

Giuliano Bressa⁽¹⁾, Rossana Giombelli⁽²⁾, Marino Prearo⁽³⁾, Elena Bozzetta⁽³⁾, Elvio Sisti⁽⁴⁾,
Francesca Cima⁽⁵⁾

⁽¹⁾ENEL-CRAM S.p.A., Milano

⁽²⁾Dipartimento di Biologia, Università di Milano

⁽³⁾Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Torino

⁽⁴⁾Centro Studi Ambientali, Rimini

⁽⁵⁾Dipartimento di Biologia, Università di Padova

EFFETTI BIOLOGICI DEL TRIBUTILSTAGNO CLORURO (TBTC) IN CARPA (*CYPRINUS CARPIO* L.)

Introduzione

Negli ultimi decenni, lo sviluppo scientifico e tecnologico ha particolarmente favorito la produzione su scala industriale di una gamma sempre maggiore di nuove sostanze che non hanno alcun riscontro in natura. Nota e significativa è la sintesi dei composti organoclorurati, usati come insetticidi (DDT, eldrin, dieldrin, lindano, clordano, ecc.) che, pur essendo stati messi al bando da un ventennio, si riscontrano ancora ad elevate concentrazioni in organismi acquatici (Galassi *et al.*, 1994; Bressa *et al.*, 1995; 1996).

Un'altra categoria di xenobiotici, che ha recentemente suscitato un forte interesse a livello industriale, è rappresentata dai composti stannorganici. Essi vengono utilizzati come principi antivegetativi per legno, carta e tessuti, come fungicidi, molluschicidi e acaricidi ed infine come stabilizzatori del PVC e additivi in gomme al silicone (OMS, 1990). Con l'aumento del consumo di tali prodotti chimici nei vari settori di applicazione, sta crescendo nel mondo scientifico la preoccupazione per l'impatto ambientale, in particolar modo per quello acquatico, che ne conseguirebbe se impiegati su larga scala.

A tal fine ci si è proposti di studiare gli effetti biologici, in particolar modo quelli che coinvolgono il sistema immunitario di una specie ittica, la carpa (*Cyprinus carpio*), esposta ad un composto stannorganico (il tributilstagno cloruro o TBTC). Esso rappresenta il principio attivo di numerose vernici antivegetative impiegate per proteggere superfici immerse in acqua (scafi, tubature, reti, boe, ecc.) dall'attacco di alghe ed organismi in-

*I composti stannorganici vengono largamente impiegati come biocidi. In particolare, il tributilstagno cloruro (TBTC) viene usato per la preservazione del legno e come agente antivegetativo (antifouling) nelle vernici. Lo scopo di questa ricerca era di valutare l'assunzione del TBTC da parte della carpa (*Cyprinus carpio*) alimentata con pellet contaminato. È risultato all'esame istologico che il timo del pesce sottoposto a trattamento per 7 giorni con TBTC dimostrava atrofia con marcata deplezione linfocitaria. Si è osservata inoltre la presenza di TBTC e del suo metabolita DBTC nel rene, fegato, milza, timo e tessuto muscolare.*

vertebrati bentonici.

La carpa è specie ittica caratteristica di tutti i corpi d'acqua dolce europei. La sua regione di origine è quella che si estende dalla regione balcanica all'Asia orientale. Per le sue caratteristiche eurialine è presente anche in ambienti salmastri.

I composti stannorganici

I composti stannorganici costituiscono un gruppo piuttosto esteso di sostanze, nelle quali è presente almeno un legame tra un atomo di stagno e uno di carbonio (OMS, 1990). Nella maggioranza dei casi lo stagno è presente nello stato di ossidazione 4⁺. Si conoscono quattro serie di composti, la cui struttura può essere rappresentata con le seguenti formule generali: R₃Sn, R₃SnX, R₂SnX₂, RSnX₃, dove R rappresenta un gruppo alchile o fenile, mentre X è solitamente unione, quale ad esempio OH⁻, F⁻, COO⁻ o Cl⁻.

Questi composti sono caratterizzati da una scarsa solubilità in acqua, mentre sono solubili nei solventi organici e nei grassi avendo un coefficiente di partizione ottanolacqua di circa 6.000 (Laughlin *et al.*, 1986), e quindi possono trasfe-

rirsi agevolmente lungo gli anelli delle catene alimentari, costituendo un rischio anche per la salute umana (Bressa e Cima, 1986). Indagini effettuate in questi ultimi anni in corpi d'acqua e/o in sedimenti di aree ad elevata attività marittima (Maguire, 1987; Bacci e Gaggi, 1989; Di Cinto, 1989; Fytianos e Somanidou, 1990; Wong, 1991; Wuertz *et al.*, 1991; Ritsema, 1994; Sarradin *et al.*, 1994) hanno evidenziato la presenza di composti stannorganici, a volte anche a concentrazioni tali da provocare effetti deleteri sulla biocenosi marina (Alzieu *et al.*, 1986; Waldock *et al.*, 1987; Bailey e Davies, 1988; Bryan e Gibbs, 1991; Huang *et al.*, 1993; Kure e Depledge, 1994). In particolar modo, i derivati tributilici e trifenilici dello stagno, rivelano un'alta tossicità nei confronti di organismi marini ed è per questo che vengono aggiunti alle vernici antivegetative (Nichols, 1988; Huggett *et al.*, 1992).

Differenti meccanismi di azione sono stati proposti per spiegare gli effetti biologici e la tossicità del TBTO e di altri composti stannorganici (Aldridge, 1986). Sembra che l'azione principale sia quella di inibire la fosforilazione ossidativa mitocondriale e di agire quindi sui processi energetici fondamentali dei sistemi cellulari (Costa, 1985; Gray *et al.*, 1987; Fent e Bucheli, 1994). Inoltre essi inibiscono anche la sintesi proteica, formando legami di coordinazione con gli aminoacidi (Costa e Sulaiman, 1986). Recenti indagini (Chikahisa e Oyama, 1992) hanno pure evidenziato che i TBT provocano un aumento della concentrazione dello ione calcio (Ca²⁺) all'interno delle cellule, attivando meccanismi citotossici

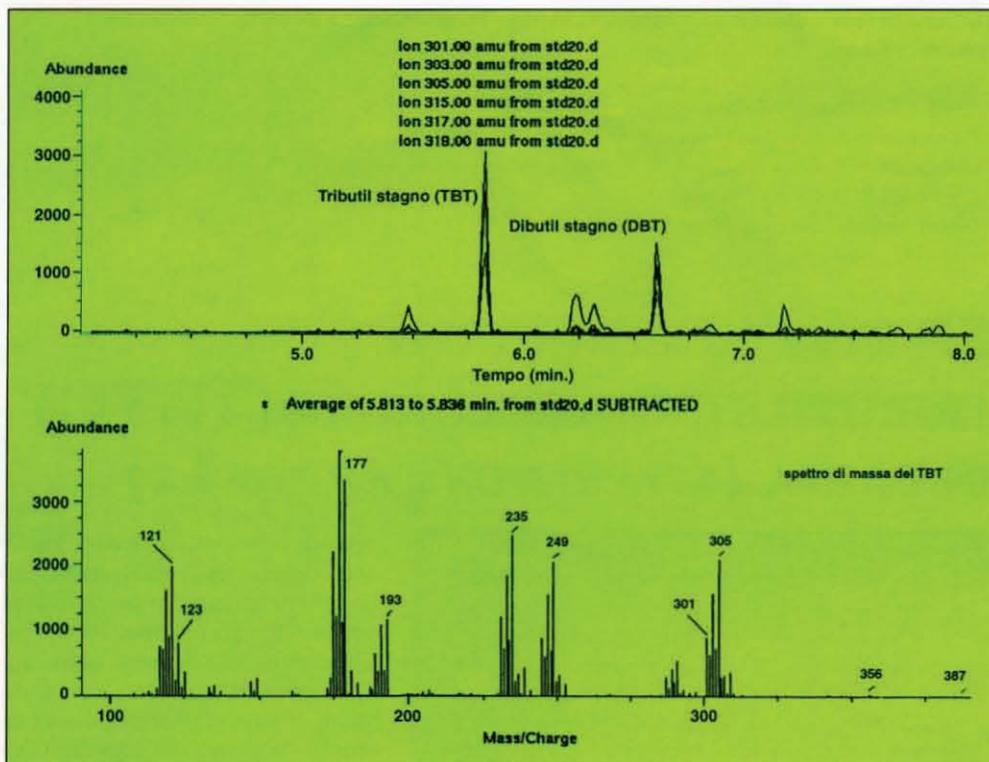


Fig. 1 - Cromatogramma ricostruito mediante HRGC/MS per l'identificazione e la quantificazione di TBT e DBT di un estratto di fegato di carpe trattate con TBTC.

che conducono a danni irreversibili delle cellule (Orrenius *et al.*, 1992).

Per alcuni composti di- e tri-alcilici dello stagno, è stata osservata e documentata un'azione immunotossica selettiva in animali da laboratorio (Penninks e Seinen, 1983; Snoeij *et al.*, 1987; Bressa *et al.*, 1991; Bhatia e Kaur, 1993). È stato infatti riscontrato che somministrati con la dieta, essi inducono nel ratto atrofia a livello della corteccia del timo, una deplezione delle cellule T e sopprimono varie funzioni immunitarie (Snoeij *et al.*, 1988; Raffray e Cohen, 1993; Pieters *et al.*, 1994).

Infine studi condotti *in vitro* riguardo agli effetti del tributilstagno cloruro (TBTC), dibutilstagno cloruro (DBTC) e monobutilstagno cloruro (MBTC) su tunicati (*Botryllus schlosseri*) hanno evidenziato una riduzione significativa della fagocitosi ed una inibizione dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi (Cima *et al.*, 1995).

Si può ritenere quindi che i composti tri-alcilici dello stagno possano considerarsi fra gli xenobiotici più tossici deliberatamente introdotti nell'ambiente. Per tale motivo la Francia, soprattutto a causa delle proteste da parte degli allevatori di molluschi, ha bandito l'uso di vernici a base di stannorganici già dal 1982. Da allora l'impiego di vernici antivegetative con-

tenenti TBT per imbarcazioni fino a 25 m è diventato illegale. In Inghilterra invece l'impiego di vernici antivegetative a base di TBT è consentito solo se esse ne contengono meno di 20 ng kg⁻¹. Inoltre dal 1987 il Governo ha stabilito che tutti i nuovi prodotti antifouling dovranno essere inseriti nella regolamentazione dei pesticidi sotto il controllo della Food and Environment Protection Act. La causa del ritardo in campo legislativo in molti Paesi, tra cui l'Italia, è da ricercare probabilmente nel fatto che non esistono sostituti ai TBT per i rivestimenti antivegetativi e una proibizione del loro uso comporterebbe problemi economici seri: navi, sottomarini, piattaforme da altura, strumenti oceanografici, boe, ecc., sono tutte soggette all'attacco di organismi incrostanti. La marina militare americana ad esempio ha calcolato, nel caso venissero abolite le vernici antifouling, un costo aggiuntivo annuo di oltre 180 milioni di dollari per carburante in più richiesto per vincere l'attrito aggiuntivo causato dall'insediamento degli organismi bentonici sugli scafi della flotta (Simmonds, 1986).

Materiali e metodi

Sperimentazione

Sono state pescate 20 carpe del peso di circa 0,5 kg da un lotto di 200 da uno stagno presso l'Impianto

Sperimentale di Acquacoltura Termica presso la Centrale Termoelettrica ENEL "La Casella", Sarmato (PC). Dopo la biometria, sono state divise in 2 gruppi di 10 (uno di controllo e l'altro sottoposto a sperimentazione) ed immerse in 2 vasche di PVC (1x1 m), con flusso d'acqua di 4 l min⁻¹ e temperatura di 21 ± 1 °C. Per tutto il periodo di sperimentazione i pesci sono stati alimentati con mangime (pellet umido) pari all'1,5 % del peso vivo in continuo per 12 ore al giorno mediante distributori automatici. Il TBTC (Aldrich Chemical Co. Ltd, UK) è stato aggiunto ad una partita di mangime alla concentrazione di 100 mg kg⁻¹ durante la fase di preparazione del pellet emulsionandolo, date le sue proprietà lipofile, con olio di fegato di merluzzo. Dopo sette giorni di sperimentazione, sono stati sacrificati 5 esemplari per vasca, mentre per i rimanenti si è proceduto alla somministrazione del mangime per un'altra settimana. Le carpe sono state biometrizzate e successivamente si è proceduto alla dissezione e al prelievo di fegato, reni, milza, timo e parte di tessuto muscolare dorsale per l'esame chimico e istologico.

La concentrazione di 100 mg kg⁻¹ di TBTC è stata adottata per tale esperimento in base ai risultati significativi ottenuti precedentemente in una ricerca effettuata in laboratorio sul ratto (Bressa *et al.*, 1991).

Analisi GC/MS

I campioni di organi e tessuti sono stati omogeneizzati mediante un mixer e poi liofilizzati. Successivamente sono stati prelevati circa 5 g, cui erano aggiunti 1 ml di acqua distillata, 5 g di Extrelut (polvere di diatomee purificate) e 20 ml di *n*-esano, e tenuti per 5 min in un bagno ad ultrasuoni; l'estratto veniva poi purificato facendolo passare attraverso una colonna cromatografica (LC18 Supelco, Bellefonte, PA, USA). L'eluato era poi portato a secco mediante un evaporatore rotante in presenza di un flusso di azoto a temperatura ambiente ed infine ripreso con 500 µl di *n*-esano.

La derivatizzazione veniva effettuata con l'aggiunta del reattivo di Grignard (bromuro di pentilmagnesio in etere etilico) eliminandone l'eccesso con l'aggiunta di alcune gocce di acqua distillata e 10 ml di

acido solforico 1 M (Caricchia *et al.*, 1994). La fase organica veniva infine concentrata in flusso di azoto e portata a volume finale di 100 μ l. La determinazione degli stannorganici è stata effettuata mediante abbinamento della gascromatografia ad alta risoluzione con spettrometria di massa (HRGC/MS). Il gas cromatografo HP 5890 serie II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) era dotato di colonna capillare (Alltech SE 30 m x 0,25 mm); la temperatura dell'iniettore era 260 °C, quella della colonna era invece fissata con un'isoterma iniziale di 120 °C programmata per un incremento di 10 °C min^{-1} sino a 280 °C, e come gas di trasporto è stato utilizzato l'elio con una velo-

cità lineare in colonna di 25 cm^{-1} . Per l'analisi sono stati iniettati 2 μ l di campione.

Come rivelatore è stato utilizzato uno spettrometro di massa quadrupolare HP 5989 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) con le seguenti condizioni operative: energia elettronica 70 eV, temperatura alla sorgente 200 °C ed elettromoltiplicatore 2.200 V. Lo strumento è stato impiegato seguendo la tecnica SIM ("selected ions monitoring"), cioè in selezione degli ioni più caratteristici e significativi derivati dall'analisi degli standard: m/z 301, 303, 305 per i TBTC; m/z 315, 317, 319 per i DBT (Meinema *et al.*, 1978).

Per verificare la validità del meto-

ore. Successivamente i preparati venivano disidratati con alcol etilico a diverse concentrazioni, impregnati di paraffina e sezionati (8-10 μ m di spessore) mediante un microtomo. Infine i preparati istologici sono stati colorati con ematosilina-eosina (Pearse, 1972).

Risultati e discussione

GC/MS

I risultati ottenuti dall'esperimento sono riportati nelle figure 2-6. Come si può osservare, già dopo la prima settimana di somministrazione di TBTC, le carpe dimostravano di accumulare quantità molto elevate, (timo 21,18 mg kg^{-1} e rene 21,12 mg kg^{-1}). Ciò denota come queste sostanze, proprio grazie alle loro proprietà lipofile, siano facilmente assorbite dal pesce.

Oltre all'accumulo di TBTC negli organi e tessuti si è osservata la presenza di un metabolita, il dibutilstagno cloruro (DBTC), probabilmente derivato dal processo di dealchilazione a livello epatico, descritto esaurientemente in letteratura da Aldridge (1986), in particolar modo per quanto riguarda i mammiferi. Tuttavia nella prima settimana i livelli di DBTC erano molto bassi (< 1 mg kg^{-1}) in tutti gli organi e tessuti analizzati, mentre nella seconda settimana aumentavano notevolmente, soprattutto nel rene e nel fegato. Ciò è attribuibile all'attivazione del sistema microsomiale epatico che metabolizza il TBTC in DBTC.

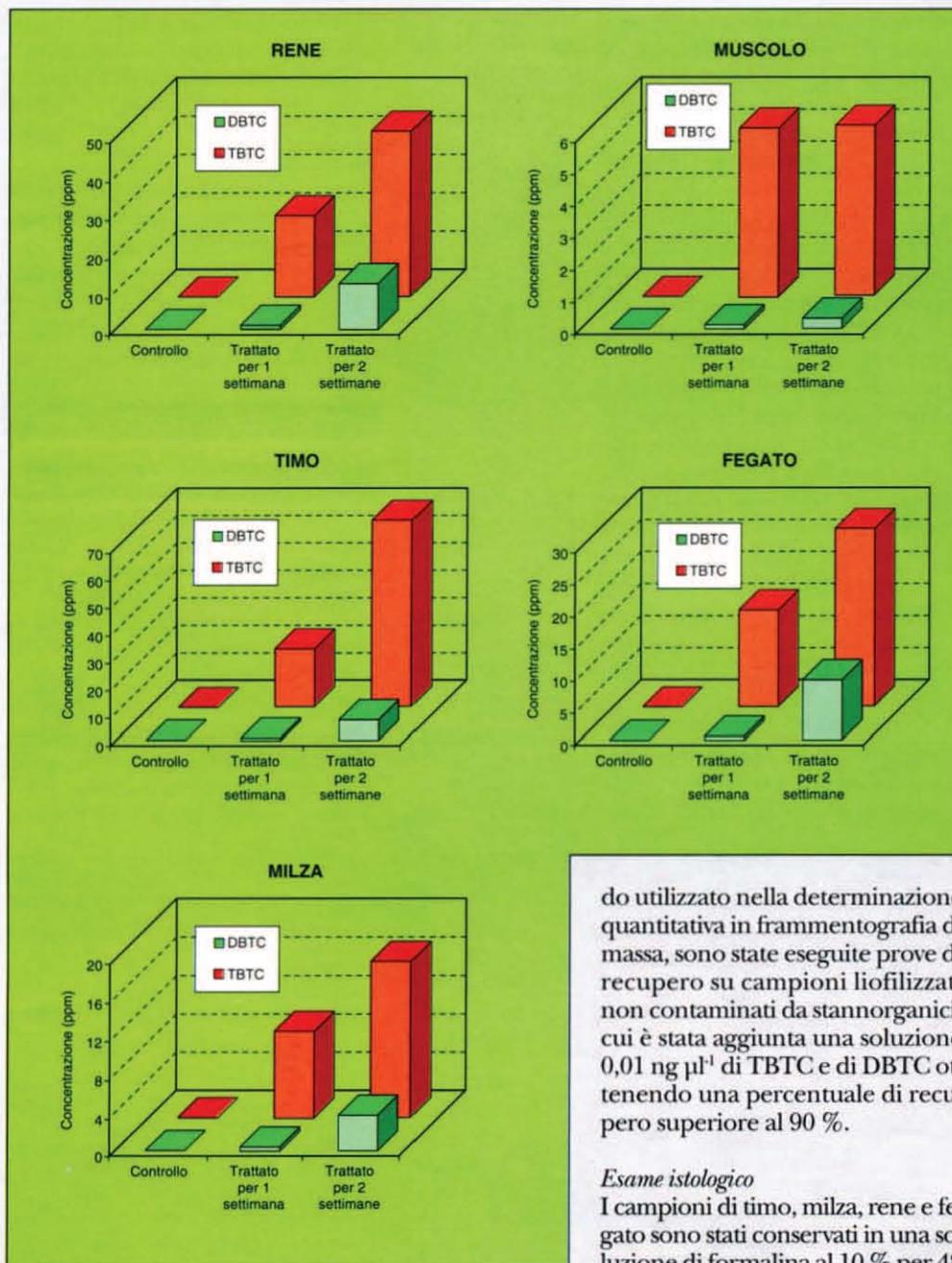
Inoltre, come si può osservare dai grafici, il timo è l'organo in cui maggiormente si accumula il TBTC e, quindi, può essere considerato l'"organo-bersaglio". Invece, per quanto riguarda il tessuto muscolare, cioè la parte edibile del pesce, i livelli di TBTC e DBTC riscontrati erano inferiori rispettivamente a 6 mg kg^{-1} e 0,30 mg kg^{-1} e non si è osservata variazione apprezzabile tra i due diversi periodi di sperimentazione.

Esame istologico

Già dopo una settimana di esposizione al TBTC, i pesci mostravano a livello degli organi linfoidi, in particolare nel timo e nella milza, una prevalente soppressione di linfociti e linfoblasti.

Il timo presentava una deplezione linfocitaria con conseguente atrofia ed infiltrazione di tessuto adi-

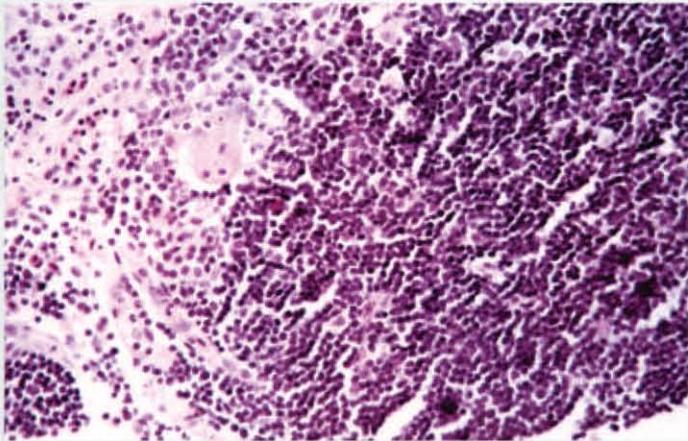
Figg. 2-6
Accumulo di
TBTC e DBTC nel
rene dopo 1 e 2
settimane di
somministrazione di
TBTC (100 mg/kg
di mangime).



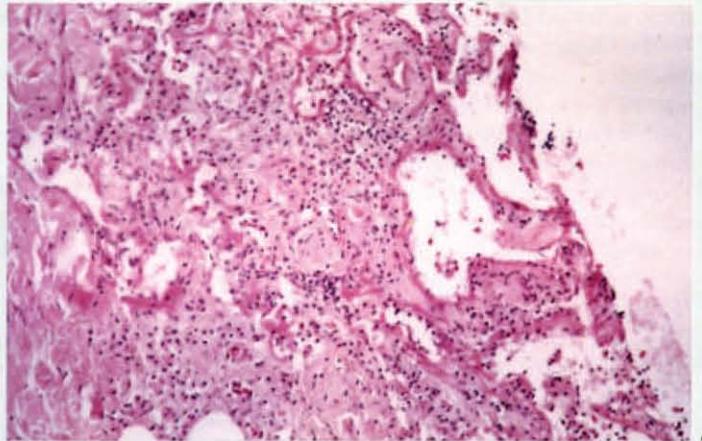
do utilizzato nella determinazione quantitativa in frammentografia di massa, sono state eseguite prove di recupero su campioni liofilizzati non contaminati da stannorganici, cui è stata aggiunta una soluzione 0,01 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ di TBTC e di DBTC ottenendo una percentuale di recupero superiore al 90 %.

Esame istologico

I campioni di timo, milza, rene e fegato sono stati conservati in una soluzione di formalina al 10 % per 48



7



8

poso (Figg. 7-8).

Per quanto riguarda la milza, dal confronto fra il quadro istologico riscontrato nei pesci di controllo (Fig. 9) e di quelli trattati (Fig. 10), si è notata preponderanza di elementi della polpa rossa dovuta alla scomparsa dei linfociti splenici, mentre non si è osservata alcuna anomalia del tessuto renale ed epatico.

Conclusioni

La ricerca ha messo in evidenza, come già osservato nel ratto (Bressa *et al.*, 1991), che esiste un diverso accumulo nella carpa di TBTC somministrato mediante mangime. Gli organi prevalentemente interessati sono il rene, il fegato, e in minor misura la milza, come evidenziato da altre indagini in cui i pesci erano stati esposti per 15 giorni in acqua contaminata da DBTC alla concentrazione di 1 µg ml⁻¹ (Tsuda *et al.*, 1988).

Per quanto riguarda l'identificazione dei metaboliti, è stata osservata la presenza di DBTC solo nella seconda settimana e in particolare nel fegato e nel rene, ma non si è rilevata la presenza di monobutilstagno cloruro (MBTC). Se ne deduce comunque che è necessario

un periodo più lungo affinché si attivi efficacemente il processo di deacilazione del DBTC a livello epatico.

D'altro canto, si sono osservati già dalla prima settimana alte concentrazioni nel timo sia di TBTC che di DBTC, che sono la probabile causa dell'effetto immunosoppressivo che si manifesta con una marcata deplezione degli elementi linfoidi. Ciò potrebbe essere correlabile all'aumento di patologie e malformazioni osservate tra gli organismi acquatici che vivono in aree pesantemente contaminate da composti stannorganici (De Vries *et al.*, 1991; Lee, 1991; Horiguchi *et al.*, 1994; Semlitsch *et al.*, 1995; Wu, 1995).

In conclusione, visti i rischi reali e potenziali associati a questo tipo di inquinamento, si rendono utili alcune raccomandazioni per la salvaguardia dell'ambiente acquatico:

- a) devono essere perfezionate le tecniche analitiche di indagine ambientale per avere accurate determinazioni delle concentrazioni di TBT presenti nell'ambiente;
- b) devono essere avviati programmi di monitoraggio ambientale, specialmente dove maggiore è il movimento di imbarcazioni, al-

Fig. 7 - Sezione di timo di carpa non trattata (400x).

Fig. 8 - Sezione di timo di carpa dopo 1 settimana di trattamento con 100 mg kg⁻¹ TBTC. Si osserva una marcata deplezione di linfociti T (200x).

Fig. 9 - Sezione di milza di carpa non trattata (200x).

Fig. 10 - Sezione di milza di carpa dopo 1 settimana di trattamento con 100 mg kg⁻¹ TBTC. Si osserva un aumento della polpa rossa con diminuzione di linfociti (200x).

lo scopo di evidenziare eventuali concentrazioni tossiche di stannorganici che potrebbero ledere la vita degli organismi acquatici;

- c) devono essere avviate ricerche finalizzate alla produzione di prodotti sostitutivi dei TBT che siano innocui.

Ringraziamenti

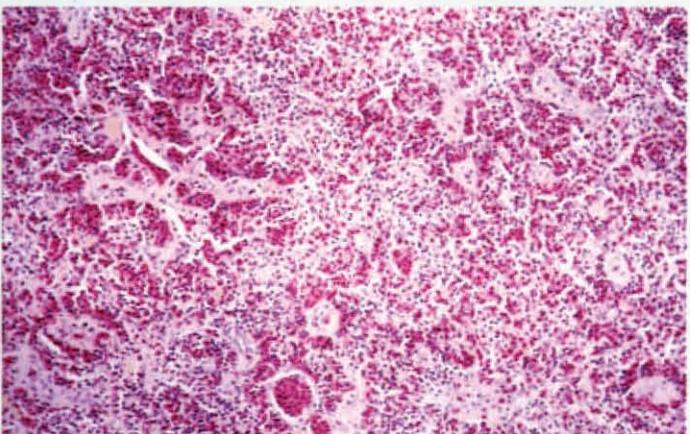
Gli autori desiderano esprimere il proprio ringraziamento ai Sigg. F. Carmignato e P. Romano del Centro Ricerca Ambientale e Materiali dell'ENEL di Milano, il Dr. P. Fonti e la Sig.ra L. Macchini per la fattiva collaborazione alla ricerca.

Ricevuto il 27-03-1996

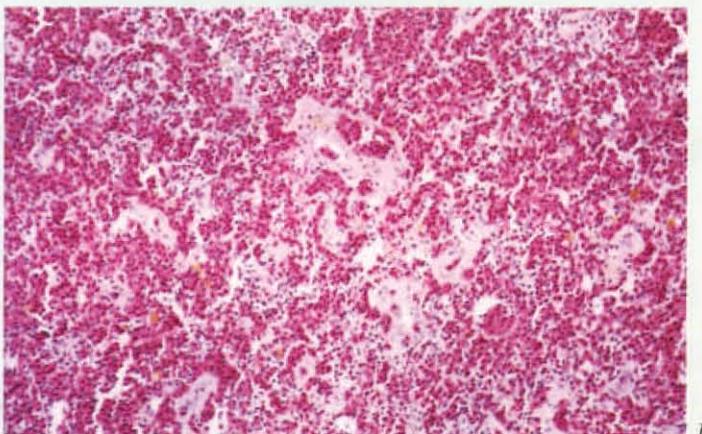
Accettato il 24-06-1996

Bibliografia

Aldridge, W. 1986. *The Toxicology and Biological Properties of Organotin Compounds*. CRC Press, Orlando, Florida, USA: 373.
 Alzieu, C., J. Sanjuan, J.P. Deltreil and M. Borel. 1986. Tin contamination in Arcachon Bay: effects on oyster shell anomalies. *Mar Pollut. Bull.*, 17: 494-498.



9



10

- Bacci, E. and C. Gaggi. 1989. Organotin compounds in harbour and marine waters from the Northern Tyrrhenian Sea. *Mar. Pollut. Bull.*, 20: 290-292.
- Bailey, S.K. and I.M. Davies. 1988. Tributyltin contamination in the firth of Forth (1975-1987). *Sci. Total Environ.*, 76: 185-192.
- Bhatia, A. and J. Kaur. 1993. Recent advances in immunomodulatory effects of some chemical pollutants. *Intern. J. Environ. Studies*, 45: 61-70.
- Bressa, G. e L. Cima. 1986. Contaminazione ambientale da stannorganici: quali rischi? *Inquinamento*, 9: 52-55.
- Bressa, G., R.H. Hinton, S.C. Price, M. Isbur, R.S. Ahmed and P. Grasso. 1991. Immunotoxicity of tri-*n*-butyltin oxide (TBTO) and tri-*n*-butyltin chloride (TBTC) in the rat. *J. Appl. Toxicol.*, 11: 397-402.
- Bressa, G., P. Bronzi, P. Romano and E. Sisti. 1995. Chlorinated pesticides and PCBs in wild and farmed eels (*Anguilla anguilla* L.): influence of water temperature and diet. *Agro-Food-Industr. Hi-Tech.*, 11: 46-48.
- Bressa, G., P. Bronzi, P. Romano, F. Carmignato, M. Dorini and E. Sisti. 1996. Chlorinated pesticides and PCB content in thermal aquaculture of sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Food Additives & Contaminants*. (in press).
- Bryan, G.W. and P.E. Gibbs. 1991. Impact of low concentrations of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review. In: M.C. Newman and A.W. McIntosh (Eds.). *Metal Ecotoxicology*. Lewis Publ. Inc., Chelsea, Michigan, USA: 323-361.
- Caricchia, A.M., S. Chiavarini, C. Cremisini, R. Morabito and C. Ubaldi. 1994. Analytical methods for the determination of organotins in the marine environment. *Intern. J. Anal. Chem.*, 53: 37-52.
- Chikahisa, L. and Y. Oyama. 1992. Tri-*n*-butyltin increases intracellular Ca²⁺ in mouse thymocytes: a flow-cytometric study using fluorescent dyes for membrane potential and intracellular Ca²⁺. *Pharmacol. & Toxicol.*, 71: 190-195.
- Cima, F., L. Ballarin, G. Bressa and A. Sabbadin. 1995. Immunotoxicity of butyltins in Tunicates. *Appl. Organomet. Chem.*, 9: 567-572.
- Costa, L.G. 1985. Inhibition of aminobutyric acid uptake by organotin compounds *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 79: 471-476.
- Costa, L.G. and R. Sulaiman. 1986. Inhibition of protein synthesis by trimethyltin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 86: 321-329.
- De Vries, H., A.H. Penninks, N.J. Snoeij and W. Seinen. 1991. Comparative toxicity of organotin compounds to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) yolk-sac fry. *Sci. Total Environ.*, 103: 229-243.
- Di Cinto, M. 1989. Composti organo-metallici dello stagno nello specchio d'acqua antistante la città di Genova. *Inquinamento*, 2: 64-67.
- Fent, K. and T. Bucheli. 1994. Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins *in vitro* in freshwater fish. *Aquat. Toxicol.*, 28: 107-126.
- Fytianos, K. and R. Somanidou. 1990. Determination of trace quantities of organotin compounds in coastal water of Greece by graphite furnace. A.S.S. *Sci. Total Environ.*, 92: 265-268.
- Galassi, S., L. Guzzella, M. Battegazzo and A. Carrieri. 1994. Biomagnification of PCBs, *p,p'*-DDE and HCB in the river Po ecosystem (Northern Italy). *Ecotox. Environ. Safety*, 29: 174-186.
- Gray, B.H., M. Porvaznik, M.A. Flemming and L. Lee. 1987. Tri-*n*-butyltin: a membrane toxicant. *Toxicology*, 47: 35-54.
- Horiguchi, T., H. Shiraishi, M. Shimizu and M. Morita. 1994. Imposed and organotin compounds in *Thais-clavigera* and *T. bronni* in Japan. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 74(3): 651-669.
- Huang, G., Z. Bai, S. Dai and Q. Xie. 1993. Accumulation and toxic effect of organometallic compounds on algae. *Appl. Organomet. Chem.*, 7: 373-380.
- Huggett, R.J., M.A. Unger, P.F. Seligman and A.O. Valkirs. 1992. The marine biocide tributyltin. *Environ. Sci. Technol.*, 26(2): 232-237.
- Kure, L.K. and M.H. Depledge. 1994. Accumulation of organotin in *Littorina littorea* and *Mya arenaria* from Danish coastal waters. *Environ. Pollut.*, 84: 149-157.
- Laughlin, R.B., H.E. Guard and W.H. Coleman. 1986. Tributyltin in seawater - speciation and octanol-water partition coefficient. *Environ. Sci. Technol.*, 20: 201-204.
- Lee, R.F. 1991. Metabolism of tributyltin by marine animals and possible linkages to effects. *Mar. Environ. Res.*, 32(1-4): 29-35.
- Maguire, R.S. 1987. Environmental aspects of tributyltin. *Appl. Organomet. Chem.*, 1: 475-498.
- Meinema, H.A., T. Wiersma, G. DeHaan and E. Gevers. 1978. Determination of trace amounts of butyltin compounds in aqueous systems by gas chromatography/mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 12(3): 288-293.
- Nichols, J.A. 1988. Antifouling paints: use on boats in San Diego bay and a way to minimize adverse impacts. *Environ. Manag.*, 12: 243-247.
- OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità). 1990. *Tin and Organotin Compounds*. OMS, Geneva, Vol. 116: 273 pp.
- Orrenius, S., M.J. McCabe and P. Nicoitera. 1992. Ca²⁺-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol. Lett.*, 64/65: 357-364.
- Pearse, A.G.E. 1972. *Histochemistry Theoretical and Applied*. J. & A. Churchill, London: 458 pp.
- Penninks, A.H. and W. Seinen. 1983. Immunotoxicity of organotin compounds. In: G. Gibson, R. Hubbard and D.V. Parke (Eds.). *Immunotoxicology*. Academic Press, London: 427-436.
- Pieters R.H.H., Marianne B., Willem S. e Penninks A.H., 1994. Cellular and molecular aspects of organotin-induced thymus atrophy. *Human Exp. Toxicol.*, 13: 876-879.
- Raffray, M. and G.M. Cohen. 1993. Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy *in vivo*. *Arch. Toxicol.*, 67: 231-236.
- Ritsema, R. 1994. Dissolved butyltins in marine waters of The Netherlands three years after the ban. *Appl. Organomet. Chem.*, 8: 5-10.
- Sarradin, P.M., A. Astruc, R. Sabrier and M. Astruc. 1994. Survey of butyltin compounds in Arcachon bay sediments. *Mar. Pollut. Bull.*, 28(10): 621-628.
- Semlitsch, R.D., M. Foglia, A. Mueller, I. Steiner, E. Fioramonti and K. Fent. 1995. Short-term exposure to triphenyltin affects the swimming and feeding behavior of tadpoles. *Environ. Toxicol. & Chem.*, 14(8): 1419-1423.
- Simmonds, M. 1986. The case against tributyltin. *Oryx*, 20(4): 217-220.
- Snoeij, N.J., A.H. Penninks and W. Seinen. 1987. Biological activity of organotin compounds - an overview. *Environ. Res.*, 44: 335-353.
- Snoeij, N.J., A.H. Penninks and W. Seinen. 1988. Dibutyltin and tributyltin compounds induce thymus atrophy in rats due to a selective action on thymic lymphoblasts. *Int. J. Immunopharmacol.*, 10: 891-899.
- Tsuda, T., H. Nakanishi, S. Aoki and J. Takebayashi. 1988. Bioconcentration and metabolism of butyltin compounds in carp. *Water Res.*, 22: 647-651.
- Waldock, M.J., M.E. Waite and J.E. Thain. 1987. Changes in concentrations of organotin in U.K. rivers and estuaries following legislation in 1986. *Proc. Int. Conf. Organotin Symposium*. Halifax, Canada, 28 September '87: 34-38.
- Wong, L.M. 1991. Tributyltin antifoulings: a threat to the Hong Kong marine environment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20: 299-304.
- Wu, R.S. 1995. The environmental impact of marine fish culture. Towards a sustainable future. *Mar. Pollut. Bull.*, 31(4-12): 159-166.
- Wuertz, S., M.E. Miller, M.M. Dolittle, J.F. Brennan and J.J. Cooney. 1991. Butyltins in estuarine sediments two years after tributyltin use was restricted. *Chemosphere*, 22: 1113-1120.