

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLE NEOPLASIE EPATICHE NEI PESCI D'ALLEVAMENTO

CARAMELLI M., BOZZETTA E., PREARO M.,
BISSO M.C., ROTILI F. (*), GHITTINO C.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (TO)
(* - Medico Veterinario, S.M.A. Srl, Monticelli di Esperia (FR).

RIASSUNTO

La patologia neoplastica più frequentemente descritta nei pesci è sicuramente quella relativa ai tumori epatici, la cui comparsa appare fondamentalmente legata a fattori ambientali e dietetici. A tal proposito, presso le più rappresentative piscicoltura italiane è stata condotta un'indagine sia sulle specie dulciacquicole che marine: reperti riferibili a neoplasie epatiche sono stati riscontrati esclusivamente in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e branzino (*Dicentrarchus labrax*).

L'epatoma della trota iridea, inteso come complesso di lesioni proliferative comprendenti quadri pre-neoplastici e neoplastici, è risultato essere un reperto a bassa prevalenza, a conferma di quanto riportato in bibliografia. Di un certo interesse è stato il riscontro di tale patologia, con elevata frequenza e presenza di quadri ad evoluzione maligna, in due popolazioni di un allevamento dell'Italia nord-occidentale.

Casi di colangioma e colangiocarcinoma sono invece stati osservati in riproduttori di branzino allevati presso una stazione di riproduzione artificiale della Costa Tirrenica.

SUMMARY

The most frequently described neoplastic pathologies in fish are hepatic tumors, whose occurrence seem to be basically linked to environmental and dietetic factors. To confirm this, a survey in the most representative Italian fishfarms was carried out on both cultured freshwater and marine fish: hepatic neoplasia were recognized only in rainbow trout (*Oncorhynchus*

mykiss) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*).

Rainbow trout hepatoma, considered as a complex of proliferative lesions, comprising preneoplastic and neoplastic features, was found to be a low prevalence finding, confirming what referred in bibliography. Of some interest is the report of this pathology, with a high occurrence and presence of lesions with malignant evolution, in two stocks from a troutfarm of North-Western Italy.

On the contrary, cases of cholangioma and cholangiocarcinoma were first observed in European seabass broodstock, reared by an artificial reproduction station on the Tyrrhenian Coast.

INTRODUZIONE

Le neoplasie nei pesci rappresentano una patologia a carattere sporadico, la cui comparsa è generalmente correlata a fattori di tipo ambientale e nutrizionale. I tumori di origine epiteliale risultano essere i più frequenti, in relazione alla maggiore esposizione di questa componente tissutale all'insulto di tali fattori (Roberts, 1989).

Le neoplasie epatiche rappresentano le più importanti forme tumorali nei pesci allevati e sono state ampiamente descritte in diverse specie ittiche: *Parophrys vetulus* (Myers et al., 1987; Stehr e Myers, 1990), *Pseudopleuronectes americanus* (Murchelano e Wolke, 1991), *Oncorhynchus mykiss* (Hueper e Payne, 1961; Hendricks et al., 1984; Ghittino P., 1985; Prearo et al., 1994), *Salvelinus fontinalis* (Ghittino P., 1985), *Morone americanus* (May et al., 1987), *Cyprinodon variegatus* (Couch e Courtney, 1987). Sperimentalmente è stato possibile indurre tali neoplasie anche in *Oncorhynchus kisutch* ed *Ictalurus melas* (Ghittino P., 1970).

E' ormai accertato che i pesci prelevati da acque inquinate presentano una grande varietà di lesioni pre- e neoplastiche. Prima del 1965 risultavano estremamente rare le segnalazioni di neoplasie nei pesci delle acque libere (Masahito et al., 1988) ed attualmente vi sono ancora scarsissimi dati sul comportamento biologico e sul decorso clinico dei tumori nei pesci (Myers et al., 1990).

Con il termine di "epatoma" è consuetudine definire ogni stato patologico del parenchima epatico, a partire dalla degenerazione vacuolare, alla necrosi, fino ai veri e propri quadri tumorali (Ghittino P., 1985). In seguito al reperto di quadri di "epatoma" nell'ambito di una popolazione di trote iridea allevate presso un impianto dell'Italia settentrionale, aventi una prevalenza

assai più elevata rispetto alla norma (Prearo et al., 1994), si è ritenuto utile effettuare ricerche più approfondite sulle neoplasie epatiche delle specie ittiche allevate nel nostro Paese, correlandole, per quanto possibile, ad alcuni aspetti eziopatogenetici.

MATERIALI E METODI

I campionamenti sono stati eseguiti nell'ambito di diverse specie ittiche, in soggetti di età e pezzatura diversa, in 32 allevamenti distribuiti sul territorio nazionale, durante il periodo autunno 1992 - autunno 1994.

La specie maggiormente studiata è stata la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), con monitoraggi presso 23 allevamenti variamente distribuiti sul territorio nazionale, includendo impianti di grandi e piccole dimensioni, aventi caratteristiche di conduzione diverse, ubicati su distinti bacini idrografici. Si è poi ritenuto opportuno effettuare prelievi in allevamenti dove si utilizzano tipi di alimentazione differenziale (mangimi commerciali, mangimi aziendali, diete miste con mangime commerciale integrato da scarti della lavorazione del pesce). In particolare sono state prese in considerazione 3 troteculture in Piemonte, 5 in Lombardia, 2 in Trentino Alto Adige, 3 in Veneto, 3 in Friuli Venezia Giulia, 1 in Toscana, 2 in Umbria, 1 nelle Marche, 1 nel Lazio e 2 in Abruzzo.

Altro salmonide costantemente monitorato è stato la trota fario (*Salmo trutta*) con prelievi routinari presso un singolo allevamento del Piemonte; la maggiore selvaticità della specie ed il principale utilizzo per i ripopolamenti infatti, fanno sì che questa trota sia allevata in misura decisamente minore rispetto all'iridea.

Tra le specie dulciacquicole, è stata inoltre monitorata l'anguilla europea (*Anguilla anguilla*) in 3 allevamenti distribuiti in Piemonte, Lombardia e Veneto; per quest'ultima, come del resto per quasi tutte le specie studiate, si è proceduto a prelievi epatici ogni qual volta i campioni pervenivano al Centro per lo Studio delle Malattie dei Pesci dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta di Torino per le normali indagini di laboratorio.

Anche il branzino o spigola (*Dicentrarchus labrax*) e l'orata (*Sparus aurata*) sono stati oggetto di studio, con campioni provenienti essenzialmente dall'Italia centro-meridionale e più precisamente da 2 allevamenti in Toscana, 1 nel Lazio, 2 in Puglia ed 1 in Sicilia.

Prelievi epatici sono infine stati eseguiti in altri pesci, anche se non con la

necessaria regolarità: pescegatto (*Ictalurus melas*), carpa (*Cyprinus carpio*), salmerino (*Salvelinus fontinalis*), storione bianco (*Acipenser transmontanus*).

Dopo l'esame anatomopatologico, sezioni di tessuto epatico sono state fissate in formalina tamponata al 10%, incluse in paraffina e colorate con Ematossilina Eosina, PAS, Sudan III.

Sono state inoltre condotte analisi sulla composizione dei mangimi, per la determinazione di umidità, ceneri, protidi greggi, lipidi greggi, estrattivi inazotati. Sono stati valutati anche il grado di perossidazione e di acidità dei grassi della razione (tramite metodo NGD C35-1976 ed NGD C10-1976), la concentrazione di metionina (mediante idrolisi acida e valutazione del titolo con l'Aminoacid Analyzer), nonché la concentrazione di vitamina C (tramite analisi cromatografica liquida ad alta risoluzione con metodica di Felton). Inoltre si è proceduto a rilevare l'eventuale presenza di aflatossine, con metodica cromatografica tramite la tecnica ELISA (sensibilità di 5 ppb).

La presenza della vitamina C è stata ricercata anche a livello epatico, prelevando fegati da individui a digiuno e trattandoli con acido metafosforico al 2%, in rapporto di 1 gr/10 cc; il campione ha subito successivamente una omogeneizzazione per circa 30", in condizioni di oscurità ed a bassa temperatura ed una centrifugazione a 12.000 rpm a 4° C; il surnatante ottenuto è stato poi filtrato (filtri di 0,45 µ), valutando il titolo di ascorbato presente, mediante HPLC con metodica di Felton.

RISULTATI

REPERTO ANATOMOISTOPATOLOGICO

Tra tutte le specie esaminate, soltanto la trota iridea ed il branzino hanno presentato quadri istologici riferibili a lesioni pre-neoplastiche ed a neoplasie benigne e maligne.

*** Trota iridea (*O. mykiss*)**

Nella trota iridea i casi hanno interessato due allevamenti dell'Italia Nord Occidentale. I reperti sono stati osservati soprattutto in trote di taglia superiore al chilo e sporadicamente in esemplari di taglia commerciale (400-550 gr.)

Macroscopicamente, all'apertura della cavità celomatica, si potevano apprezzare noduli protudenti sulla superficie epatica, di colorito bianco giallastro, di dimensioni comprese fra i 4-5 mm e fino a 3-4 cm, di consistenza soda. Al taglio i noduli si approfondivano nel parenchima sottostante, rimanendo tuttavia ben delimitati.

Su un totale di 474 fegati esaminati, 46 (9,7%), che macroscopicamente non mostravano lesioni, erano istologicamente caratterizzati da aree di alterata affinità tintoriale, con aspetti citologici appena lievemente alterati rispetto al normale epatocita. Questi quadri, definibili come foci basofili, eosinofili e del tipo "a cellule chiare", sono stati descritti da diversi Autori come "foci pre-neoplastici" (Hendricks et al., 1984; Myers et al., 1987).

In un soggetto (0,2%) è stato osservato un quadro di adenoma epatocellulare, caratterizzato da epatociti monomorfi, moderatamente ipertrofici, con citoplasma spiccatamente basofilo, disposti in struttura rosetiforme o cordoniforme.

In due esemplari (0,4%), il quadro istologico presentava aspetti decisamente più maligni: la normale citoarchitettura tubulo-sinusoide appariva completamente sovvertita, con presenza di cellule neoplastiche fortemente basofile, irregolari per forma e dimensioni (alcune fusiformi), con diverse mitosi. In uno dei due casi, la forte predominanza della componente connettivale, che avvolgeva le strutture tubulari, ne configurava un aspetto francamente scirroso.

* Branzino (*D. labrax*)

Nel branzino le lesioni neoplastiche sono state riscontrate soltanto in riproduttori di età compresa tra i 7 ed i 14 anni, allevati presso una stazione di riproduzione artificiale della Costa Tirrenica. Su un totale di 180 pesci presenti, tre esemplari venuti a morte presentavano fegati con evidenti alterazioni macroscopiche, caratterizzate da nodulini grigio-biancastri, di dimensioni variabili tra il grano di miglio ed il pisello, di aspetto compatto, disseminati sulla superficie epatica.

Il reperto istologico è risultato in un caso (0,55%) riferibile ad un colangioma, costituito interamente da elementi duttali biliari e stroma connettivale. Le cellule apparivano di forma colonnare con citoplasma debolmente eosinofilo e nuclei da rotondo ad ovale.

In due casi (1,1%) il quadro istopatologico si presentava con aspetti di maggiore malignità, contraddistinto da profili tubulari irregolari, con atteggiamento invasivo nei confronti del parenchima circostante. Si osservavano cellule neoplastiche di aspetto pleomorfo, con nucleoli evidenti; il tessuto fibroso, che avvolgeva i tubuli, si presentava talora in quantità minime, talora formava tralci abbondanti: in questi casi, è stata posta la diagnosi di colangiocarcinoma. Nel parenchima circostante si poteva apprezzare un numero cospicuo di centri melano-macrofagici, aumentati anche nel volume e spiccatamente positivi alla colorazione PAS e Sudan III.

ANALISI CHIMICHE

Per quanto riguarda le analisi chimiche, eseguite sia sui mangimi commerciali che su quello aziendale, entrambi utilizzati per il razionamento delle trote al momento del riscontro della patologia, non è emerso nulla di significativo relativamente alla ricerca di aflatossine (assenti), al valore di acidità ed al numero di perossidi (nella norma); solo nei mangimi aziendali e a livello dei fegati di trota iridea con questi alimentate, la presenza di vitamina C è risultata incostante (valori da 20 a 60 ppm circa); metionina e colina erano inoltre presenti in concentrazioni non ottimali nella dieta (rispettivamente 1 mg/gr e 4 mg/gr di mangime) (Prearo et al., 1994).

CONCLUSIONI

L'insieme delle lesioni pre-neoplastiche e neoplastiche epatiche rilevate nel nostro studio, rispecchia quanto descritto in bibliografia per i pesci delle acque libere (Hendricks et al., 1984; Myers et al., 1990). I quadri istopatologici hanno presentato aspetti del tutto sovrapponibili a quelli osservati in pesci e piccoli roditori da esperimento sottoposti ad epatocarcinogeni (Hendricks et al., 1984).

Dalle nostre osservazioni, la presenza nelle trote iridea di una vera e propria sequenza di eventi patologici, quali foci pre-neoplastici, quadri neoplastici benigni e maligni, suggerisce un'eziologia di natura tossica. Il danno iniziale è sicuramente di tipo degenerativo-necrotico, al quale seguirebbe una proliferazione compensatoria, di tipo rigenerativo; poi comparirebbero foci ad alterata affinità tintoriale, considerati come vere e proprie lesioni pre-neoplastiche (Hendricks, 1984).

Neoplasie epatiche sono state descritte non solo nella trota iridea (Wood e Larson, 1961; Ghittino P., 1970), ma anche in molte altre specie di pesci allevati e delle acque libere (Hendricks et al., 1984; Myers et al., 1987; May et al., 1987; Couch e Courtney, 1987; Stehr e Myers, 1990; Murchelano e Wolke, 1991). Nei pesci allevati, le aflatossine prodotte da *Aspergillus flavus* e contaminanti i mangimi, sono da ritenersi al primo posto tra i carcinogeni (Ghittino P., 1985). Nel nostro caso le analisi tossicologiche eseguite sul mangime al momento del riscontro della patologia, hanno escluso tale possibilità; va comunque tenuto conto che potrebbe essere stata sufficiente un'esposizione di breve durata nei primi stadi di allevamento (fase di accrescimento), per determinare lo sviluppo successivo dei tumori. Anche i traumi subiti durante la manipolazione, potrebbero aver giocato un ruolo fonda-

mentale nell'evoluzione a neoplasia di un tessuto già fortemente degenerato.

Per quanto riguarda i tumori epatici del branzino, non ci è stato possibile spingerci oltre la semplice segnalazione, anche se le ipotesi eziopatogenetiche parrebbero sovrapponibili a quelle prese in considerazione per la trota iridea.

E' noto che i pesci possono rappresentare un valido modello di carcinogenesi, in modo particolare in aree pesantemente contaminate da tossici ed inquinanti potenzialmente carcinogeni. La presenza di tumori nelle popolazioni di pesci destinate all'alimentazione umana deve destare allarme, non soltanto in quanto indicativa di un habitat acquatico fortemente compromesso dal punto di vista dell'inquinamento, ma anche per il rischio implicito per la salute umana (Ozonoff & Longnecker, 1991). A questo proposito va comunque ricordato che diverse sostanze responsabili di tumori nei pesci vengono completamente metabolizzate, come accade per esempio per gli idrocarburi poliaromatici, i quali non raggiungono i tessuti umani attraverso la catena alimentare, come dimostrato da Malins et al. (1985). D'altro canto, composti poco degradabili e metabolizzabili, come i PCB (policlorobifenili), il DDT od i metalli pesanti, rappresentano un reale pericolo in questo senso (Ozonoff & Longnecker, 1991). Sarebbe quindi auspicabile l'approfondimento dell'indagine sui potenziali cancerogeni presenti nelle parti edibili dei pesci con neoplasia, valutandone il rischio relativo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Couch J.A., Courtney L.A. - (1987): *N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in estuarine sheepshead minnow (Cyprinodon variegatus): neoplasms and related lesions compared with mammalian lesions*. (J.N.C.I., 79, 2: 297-321).
- 2) Ghittino P. - (1970): *Piscicoltura ed ittiopatologia*. Vol. 2° *Ittiopatologia*. (Ed. Rivista di Zootecnia, Milano: 336-344).
- 3) Ghittino P. - (1985): *Tecnologia e patologia in acquacoltura*. Vol. II - *Patologia*. (Ed. Bono, Torino: 351-366).
- 4) Hendricks J.D., Meyers T.R., Shelton D.W. - (1984): *Histological progression of hepatic neoplasia in rainbow trout (Salmo gairdneri)*. (Natl. Cancer Inst. Monogr., 65: 321-334).
- 5) Hueper W.C., Payne W.W. - (1961): *Observations on the occurrence of hepatomas in rainbow trout*. (J. Nat. Cancer Inst., 27: 1123-1143).
- 6) Malins D.C., Krahn M.M., Myers M.S., Rhoders L.D., Brown D.V., Krone C.A., Mc Cain B.B., Chan S.L. - (1985): *Toxic chemicals in sediments and biota from a creosote-polluted harbor: relationship with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English Sole (Parophrys vetulus)*. (Carcinogenesis, 6: 1463-1469).
- 7) Masahito P., Takatoshi I., Sugano H. - (1988): *Fish tumors and their importance in cancer research*. (Jpn. J. Cancer Res., 79: 545-555).

- 8) May E.B., Lukacovic R., King H., Lipsky M.M. - (1987): *Hyperplastic and neoplastic alterations in the livers of White Perch (Morone americana) from the Chesapeake Bay.* (J.N.C.I., 79, 1: 137-143).
- 9) Murchelano R.A., Wolke R.E. - (1991) : *Neoplasms and non-neoplastic liver lesions in Winter Flounder, Pseudopleuronectes americanus, from Boston Harbor, Massachusetts.* (Envir. Health Perspec., 90: 17-26).
- 10) Myers M.S., Landahl J.T., Krahn M.M., Johnson L.L., Mc Cain B.B. - (1990): *Overview of studies on liver carcinogenesis in English Sole from Puget Sound; evidence for a xenobiotic chemical etiology, I: pathology and epizootology.* (The Science of the Total Environment, 94: 33-50).
- 11) Myers M.S., Rhodes L.D., Mc Cain B.B. - (1987): *Pathologic anatomy and patterns of occurrence of hepatic neoplasms, putative preneoplastic lesions, and other idiopathic hepatic conditions in English Sole (Parophrys vetulus) from Puget Sound, Washington.* (J. Natl. Cancer Inst., 78, 2: 333-351).
- 12) Ozonoff D., Longnecker M.P. - (1991): *Epidemiologic approaches to assessing human cancer risk from consuming aquatic food resources from chemically contaminated water.* (Envir. Health Persp., 90: 141-146).
- 13) Prearo M., Bozzetta E., Bisso M.C., Ghittino C. - (1995): *Indagine istologica su una popolazione di trote iridea d'allevamento affetta da patologie epatiche.* (Boll. S.I.P.I., 16: 34-39).
- 14) Roberts R.J. - (1989): *Fish pathology. Second edition.* (Baillière Tindall, London: 153-172).
- 15) Stehr C.M., Myers M.S. - (1990): *The ultrastructure and histology of cholangiocellular carcinomas in English Sole (Parophrys vetulus) from Puget Sound, Washington.* (Toxicol. Path., 18, 3: 362-372).
- 16) Wood E.M., Larson C.P. - (1961): *Hepatic carcinoma in rainbow trout.* (Arch. Path., 71: 471-479).