periodo immediatamente successivo all'applicazione (Hoch, 2001). Il secondo tipo di vernice risulta il più vantaggioso in quanto l'efficacia rimane inalterata per 5-7 anni, ed è stato infatti il maggiormente usato nell'arco degli anni '80. In questo decennio si sono raggiunte le massime concentrazioni di TBT nell'ambiente acquatico, in particolare in prossimità dei porti e delle marine: nelle aree portuali in Europa e Nord America la concentrazione di TBT variava tra 50 e 500 ng l^{-1} (pari a $20-200 \text{ ng Sn l}^{-1}$) in colonna d'acqua, e tra 1 e 3 mg kg^{-1} di peso secco nei sedimenti (Alzieu, 2000).

TBT nell'ambiente acquatico

Il destino del TBT nell'ambiente acquatico è caratterizzato dal manifestarsi di tre processi: degradazione, adsorbimento e bioaccumulo.

1. Degradazione. La degradazione consiste nella progressiva perdita dei sostituenti organici, producendo dibutilstagno (DBT), monobutilstagno (MBT), e infine stagno inorganico, in seguito alla rottura dei legami Sn-C. Questi legami sono stabili in presenza di acqua, O_2 atmosferico e calore, ma sono sensibili ai raggi ultravioletti: la fotolisi è quindi un processo di degradazione efficace, ma solo nei primi metri della colonna d'acqua per via dell'attenuazione con la profondità. Anche reagenti chimici sia nucleofili che elettrofili, ad esempio gli acidi carbossilici, riescono ad attaccare il legame Sn-C. La biodegradazione è comunque la via di trasformazione di maggior importanza, rimanendo però limitata alle aree dove la concentrazione del TBT non raggiunge valori di tossicità per gli organismi degradatori. Solo poche specie con questa abilità sono state identificate, tra cui alcuni batteri del genere *Pseudomonas*, la diatomea *Skeletonema costatum* e due alghe verdi del genere *Chlorella*.

L'emivita del TBT in colonna d'acqua varia dunque in funzione di diversi fattori,

in primis torbidità e presenza di luce, ed è stimata essere generalmente tra pochi giorni e alcune settimane, ma può anche raggiungere diversi mesi nelle acque fredde e povere di materia organica. Nei sedimenti si hanno invece tempi molto più lunghi, che variano tra 1 e 5 anni, in funzione principalmente del livello di ossigenazione.

2. Adsorbimento. L'accumulo di TBT sulla superficie della materia particellata, processo noto come adsorbimento, è stato visto essere di grande importanza nella determinazione del destino di questa sostanza nell'ambiente acquatico: l'adsorbimento e la successiva sedimentazione delle particelle fanno sì che una grande quantità di TBT sia contenuta nei sedimenti, che, visti anche i lunghi tempi di degradazione, si comportano come un serbatoio di accumulo per questa sostanza. Dai sedimenti il TBT può ritornare in colonna a causa del desorbimento e di fenomeni di risospensione o può essere ingerito da organismi detritivori o limivori.

3. Bioaccumulo. Il carattere lipofilico del TBT lo rende particolarmente incline ad accumularsi nei tessuti ad alto contenuto lipidico, processo noto come bioaccumulo. Il TBT entra negli organismi direttamente attraverso le membrane lipidiche o viene veicolato attraverso il cibo; viene poi metabolizzato in composti con carattere idrofilico che ne facilitano l'eliminazione. Ciò avviene essenzialmente in due fasi: idrossilazione, da parte del sistema delle monoossigenasi citocromo P-450 dipendenti, e successivamente coniugazione con zuccheri o solfato, col risultato di rendere il composto altamente idrofilico e quindi rapidamente eliminabile (Lee, 1991). In pesci e crostacei questa via metabolica procede efficientemente, rispettivamente in fegato ed epatopancreas, risultando in bassi livelli di accumulo di TBT nei tessuti. I molluschi invece hanno scarsa capacità di metabolizzare il TBT perchè le reazioni di detossificazione mediate dal citocromo P-450 risultano essere molto limitate. Ciò comporta un elevato bioaccumulo nei tessuti, ad esempio nel complesso riproduttivo-digestivo dei gasteropodi sono state misurate concentrazioni di TBT 100.000 volte maggiori di quelle dell'acqua circostante. Questa bassa capacità di biotrasformazione probabilmente contribuisce all'elevata sensibilità che i molluschi, in particolar modo i gasteropodi, dimostrano nei confronti del contaminante.

Legislazioni

L'utilizzo del TBT nelle vernici antivegetative si è dimostrato la causa del declino di numerose popolazioni di gasteropodi, colpite dall'imposex, in particolare in prossimità di porti e marine. Inoltre, l'uso del TBT è stato responsabile del declino dell'industria di allevamento di ostriche nella baia di Arcachon, sulla costa atlantica francese, causando il fallimento dell'insediamento larvale e gravi alterazioni delle conchiglie negli adulti (Santillo et al., 2002). Nel 1982 le pesanti perdite economiche e il forte impatto ecologico spinsero il governo francese a introdurre una legge che proibiva l'applicazione delle vernici a base di TBT sulle

imbarcazioni con lunghezza inferiore ai 25 m. Sulla scorta delle crescenti prove scientifiche, le vernici a base di TBT furono bandite sulle piccole imbarcazioni (< 25 m) nel Regno Unito nel 1987, negli Stati Uniti nel 1988, in Canada, Australia e Nuova Zelanda nel 1989 e nell'intera Unione Europea nel 1991 (Santillo et al., 2002). Questi provvedimenti hanno dato esito ad una parziale ripresa delle popolazioni di molluschi, ma in molte aree la contaminazione rimaneva superiore ai livelli di non tossicità. Ciò era dovuto all'uso illegale del TBT su piccole imbarcazioni, al rilascio da parte dei sedimenti e all'utilizzo legale del biocida su navi di maggiori dimensioni.

Nel 2001 l'International Maritime Organisation (IMO) adottò l' "International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships" (AFS Convention), che prevede il divieto a livello mondiale dell'applicazione di vernici a base di TBT su carene di ogni dimensione a partire dal 1° gennaio 2003 e ne ha totalmente bandito la presenza a partire dal 1° gennaio 2008. Tale Convenzione, ratificata da 25 paesi, che rappresentavano il 38% del tonnellaggio mondiale, è entrata in vigore a partire dal 17 settembre 2008 (IMO, 2009). L'Unione Europea, basandosi sull'AFS Convention, nel luglio 2003 ha a sua volta adottato il Regolamento 782/2003, che vieta l'applicazione delle vernici a base di TBT su ogni tipo di scafo a partire dal luglio 2003, e la loro presenza a partire dal 1° gennaio 2008 (Rato et al., 2009).

2. IMPOSEX NEI GASTEROPODI MARINI

La scoperta dell'imposex e la correlazione col TBT

La maggior parte dei gasteropodi prosobranchi sono gonocorici, ovvero a sessi separati. Nel 1970 a Plymouth, UK, Blaber osservò che numerose femmine di *Nucella lapillus* presentavano dietro il tentacolo cefalico destro un'escrescenza, in posizione simile al pene maschile (Blaber, 1970). L'anno successivo Smith descrisse in femmine di *Ilyanassa obsoleta* raccolte lungo la costa del Connecticut una struttura simile al pene, nonché un vaso deferente e un gonodotto convoluto (Smith, 1971). Per indicare questo fenomeno Smith coniò il termine "imposex", che significa sovrapposizione di caratteri maschili a quelli femminili presenti nelle femmine. Attualmente l'imposex è stato documentato in almeno 195 specie, ed è considerato un fenomeno di portata globale (Sternberg et al., 2009).

Esperimenti condotti da Smith nei primi anni '80 misero in evidenza la maggiore incidenza dell'imposex in corrispondenza delle marine e dei porti: innanzitutto venne osservato un maggior grado di imposex negli individui prelevati nelle marine rispetto a quelli prelevati a distanza da queste (Smith, 1981a); inoltre l'imposex veniva indotto in individui provenienti da località incontaminate e trasferiti in prossimità di una marina (Jenner, 1979). La causa venne individuata nelle vernici antivegetative, il cui mercato a quell'epoca era stato conquistato dalle vernici a base di TBT. L'esposizione in laboratorio a questo tipo di vernici

aumentò l'incidenza dell'imposex in *I. obsoleta* rispetto ai controlli mantenuti in acqua di mare non contaminata (Smith, 1981c). Successivamente, l'aumento dell'imposex prodotto nella stessa e in altre specie dall'esposizione in laboratorio a basse concentrazioni di TBT fornì la prova definitiva della correlazione tra TBT e imposex (Smith, 1981c; Gibbs et al., 1988).

Indici del grado di sviluppo dell'imposex

Fondamentali studi sull'imposex furono condotti da Gibbs e Bryan nella seconda metà degli anni '80, sulla specie *N. lapillus* (Gibbs & Bryan, 1996): si tratta di una specie gonocorica che manca di stadio larvale planctonico, lo sviluppo larvale avviene infatti all'interno di capsule ovigere adese al substrato, da cui dopo 3-4 mesi emergono i giovanili. La maturità sessuale è raggiunta due anni dopo la schiusa.

In questi studi vennero definiti degli indici per quantificare il grado di imposex di un individuo o di una popolazione: Vas Deference Sequence Index (VDSI) e Relative Penis Size Index (RPSI).

Prima di entrare nel merito di questi due indici è però necessario descrivere brevemente l'apparato riproduttore dei gasteropodi prosobranchi: è costituito da una sola gonade, la destra, situata tra le spirali della massa viscerale, che comunica con la cavità del mantello per mezzo del dotto genitale. Quest'ultimo è composto da tre porzioni, distinte per la diversa origine: gonodotto prossimale, dotto renale mediano, e dotto palleale distale. Il dotto palleale, originatosi da un solco ciliato nell'epitelio palleale, è il tratto che presenta maggiori specializzazioni sesso-specifiche, ed è la regione interessata dal fenomeno dell'imposex. Nel maschio è specializzato in una ghiandola prostatica, che secerne il liquido prostatico, un vaso deferente, che percorre il pavimento della cavità palleale, e un pene, situato in prossimità del tentacolo cefalico destro. Nella femmina il dotto palleale è modificato in camere per la raccolta e la conservazione degli spermatozoi, ossia rispettivamente la borsa copulatoria e il ricettacolo seminale, nonché in una serie di ghiandole quali quella dell'albumine, della gelatina e della capsula (Ruppert et al., 2007).

Il Vas Deference Sequence Index individua in *N. lapillus* sei stadi di sviluppo dell'imposex (Figura 1):

Stadio 1. Sviluppo della porzione prossimale del vaso deferente, in prossimità della papilla genitale.

Stadio 2. Principio di sviluppo del pene, in prossimità del tentacolo cefalico destro.

Stadio 3. Accrescimento e formazione del pene vero e proprio.

Stadio 4. Formazione della porzione distale del vaso deferente alla base del pene, e successiva fusione con la porzione prossimale.

Stadio 5. Accrescimento del tessuto del vaso deferente sulla papilla genitale, con occlusione della vulva.

Stadio 6. Formazione della ghiandola prostatica nella regione della ghiandola della capsula, dove si osserva anche l'accumulo di una massa di capsule ovigere abortite.

Femmine che esibiscono gli stadi da 1 a 4 mantengono inalterata la capacità di riprodursi, in quanto la vulva non è ostruita e permette la copula e il rilascio delle capsule ovigere. Questo non è più possibile negli stadi 5 e 6, in cui le femmine risultano dunque sterili. In questi due stadi però le capsule ovigere continuano ad essere prodotte nonostante l'occlusione della vulva, ma non potendo essere emesse all'esterno formano una massa di capsule abortite che si accumulano nella ghiandola della capsula. In alcuni casi queste masse si accrescono al punto da lacerare le pareti dell'ovidotto, causando la morte della femmina. La massa estrusa è visibile in questi casi fusa alla conchiglia.

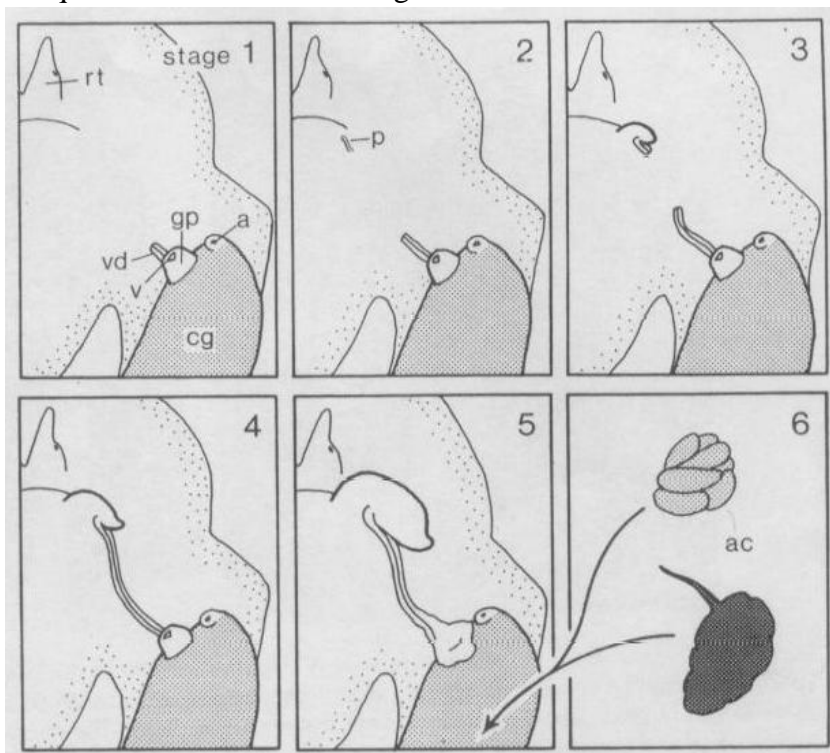


Figura 1: Sei stadi usati per classificare lo sviluppo dell'imposex in *N. lapillus* secondo il vas deference sequence (VDS) method. Abbreviazioni: a, ano; ac, massa di capsule abortite; cg, ghiandola della capsula; gp, papilla genitale; p, pene; rt, tentacolo destro; v, vulva; vd, vaso deferente (da Gibbs & Bryan, 1996).

Il Relative Penis Size Index (RPSI) dà una misura quantitativa della dimensione media del pene delle femmine rispetto a quella dei maschi in una popolazione colpita da imposex. E' espresso come il rapporto tra il cubo della lunghezza media del pene delle femmine e il cubo della lunghezza media del pene dei maschi, moltiplicato per 100. L'utilizzo del cubo della lunghezza permette di basarsi su un dato di semplice misurazione, quale la lunghezza, e di ottenere però un risultato che stima la massa del pene (Gibbs et al., 1987).

Nello studio di una popolazione colpita da imposex quindi ci sono più strumenti per valutare il grado di sviluppo del fenomeno: innanzitutto la percentuale delle femmine che presentano il pene, anche se oltre un certo grado di contaminazione tutte le femmine esibiscono almeno i primi stadi di imposex e dunque questo indice perde significato. Il RPSI è uno strumento molto utile perché dà una stima dello sviluppo del pene nelle femmine, ma non dà indicazioni sulla sterilità. Per questo motivo dunque viene spesso usata l'associazione dei due indici RPSI e VDSI, in quanto quest'ultimo è molto utile per valutare le capacità riproduttive della popolazione, per la quale l'indice viene calcolato come la media degli stadi di tutte le femmine analizzate. Quando VDSI supera lo stadio 4 significa che le capacità riproduttive della popolazione sono ridotte (Gibbs & Bryan, 1996).

Imposex in funzione della concentrazione di TBT

La pressoché totale scomparsa di popolazioni di gasteropodi prosobranchi nei pressi di località portuali fu il campanello d'allarme che innescò la serie di provvedimenti legislativi che hanno progressivamente bandito l'uso del TBT nelle vernici antivegetative. Gli elevati livelli di contaminazione di quelle regioni avevano infatti provocato lo sviluppo dell'imposex fino ai suoi stadi più elevati e la conseguente sterilità della maggior parte delle femmine. Gli effetti a lungo termine a livello di popolazione dipendono comunque anche dalla strategia riproduttiva: nel caso di specie con stadio larvale planctonico le aree fortemente colpite dall'imposex possono venire ripopolate da larve provenienti da altri siti, garantendo così la sopravvivenza della popolazione. In specie prive di stadio larvale planctonico le popolazioni sono invece molto più vulnerabili, data la scarsa probabilità che larve da siti incontaminati riescano a ripopolare l'area (Sternberg et al., 2009).

Anche in località piuttosto distanti da porti e marine sono state individuate popolazioni affette da imposex, nei suoi stadi di sviluppo più bassi. Ciò ha sollevato la questione di quale fosse la concentrazione minima di TBT capace di innescare lo sviluppo dell'imposex. Esperimenti di laboratorio furono condotti da Gibbs e Bryan (Gibbs & Bryan, 1996) su *N. lapillus* per determinare gli effetti provocati dall'esposizione a diverse concentrazioni di TBT: individui adulti venivano allevati per un anno o più in vasche contenenti acqua mantenuta in continua circolazione, e portata alla concentrazione di TBT sperimentale facendola scorrere, prima di entrare nelle vasche, in camere contenenti aste cui era stata applicata la vernice antivegetativa a base di TBT. Le concentrazioni di TBT saggiate erano 3.4, 18.7 e 107 ng Sn l⁻¹. A tutte le concentrazioni, compresa la più bassa, si osservò nelle femmine un significativo aumento del pene rispetto ai controlli, e l'accumulo di TBT da parte degli organismi risultava approssimativamente proporzionale alla concentrazione cui erano stati esposti. E' interessante notare che in esperimenti sul campo su popolazioni affette da imposex, lo stadio esibito dagli adulti era molto vicino a quello dei giovani, a

suggerire che probabilmente il grado di imposex è determinato principalmente dalla concentrazione di TBT cui sono esposti gli individui prima del raggiungimento della maturità sessuale, nonostante poi possa comunque aumentare, come dimostrato dall'esperimento precedente. Esperimenti mirati ai primi due anni di vita di *N. lapillus*, necessari al raggiungimento della maturità sessuale, furono condotti da Gibbs et al. (1988) in vasche analoghe a quelle descritte in precedenza. Diversi gruppi di individui giovani, sia maschi che femmine, furono esposti a concentrazioni di TBT pari a 1-2, 3-5, 20 e 100 ng Sn l⁻¹, dal momento della schiusa fino all'età di 12, 18 e 24 mesi. A tutte le concentrazioni si osservò che il VDSI rimaneva pressoché invariato tra le femmine di 12 e 24 mesi, ad indicare che lo stadio di imposex è determinato essenzialmente dal livello di TBT cui gli individui sono esposti nel primo anno di vita. Ciò è sottolineato anche dalla concentrazione di TBT nei tessuti, che raggiunge dopo 12 mesi livelli molto vicini a quelli dei 24 mesi. All'età di 2 anni un terzo delle femmine allevate a 1-2 ng Sn l⁻¹ era sterile, con VDSI pari a 5 o 6, così come la totalità delle femmine allevate a concentrazioni maggiori.

Questi risultati indicano che lo sviluppo dell'imposex inizia a concentrazioni di TBT <1 ng Sn l⁻¹ e che la crescita di individui giovani a concentrazioni di TBT >3-5 ng Sn l⁻¹ causa la sterilità nella totalità delle femmine.

La relazione tra i due indici, RPSI e VDSI, e la concentrazione di TBT nelle acque mostra come sia la dimensione del pene sia gli stadi del VDSI aumentino molto rapidamente all'aumentare della concentrazione a partire da valori molto bassi, tra gli 0 e i 4 ng Sn l⁻¹ (Gibbs & Bryan, 1996).

Esperimenti di trapianto da siti ad alta incidenza di imposex a siti incontaminati hanno dimostrato l'irreversibilità del fenomeno (Gibbs & Bryan, 1996). È inoltre importante sottolineare che nelle popolazioni che vivono in località pesantemente contaminate la percentuale delle femmine scende molto al di sotto del 50%, a causa dell'elevata mortalità femminile agli stadi più avanzati di imposex dovuta alla rottura della ghiandola della capsula (Gibbs & Bryan, 1996).

Alterazione della gametogenesi

Studi sull'attività gonadica di *N. lapillus* furono condotti da Gibbs et al. (1988) nell'ambito dell'esperimento riportato in precedenza, su individui di 24 mesi di età. Nelle femmine allevate a concentrazioni di TBT pari a 1-2 ng Sn l⁻¹ l'oogenesi procedeva normalmente, nella sezione della gonade era infatti possibile osservare i tre stadi di maturazione dell'oocita: previtellogenic, vitellogenic e postvitellogenic (Feare, 1970). Lo stesso si poteva notare nell'ovario delle femmine allevate a 3-5 ng Sn l⁻¹, nonostante queste risultassero sterili per l'occlusione della vulva da parte del tessuto del vaso deferente. Alla concentrazione di 20 ng Sn l⁻¹ la situazione si presentava però molto diversa: oociti previtellogenic erano rari o addirittura assenti, i postvitellogenic probabilmente in fase di riassorbimento, ad indicare che l'oogenesi era cessata. Si

notava invece la presenza di tubuli seminiferi, in cui la spermatogenesi era generalmente negli stadi iniziali, anche se è stato individuato sporadicamente qualche spermatozoo maturo. Esaminando individui allevati a questa stessa concentrazione, ma dell'età di 27 mesi, uno in particolare mostrava una gonade in tutto e per tutto simile al testicolo, con normale spermatogenesi e spermaturati. Esperimenti di trapianto furono condotti per avere un riscontro sul campo: giovani femmine di 2 anni, figlie di adulti trapiantati da una località incontaminata ad una con livelli di TBT tra i 9 e i 19 ng Sn l⁻¹, mostravano una gonade analoga a quella delle femmine coetanee allevate a 20 ng Sn l⁻¹.

Questa serie di esperimenti suggerisce dunque che ad una concentrazione di TBT attorno a 10 ng Sn l⁻¹ si abbia alterazione della gametogenesi, con cessazione dell'oogenesi e sviluppo di tubi seminiferi con stadi precoci della spermatogenesi (Gibbs et al., 1988).

L'alterazione della gametogenesi è considerato un fenomeno a parte rispetto all'imposex, scatenato dalla stessa sostanza ma probabilmente per mezzo di meccanismi endocrini differenti. Non è chiaro se possa portare alla conversione delle femmine in maschi funzionanti, ma comunque ciò sarebbe di poca importanza in una popolazione in cui non esistono più femmine feconde.

La tabella qui in seguito riportata (Tabella 1) fornisce un riepilogo degli effetti dell'esposizione al TBT di femmine di *N. lapillus* nei primi due anni di vita.

[TBT] (ng l ⁻¹ Sn)	Effetti sul sistema riproduttore
<0.5	RPSI < 0.5% ; VDSI < 4. Riproduzione normale. Sviluppo di pene e vaso deferente.
1-2	RPSI 40+% ; VDSI 4-6. Capacità riproduttiva mantenuta in certe femmine; altre sterilizzate per blocco dell'ovidotto. Capsule abortite nella ghiandola della capsula.
3-4	Tutte le femmine virtualmente sterili. Oogenesi apparentemente normale.
10	Oogenesi soppressa. Oociti riassorbiti. Inizio spermatogenesi.
20	Testicoli sviluppati in misura variabile. Vescicola seminale con sperma maturo nella maggior parte degli animali affetti.
100	Ricettacolo seminale non sviluppato in alcune femmine

Tabella 1: Sistema riproduttivo della femmina di *N. lapillus*: riassunto degli effetti dell'esposizione al TBT nei primi due anni di vita, basata su dati di campo e di laboratorio (adattato da Gibbs & Bryan, 1996)

3. MECCANISMO D'AZIONE DEL TBT

Dai primi anni '90 molti ricercatori hanno rivolto la propria attenzione al meccanismo con cui il TBT provoca l'imposex nei gasteropodi marini, agendo

molto probabilmente come un distruttore endocrino. La scarsa conoscenza del funzionamento del sistema endocrino dei molluschi ha però reso particolarmente difficile la comprensione del meccanismo d'azione, tanto che tutt'oggi, dopo vent'anni di studi, questo rimane ancora incerto.

Le ipotesi proposte sono tre: ipotesi dell'aumento del testosterone, ipotesi dell'azione neurotossica, ipotesi dell'azione agonista sul recettore RXR (Retinoid X Receptor).

Ipotesi dell'aumento del testosterone

I primi esperimenti volti ad esaminare l'effetto del TBT sul metabolismo degli ormoni steroidei nei gasteropodi marini furono condotti da Spooner et al. (1991) su esemplari di *N. lapillus*, esposti per 42 giorni ad acqua di mare con concentrazione di TBT pari a 40 ng Sn l^{-1} : i livelli di progesterone e 17β -estradiolo non videro significativi cambiamenti in seguito all'esposizione a TBT, la concentrazione di testosterone risultava invece essere significativamente più elevata rispetto a quella delle femmine allevate in acque prive di TBT, in particolare dopo 28 giorni di esposizione. Ciò indicava un probabile intervento del TBT nel metabolismo degli ormoni steroidei, con conseguente alterazione dell'equilibrio ormonale ed aumento dei livelli di testosterone libero. Questa alterazione potrebbe essere dunque la causa della comparsa dei caratteri sessuali maschili nelle femmine, mediante una serie di eventi biochimici non chiari data la scarsa conoscenza del sistema endocrino dei gasteropodi. Un altro esperimento fu condotto dagli stessi ricercatori, fornendo ulteriore sostegno a questa ipotesi: femmine adulte di *N. lapillus* furono sottoposte ad un'iniezione di testosterone e allevate in acque prive di TBT. Le quantità di testosterone iniettate erano $0.01 \mu\text{g}$ (assumendo che un individuo pesa mediamente 1 g, questa quantità è circa equivalente alla quantità misurata nelle femmine esposte a TBT per 28 giorni nell'esperimento precedente), $0.1 \mu\text{g}$ e $10 \mu\text{g}$. A tutte le dosi si osservò un aumento della lunghezza del pene rispetto ai controlli, statisticamente significativo però solo alle due dosi più elevate.

Tre ipotesi sono state proposte per spiegare il meccanismo con cui il TBT innalza i livelli di testosterone:

1. Inibizione dell'aromatasi citocromo P450-dipendente. Gli esperimenti sopra illustrati spinsero gli autori a formulare l'ipotesi secondo cui il TBT inibisce la conversione del testosterone in 17β -estradiolo, mediata dall'aromatasi citocromo P450-dipendente. L'attività di questo enzima è associata a quella del sistema MFO (Mixed Function Oxygenase), noto per essere implicato anche nella debutilazione del TBT in DBT. Per testare questa ipotesi Bettin et al. (1996) condussero una serie di esperimenti su due specie di gasteropodi marini, *N. lapillus* e *Hinia reticulata*. La contemporanea esposizione per 5 mesi a TBT (50 ng Sn l^{-1}) e a ciproterone acetato, inibitore competitivo dei recettori per gli androgeni, bloccava lo sviluppo dell'imposex, totalmente in *N. lapillus*, solo

parzialmente in *H. reticulata*. La diversa risposta venne interpretata dagli autori come la conseguenza di una diversa distribuzione dei recettori per gli androgeni nei tessuti delle due specie. L'assenza di questi recettori in determinati tessuti potrebbe essere la ragione per cui alcune specie di gasteropodi non sono colpite da imposex anche se esposte ad elevate concentrazioni di TBT. Successivamente esemplari di entrambe le specie furono esposti a TBT (50 ng Sn l⁻¹) più una miscela di 17β-estradiolo (500 ng l⁻¹) e di estrone (500 ng l⁻¹) per 5 mesi: lo sviluppo dell'imposex fu soppresso in entrambe le specie, avvalorando l'ipotesi secondo cui è l'alterazione del normale bilancio androgeni/estrogeni a provocare l'imposex. L'induzione dello sviluppo dell'imposex fu ottenuta anche mediante l'esposizione per 5 mesi a SH 489 (1-metil-1,4-androstadiene-3,17-dione), inibitore specifico dell'aromatasi steroidea, confermando l'ipotesi che l'aromatasi citocromo P450-dipendente sia inibita dal TBT.

Nonostante questi esperimenti forniscano un consistente supporto all'ipotesi dell'inibizione dell'aromatasi steroidea, non esistono ancora prove che la dimostrano in maniera inconfutabile. Numerose obiezioni sono state sollevate (Sternberg et al., 2009): innanzitutto, se viene bloccata la conversione del testosterone in 17β-estradiolo ci si aspetterebbe un aumento del primo, cosa che avviene, e una diminuzione del secondo, cosa che invece non è stata riscontrata: la misurazione dei livelli di 17β-estradiolo in individui esposti a TBT non evidenziò significativi cambiamenti in *N. lapillus* nel corso dell'esperimento, mentre un leggero aumento fu osservato in *H. reticulata* (Bettin et al., 1996). Inoltre l'attività dell'aromatasi nel muricide *Bolinus brandaris* è pressochè identica in popolazioni sane e in popolazioni colpite da imposex, e corrisponde a meno dell'1% del metabolismo di Fase I del testosterone (Morcillo & Porte, 1999). Analogamente nel nassaride *I. obsoleta* la conversione del testosterone in estradiolo avviene a livelli molto bassi. Ciò fa supporre che il ruolo dell'aromatasi P450-dipendente nel metabolismo del testosterone sia trascurabile, screditando l'ipotesi che la vede al centro del meccanismo d'azione del TBT (Sternberg et al. 2009).

2. Inibizione della solfotransferasi. Esperimenti condotti da Ronis e Mason (1996) sul littorinide *Littorina littorea* hanno dimostrato che in individui iniettati con ¹⁴C-testosterone e allevati in assenza di TBT, il testosterone viene per la maggior parte (60-80%) coniugato con solfato, diventando idrofilico e dunque facilmente eliminabile. Ripetendo l'esperimento esponendo gli individui a TBT a concentrazione pari a 594 µg Sn l⁻¹ per 42 ore la quantità di testosterone coniugata col solfato diminuì notevolmente, mentre aumentava la quantità di testosterone libero. Venne dunque avanzata l'ipotesi che il TBT agisca bloccando la coniugazione del testosterone col solfato, operata dalla solfotransferasi, impedendo l'eliminazione del testosterone e causandone dunque l'accumulo.

E' da notare però che l'esperimento sopra riportato è stato condotto ad una concentrazione di TBT estremamente elevata rispetto a quella riscontrata nelle aree contaminate, e che la durata dell'esposizione è molto breve (42 ore) rispetto

ad esempio agli esperimenti di Bettin et al. (1996) che duravano 5 mesi: i risultati ottenuti potrebbero riflettere un fenomeno che è almeno in parte a breve termine e/o associato a concentrazioni di TBT con elevata tossicità acuta (Matthiessen & Gibbs, 1998). In *I. obsoleta* e *Marisa cornuarietis* la coniugazione del testosterone col solfato avviene a livelli quasi trascurabili (Gooding & LeBlanc, 2001; Janer et al., 2005). Ciò induce a pensare che l'attività della solfotransferasi non rivesta un ruolo determinante nel metabolismo del testosterone nei gasteropodi prosobranchi (Sternberg et al., 2009).

3. Inibizione della acil-coenzima A:testosterone aciltransferasi (ATAT). Gooding e LeBlanc individuarono in *I. obsoleta* un singolare metodo di regolazione dei livelli di testosterone libero, che consiste nell'esterificazione con acidi grassi, con formazione di composti apolari che vengono trattiene dall'organismo, e nella de-esterificazione; il controllo di questi due processi permette di regolare finemente i livelli di testosterone libero. L'enzima che catalizza l'esterificazione è l'acil-coenzima A:testosterone aciltransferasi (ATAT). Processi analoghi sono stati individuati anche in altre specie, per la regolazione dei livelli sia di testosterone che di 17β -estradiolo. L'esposizione di femmine di *I. obsoleta* a TBT causa non solo l'innalzamento dei livelli di testosterone libero, ma anche la diminuzione dei livelli di testosterone coniugato con acidi grassi. Esperimenti successivi hanno dimostrato che il TBT non riduce i livelli della proteina ATAT, ma è in grado di inibirla alle concentrazioni che si riscontrano nelle aree contaminate. L'inibizione dell'enzima ATAT sembrerebbe dunque essere l'ipotesi più accreditata per spiegare il meccanismo con cui il TBT innalza i livelli di testosterone libero (Sternberg et al., 2009).

Per poter accettare l'ipotesi per cui l'aumento del testosterone causato dal TBT è responsabile dello sviluppo dell'imposex è necessario chiarire la funzione dell'ormone stesso nei gasteropodi, cosa che invece è ancora ben lontana dall'essere determinata. Studi volti a indagare la funzione del testosterone sono stati condotti da Sternberg et al. (2008a) su *I. obsoleta*, in riferimento al processo noto come recrudescenza riproduttiva, ovvero una nuova fase di crescita del tratto riproduttivo e degli organi sessuali secondari dopo un periodo di inattività riproduttiva, generalmente stagionale. Questo processo è controllato da segnali ambientali, quali fotoperiodo, temperatura e disponibilità di cibo, che innescano una cascata ormonale che induce lo sviluppo degli organi sessuali e attiva l'oogenesi, la spermatogenesi e il comportamento riproduttivo. L'esito di questi studi non ha evidenziato un significativo ruolo del testosterone nella recrudescenza riproduttiva, inoltre non è stato individuato un recettore nucleare specifico per gli androgeni. Ciò suggerisce che l'ipotesi secondo la quale l'aumento del testosterone è responsabile dello sviluppo dell'imposex manchi di fondamenti proprio riguardo alla sua assunzione di base, ovvero che il testosterone sia implicato nel controllo dello sviluppo degli organi sessuali (Sternberg et al., 2009).

Ipotesi dell'azione neurotossica

Diversi esperimenti hanno dimostrato in più specie il ruolo dei gangli cerebrale e pedale nello sviluppo dell'imposex: essi agiscono mediante il rilascio di un ormone peptidico, indicato come Penis Morphogenic Factor (PMF), non ancora caratterizzato. È stato osservato che il TBT è in grado di attivare in vitro i gangli asportati da femmine del muricide *Ocenebra erinacea* (Feral & Le Gall, 1983). Oberdörster e McClellan-Green (2002) hanno somministrato a femmine di *I. obsoleta* il neuropeptide APGWamide, secreto dai gangli cerebrale e pedale dei maschi, ottenendo l'induzione dell'imposex. I due ricercatori hanno dunque proposto un meccanismo che prevede l'attivazione dei suddetti gangli da parte del TBT, con conseguente rilascio dell'APGWamide che induce lo sviluppo dell'imposex. L'APGWamide è stato proposto come un possibile candidato per il ruolo di PMF.

Questa ipotesi tuttavia necessita di ulteriori studi per essere dimostrata, infatti esperimenti successivi hanno avuto esito contrastante: la somministrazione di APGWamide a femmine di *N. lapillus* e *B. brandaris* non ha dato come risultato l'induzione dell'imposex (Castro et al., 2007; Santos et al., 2006).

Ipotesi dell'azione agonista sul recettore RXR

La presenza di un recettore RXR (Retinoid X Receptor) con elevata omologia con quelli dei vertebrati è stata dimostrata in diverse specie di gasteropodi, tra cui i muricidi *N. lapillus* e *Thais clavigera*. RXR è un fattore di trascrizione ligando-dipendente, il cui ligando nelle specie analizzate sembra essere l'acido 9-cis retinoico, vista l'elevata affinità con cui lega il recettore in vitro (Castro et al., 2007; Nishikawa et al., 2004). Iniezioni di acido 9-cis retinoico in femmine di *N. lapillus* e *T. clavigera* hanno causato lo sviluppo dell'imposex. Diversi studi hanno dimostrato che il TBT lega con elevata affinità RXR umani, ed è in grado di attivare l'espressione genica mediata da RXR; il TBT inoltre inibisce il legame dell'acido 9-cis retinoico al recettore, perché compete per lo stesso sito di legame (Sternberg et al., 2009). Il coinvolgimento del segnale mediato da RXR nella recrudescenza riproduttiva è stato evidenziato dai risultati ottenuti da Sternberg et al. (2008b), i quali mostrano che l'espressione del gene codificante per RXR è elevata in corrispondenza di tale periodo sia nei maschi che nelle femmine di *I. obsoleta*. È da notare inoltre che in questa specie la recrudescenza avviene in periodi diversi tra i due sessi: nel maschio infatti inizia tre mesi prima rispetto alla femmina. Questi risultati nell'insieme hanno portato alla formulazione di una nuova ipotesi, secondo cui il TBT indurrebbe l'imposex attivando prematuramente nella femmina l'espressione genica mediata da RXR, durante la finestra temporale della recrudescenza maschile. Questa ipotesi è supportata dall'osservazione che in *I. obsoleta* l'imposex è inducibile dal TBT solo nel periodo corrispondente alla recrudescenza maschile (Sternberg et al., 2009).

Sternberg et al. (2009) hanno dunque proposto un meccanismo per l'induzione

dell'imposex secondo cui il TBT attiva la via di segnalazione di RXR in due modi: direttamente, legandosi al recettore e attivandolo, e indirettamente, inibendo l'esterificazione dell'acido 9-cis retinoico con acidi grassi, causando dunque l'aumento dei livelli di questo ligando, che attiverà RXR (Figura 2). È noto che il TBT inibisce l'esterificazione del testosterone con acidi grassi, e che anche i retinoidi sono soggetti ad un'analogia esterificazione: l'inibizione da parte del TBT dell'acil-coenzima A:aciltransferasi porterebbe dunque all'aumento dei livelli sia di acido 9-cis retinoico sia di testosterone nella forma libera. Ciò spiega gli elevati livelli di testosterone associati all'imposex, ma ponendoli come un effetto secondario piuttosto che come la causa dello sviluppo del fenomeno stesso.

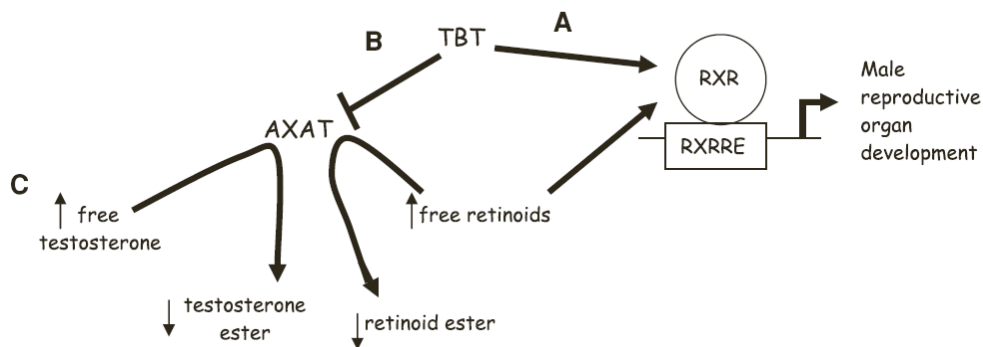


Figura 2: Meccanismo proposto per l'imposex indotto dal TBT. Il TBT attiva la via di segnalazione del retinoid X receptor (RXR) avviando la trascrizione dei geni necessari per lo sviluppo del tratto riproduttivo maschile (a) direttamente, legando e attivando RXR; o (b) indirettamente, inibendo l'acil coenzima A:aciltransferasi (AXAT), con conseguente aumento dei livelli di retinoide (e testosterone) endogeno. RXR è quindi attivato dal retinoide endogeno libero. RXR stimola la trascrizione genica mediante l'interazione con RXR response element (RXRRE). Analogamente, il testosterone somministrato dall'esterno (c) inibisce competitivamente l'esterificazione del retinoide, causando livelli elevati di retinoide endogeno libero, in grado di attivare la via di segnalazione di RXR, inducendo lo sviluppo degli organi riproduttivi maschili (da Sternberg et al., 2009).

I risultati di esperimenti precedentemente esposti, volti a supportare l'ipotesi dell'aumento del testosterone come causa dell'imposex, possono essere spiegati anche alla luce dell'ipotesi per cui l'imposex è causato dall'attivazione della via di segnalazione del recettore RXR: la somministrazione del testosterone fa sì che questo ormone inibisca competitivamente l'esterificazione dell'acido 9-cis retinoico, facendo aumentare i livelli della forma libera che attiva RXR. I risultati dell'esposizione a TBT e ciproterone acetato (Bettin et al. 1996), inibitore competitivo dei recettori per androgeni, sarebbero invece da analizzare con cautela perchè fuorvianti: il ciproterone acetato infatti non si comporta da antagonista solo nei confronti del recettore per androgeni, ma anche per una serie di altri recettori, tra cui probabilmente proprio RXR.

L'ipotesi del coinvolgimento di RXR nel meccanismo di induzione dell'imposex da parte del TBT, così come formulata da Sternberg et al. (2009), necessita tuttavia di ulteriori studi per verificare innanzitutto il ruolo dell'acido 9-cis

retinoico e di RXR nello sviluppo degli organi sessuali nei gasteropodi, e, non meno importante, la capacità del TBT di attivare RXR direttamente e di innalzare i livelli di acido 9-cis retinoico.

CONCLUSIONE

L'imposex è un fenomeno cui studiosi da ogni parte del mondo hanno rivolto l'attenzione per descriverlo, analizzarne l'incidenza e spiegare il meccanismo attraverso il quale viene indotto dal TBT. A quasi 40 anni dalla scoperta dell'imposex però questo meccanismo non è ancora stato dimostrato inequivocabilmente; gli studi più recenti propongono un'ipotesi nuova, che vede il coinvolgimento del recettore RXR, discostandosi da quella che è stata l'ipotesi maggiormente accreditata nell'ultimo ventennio e che suggeriva invece il coinvolgimento del testosterone. Ulteriori ricerche sono dunque necessarie per chiarire definitivamente "l'enigma TBT/imposex" (Sternberg et al., 2009).

Diversi studi sono rivolti a esaminare l'efficacia delle legislazioni che proibiscono il TBT: Oliveira et al. (2009) hanno analizzato l'evoluzione spaziale e temporale dell'imposex in popolazioni di *N. lapillus* lungo le coste del Galles del nord, confrontando dati raccolti nel 2006 con dati dei 19 anni precedenti provenienti da altri studi condotti nella stessa area. I risultati hanno mostrato una netta ripresa delle popolazioni: ad Anglesey, ad esempio, è stata evidenziata una diminuzione del VDSI tra il 52 e l'83% dal 1987 al 2006. Tuttavia la predominanza nei tessuti di TBT rispetto a DBT e MBT ha dimostrato che input di TBT erano ancora presenti, probabilmente per il rilascio da parte di navi con antivegetativi al TBT applicati prima del 2003. Un analogo studio è stato condotto da Rato et al. (2009) su *Nassarius reticulatus* (= *H. reticulata*) lungo la costa portoghese, confrontando dati provenienti da campionamenti svolti negli anni 2000, 2003 e 2006: una riduzione significativa del VDSI è stata evidenziata tra il 2003 e il 2006, mentre la differenza dei livelli di imposex tra 2000 e 2003 non è risultata significativa. Questi risultati dimostrano l'efficacia del divieto di applicazione del TBT imposto dal Regolamento europeo 782/2003, anche se i livelli di imposex riscontrati in prossimità delle maggiori aree portuali (Viana do Castelo, Leixões, Peniche, Sesimbra, Setúbal, Sines e Portimão) appaiono ancora piuttosto elevati (VDSI > 4). Si attendono dunque gli effetti del bando totale della presenza del TBT sugli scafi, entrato in vigore nel settembre 2008, con la speranza di assistere alla definitiva scomparsa degli input di questo contaminante e alla progressiva ripresa delle popolazioni di gasteropodi affette da imposex.

LETTERATURA CITATA

Alzieu, C., 2000. Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology* 9, 71-76.

Bettin, C., Oehlmann, J., Stroben, E., 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgol Meeresunters* 50, 299-317.

Blaber, S.J.M., 1970. The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). *Proc Malac Soc Lond* 39, 231-233.

Castro, L.F.C., Lima, D., Machado, A., Melo, C., Hiromori, Y., Nishikawa, J., Nakanishi, T., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2007. Imposex induction is mediated through the retinoid X receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*. *Aquat Toxicol* 85, 57-66.

Feare, C.J., 1970. The reproductive cycle of the dog whelk (*Nucella lapillus*). *Proc Malacol Soc Lond* 39, 125-137.

Feral, C., LeGall, S., 1983. The influence of a pollutant factor (tributyltin) on the neuroendocrine mechanism responsible for the occurrence of a penis in the females of *Ocenebra erinacea*. In: *Molluscan neuro-endocrinology*, Lever, J., Boer, H., eds., North Holland Publishing Co., Amsterdam, 173–175.

Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Pascoe, P.L., Burt, G.R., 1987. The use of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J Mar Biol Assoc UK* 67, 507-523.

Gibbs, P.E., Pascoe, P.L., Burt, G.R., 1988. Sex change in the female dog-whelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. *J Mar Biol Assoc UK* 68, 715-731.

Gibbs, P.E., Bryan, G.W., 1996. Reproductive failure in the gastropod *Nucella lapillus* associated with imposex caused by tributyltin pollution: a review. In: *Organotin: Environmental Fate and Effects*, Champ, M.A., Seligman, P.F., eds., Chapman & Hall, London, 259-280.

Gooding, M.P., LeBlanc, G.A., 2001. Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Gen Comp Endocrinol* 122, 172-180.

Hoch, M., 2001. Organotin compounds in the environment – an overview. *Appl Geochem* 16, 719-743.

International Maritime Organisation (IMO), 2009. Summary of conventions as at

31 July 2009. <http://www.imo.org> (visitato il 30/08/2009).

Janer, G., LeBlanc, G.A., Porte, C., 2005. A comparative study on androgen metabolism in three invertebrate species. *Gen Comp Endocrinol* 143, 211-221.

Jenner, M.G., 1979. Pseudohermaphroditism in *Ilyanassa obsoleta*. *Science* 205, 1407-1409.

Lee, R.F., 1991. Metabolism of tributyltin by marine animals and possible linkages to effects. *Mar Environ Res* 32, 29-35.

Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ Toxicol Chem* 17, 37-43.

Morcillo, Y., Porte, C., 1999. Evidence of endocrine disruption in the imposex-affected gastropod *Bolinus brandaris*. *Environ Res* 81, 349-354.

Nishikawa, J-I., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraishi, F., Horiguchi, T., 2004. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environ Sci Technol* 38, 6271-6276.

Oberdörster, E., McClellan-Green, P., 2002. Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Mar Environ Res* 54, 715-718.

Oliveira, I.B., Richardson, C.A., Sousa, A.C., Takahashi, S., Tanabe, S., Barroso, C.M., 2009. Spatial and temporal evolution of imposex in dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) populations from North Wales, UK. *J Environ Monit* 11, 1462-1468.

Rato, M., Ferreira, N., Santos, J., Barroso, C., 2009. Temporal evolution of imposex in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast: the efficacy of EC regulation 782/2003. *J Environ Monit* 11, 100-107.

Ronis, M.J.J., Mason, A.Z., 1996. The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: effects of tributyltin. *Mar Environ Res* 42, 161-166.

Ruppert, E.E., Fox, R.S., Barnes R.D., 2004. Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach. 7th edition, Thomson Learning, Inc., 6^a edizione italiana a cura di Iovene, B., Sotgia, C., 2007, Piccin Nuova Libreria, Padova, 1098 pp.

Santillo, D., Johnston, P., Langston, W.J., 2002. Tributyltin (TBT) antifoulants: a tale of ships, snails and imposex. In: Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896-2000, Harremoës, P., Gee, D., MacGarvin, M., Stirling, A., Keys, J., Wynne, B., Guedes Vaz, S., eds., European Environmental Agency, Copenhagen, 135-148.

Santos, M.M., Reis-Henriques, M.A., Vieira, M.N., Sole, M., 2006. Triphenyltin and tributyltin, single and in combination, promote imposex in the gastropod *Bolinus brandaris*. *Ecotoxicol Environ Saf* 64, 155-162.

Smith, B.S., 1971. Sexuality of the American mud snail *Nassarius obsoletus* (Say). *Proc Malac Soc Lond* 39, 377-378.

Smith, B.S., 1981a. Reproductive anomalies in stenoglossan snails related to pollution from marinas. *J Appl Toxicol* 1, 15-21.

Smith, B.S., 1981b. Male characteristics on female mud snails caused by antifouling bottom paints. *J Appl Toxicol* 1, 22-25.

Smith, B.S., 1981c. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsoleta*. *J Appl Toxicol* 1, 141-144.

Spooner, N., Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Goad, L.J., 1991. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Mar Environ Res* 32, 37-49.

Sternberg, R.M., Hotchkiss, A.K., LeBlanc, G.A., 2008a. The contribution of steroidal androgens and estrogens to reproductive maturation of the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *Gen Comp Endocrinol* 156, 15-26.

Sternberg, R.M., Hotchkiss, A.K., LeBlanc, G.A., 2008b. Synchronized expression of the retinoid X receptor mRNA with reproductive tract recrudescence in an imposex-susceptible mollusc. *Environ Sci Technol* 42, 1345-1351.

Sternberg, R.M., Gooding, M.P., Hotchkiss A.K., LeBlanc, G.A., 2009. Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology*, doi:10.1007/s10646-009-0397-z, pubblicato on-line il 04 agosto 2009.

U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), 2003. Ambient aquatic life water criteria for tributyltin (TBT). EPA 822-R-03-031, 138 pp.